

**Etablierung eines Algorithmus für die molekulare Diagnostik der  
Amerikanischen Trypanosomiasis in Routinelaboratorien nach Vergleich  
von zwei konventionellen und zwei Real-Time PCR-Methoden**

**Peter Michael Seiringer**

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
Leiter: Prof. Dr. med. Michael Hölscher

an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Etablierung eines Algorithmus für die molekulare Diagnostik der  
Amerikanischen Trypanosomiasis in Routinelaboratorien nach Vergleich  
von zwei konventionellen und zwei Real-Time PCR-Methoden**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Peter Michael Seiringer  
aus Rum (Österreich)

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: PD Dr. Nicole Berens-Riha, MSc

Mitberichterstatter: PD Dr. Heinz Rinder  
Prof. Dr. Rainer Haas

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Michael Pritsch

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2018

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Seiringer P**, Pritsch M, Flores-Chavez M, Marchisio E, Helfrich K, Mengele C, Hohnerlein S, Bretzel G, Löscher T, Hoelscher M, Berens-Riha N. Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Jul;88(3):225-232.

Navarro M, Berens-Riha N, Hohnerlein S, **Seiringer P**, von Saldern C, Garcia S, Blasco-Hernández T, Navaza B, Shock J, Bretzel G, Hoelscher M, Löscher T, Albajar-Viñas P, Pritsch M. Cross-sectional, descriptive study of Chagas disease among citizens of Bolivian origin living in Munich, Germany. *BMJ Open*. 2017 Jan 16;7(1):e013960.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Definition.....	1
1.2	Erreger .....	1
1.3	Übertragung.....	1
1.3.1	Weitere Übertragungsmöglichkeiten.....	3
1.3.2	Vektor.....	3
1.4	Epidemiologie .....	4
1.5	Pathophysiologie .....	5
1.6	Symptome.....	6
1.6.1	Akute Phase.....	6
1.6.2	Chronische Phase .....	7
1.7	Diagnostik .....	8
1.8	Differentialdiagnostik.....	10
1.9	Therapie.....	10
1.10	Prävention.....	11
2	Zielsetzung und Vorbereitung .....	12
3	Material und Methoden .....	14
3.1	Material .....	14
3.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	14
3.1.2	Geräte .....	15
3.1.3	Nukleotide .....	17
3.1.4	Probenmaterial.....	17
3.1.5	Sonstiges Material .....	18
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Intraassay (Intra).....	19
3.2.2	Interassay I (Inter I) und Interassay II (Inter II) .....	19
3.2.3	Sensitivität (Sens).....	19
3.2.4	Detektionslimit (Limit of Detection; LOD).....	19

3.2.4.1	Konventionelle PCR .....	20
3.2.4.2	Real-Time PCR.....	20
3.2.5	Spezifität Teil 1 (Spec).....	20
3.2.6	Spezifität Teil 2 (CR; Cross-reactivity).....	20
3.2.7	Matrix (Mtx).....	21
3.2.8	Parasitenzucht.....	21
3.2.9	Vorbereitung der Proben für die DNA-Isolierung.....	21
3.2.9.1	Zubereitung der Lösung aus Guanidin-HCl-EDTA .....	22
3.2.9.2	Vorgehensweise zur Vorbereitung der Proben (inklusive Extraktionskontrolle) für die DNA-Isolierung .....	22
3.2.10	DNA-Isolierung.....	23
3.2.10.1	Protokoll zur DNA-Isolierung .....	23
3.2.10.2	Lagerung der DNA-Extrakte.....	24
3.2.10.3	Qualitätskontrolle der DNA-Isolierung.....	24
3.2.11	Konventionelle PCRs .....	25
3.2.11.1	PCR-1.....	25
3.2.11.2	PCR-2.....	26
3.2.12	Real-Time PCR .....	27
3.2.12.1	PCR-3.....	27
3.2.12.2	PCR-4.....	28
3.2.13	Qualitätskontrollen .....	28
3.2.14	Threshold.....	28
3.2.15	Datenauswertung .....	28
4	Ergebnisse .....	29
4.1	Übersicht .....	29
4.2	Intra- und Interassay.....	30
4.2.1	PCR-1 .....	30
4.2.2	PCR-2 .....	31
4.2.3	PCR-3 .....	32

4.2.4	PCR-4.....	33
4.3	Sensitivität.....	34
4.3.1	Untersuchung von 50 bekannt positiven Proben.....	34
4.3.1.1	Übersicht.....	34
4.3.1.2	PCR-1.....	37
4.3.1.3	PCR-2.....	37
4.3.1.4	PCR-3.....	38
4.3.1.5	PCR-4.....	39
4.3.2	Bestimmung des Detektionslimits.....	40
4.3.2.1	PCR-1.....	40
4.3.2.2	PCR-2.....	41
4.3.2.3	PCR-3.....	42
4.3.2.4	PCR-4.....	43
4.4	Spezifität.....	44
4.4.1	Untersuchung von bekannt negativen Proben.....	44
4.4.1.1	PCR-1.....	44
4.4.1.2	PCR-2.....	45
4.4.1.3	PCR-3.....	46
4.4.1.4	PCR-4.....	47
4.4.2	Untersuchung von potenziell kreuzreaktiven Analyten.....	48
4.4.2.1	PCR-1.....	48
4.4.2.2	PCR-2.....	49
4.4.2.3	PCR-3.....	50
4.4.2.4	PCR-4.....	51
4.5	Matrixeffekt.....	52
4.5.1.1	PCR-1.....	52
4.5.1.2	PCR-2.....	52
4.5.1.3	PCR-3.....	53
4.5.1.4	PCR-4.....	54

5	Diskussion.....	55
5.1	Serologie vs. PCR.....	55
5.2	Probenvorbereitung und DNA-Isolation .....	55
5.2.1	Probenvorbereitung .....	55
5.2.2	DNA-Isolierung.....	55
5.3	Auswahl der zu vergleichenden PCR-Methoden.....	56
5.3.1	PCR-1 .....	56
5.3.2	PCR-2 .....	56
5.3.3	PCR-3 .....	57
5.3.4	PCR-4 .....	57
5.4	Performance der Methoden .....	57
5.4.1	Sensitivität und LOD.....	58
5.4.2	Spezifität Teil 1 .....	58
5.4.3	Spezifität Teil 2 (Kreuzreaktivität).....	59
5.4.3.1	<i>Trypanosoma rangeli</i> .....	59
5.4.3.2	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> , <i>Leishmania tropica</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> und <i>Leishmania major</i> .....	60
5.4.4	Intraassay, Interassay I, Interassay II .....	60
5.4.5	Matrixeffekt.....	61
5.5	Vergleich der getesteten Methoden mit anderen publizierten Methoden.....	61
5.6	Kosten.....	62
5.7	Benutzerfreundlichkeit .....	62
5.8	Weitere Erkenntnisse.....	63
5.9	Zusammenfassung .....	63
5.10	Schlussfolgerung .....	64
6	Ausblick .....	66
6.1	Die deutschlandweite „EL CiD“-Studie.....	66
7	Glossar.....	67
8	Literaturverzeichnis.....	69

9	Danksagung.....	78
10	Eidesstattliche Versicherung.....	79

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition

Die Amerikanische Trypanosomiasis, auch bekannt als Chagas-Erkrankung, benannt nach ihrem Erstbeschreiber Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (\*09.07.1879 in Oliveira, Brasilien, † 08.11.1934 in Rio de Janeiro, Brasilien), ist eine parasitäre Infektionserkrankung (2). Sie wird durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) hervorgerufen, benannt nach dem brasilianischen Arzt Oswaldo Gonçalves Cruz (\*05.08.1872 in São Luís do Paraitinga, Brasilien, † 11.02.1917 in Petrópolis, Brasilien). Er war der Mentor von Carlos Chagas, an dessen Institut er die Entdeckung gemacht hatte.

## 1.2 Erreger

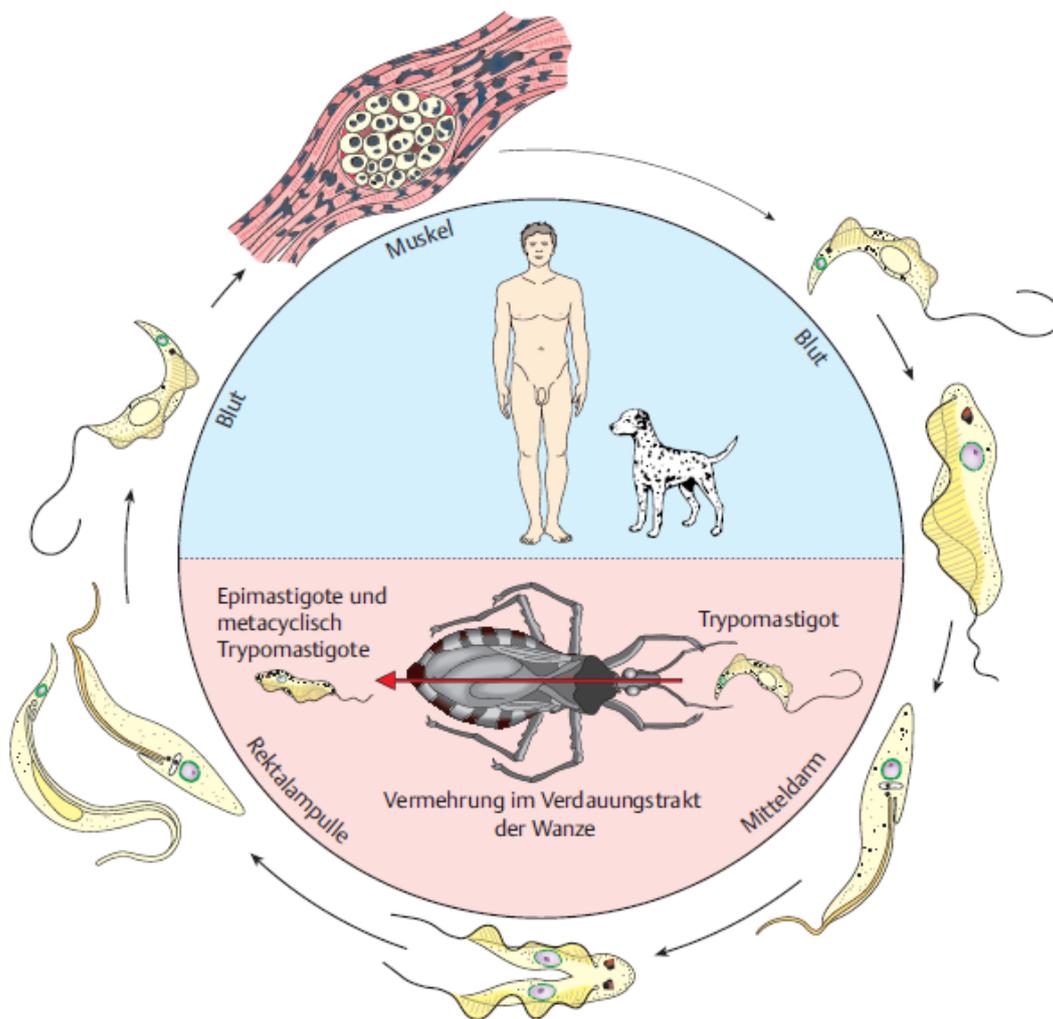
Die Erkrankung wird durch *T. cruzi* hervorgerufen. Es handelt sich dabei um einen einzelligen, begeißelten Parasiten, der ausschließlich in Süd- und Mittelamerika endemisch ist. Er zirkuliert zwischen Vektor (Raubwanze) und Wirt (Mensch und zahlreiche Haus- und Wildtiere). *T. cruzi* ist eine Art der Gattung *Trypanosoma*, welche wiederum zur Familie der *Trypanosomatida* gehört, die ihrerseits der Ordnung *Kinetoplastea* untergestellt ist. *Kinetoplastea* besitzen ein einziges Mitochondrium, in dem sich eine eigene DNA-Struktur befindet, welche in der Literatur als *kinetoplast DNA (kDNA)* bezeichnet wird (3). Sie besteht aus einem einzigartigen System aus miteinander in Verbindung stehenden Ringen (mini- und maxicircles). *T. cruzi* kann in sechs verschiedene Stämme, sogenannte *Discrete Typing Units (DTUs)* eingeteilt werden (TcI-TcVI), welche sich hinsichtlich geografischer Verteilung im Endemiegebiet, Übertragungszyklus und klinischer Manifestationen zwar unterscheiden, aber nicht gänzlich verschieden sind (4, 5).

## 1.3 Übertragung

Um den Übertragungsmechanismus genauer zu verstehen, muss der Lebenszyklus des Parasiten im Vektor, der Raubwanze, bzw. im Wirt, dem Menschen und einigen Tieren, vor Augen geführt werden. An dieser Stelle sei erwähnt, dass in dieser humanmedizinischen Arbeit ein Fokus auf den Menschen als Wirt gelegt wird und im Folgenden nur mehr von ebendem gesprochen wird. Der Parasit durchläuft mehrere Entwicklungsstadien: epimastigot, trypomastigot und amastigot (siehe Abbildung 1). Die infektiösen Formen umfassen die amastigote und die trypomastigote Form (6). Trypomastigote sind begeißelt und können sich im Gegensatz zu den Amastigoten fortbewegen, welche nur eine sehr kleine, lichtmikroskopisch nicht sichtbare Geißel besitzen (7).

Beim Biss einer infizierten Raubwanze setzt diese zur gleichen Zeit infektiöse Trypomastigote im Kot frei, welche nicht in der Lage sind, die intakte Haut zu durchdringen. Sie dringen indirekt durch die

Bisswunde der Wanze oder andere Hautläsionen bzw. intakte Schleimhäute in lokale Wirtszellen ein. Dort entwickeln sich die Trypomastigote zuerst zu Amastigoten, welche sich durch Zweiteilung vermehren, um sich schließlich wieder zu Trypomastigoten zurückzubilden. Die Trypomastigoten dringen nun in den Blutkreislauf des Menschen ein und können sich entweder in anderen Wirtszellen intrazellulär wieder zu Amastigoten entwickeln, um sich dort abermals zu vermehren, oder durch eine Blutmahlzeit einer Raubwanze diese infizieren. Im Mitteldarm des Vektors liegen die Erreger nun als Epimastigote vor und vermehren sich, ehe sie sich im Hinterdarm wieder in die infektiöse trypomastigote Form entwickeln, womit der Zyklus geschlossen ist. Bei einer erneuten Blutmahlzeit werden die Trypomastigote im Kot ausgeschieden, welche den Wirt infizieren können (8-10).



**Abbildung 1.** Lebenszyklus von *T. cruzi*; aus (10)

### 1.3.1 Weitere Übertragungsmöglichkeiten

Des Weiteren ist eine Übertragung möglich durch:

- Konnatale Transmission von einer infizierten Mutter auf ihr Kind
- Bluttransfusionen oder Organtransplantationen
- Einnahme von Flüssigkeiten oder Speisen, welche mit Kot von mit Trypomastigoten infizierten Raubwanzen kontaminiert waren (11)
- Laborunfälle

Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch gilt als unmöglich (12).

### 1.3.2 Vektor

Die *Triatominae*, eine Unterfamilie der *Reduviidae* (Raubwanzen), ihrerseits eine Familie der *Heteroptera* (Landwanzen), sind die Überträger (Vektoren) der Amerikanischen Trypanosomiasis. Den *Triatominae* gehören ca. 140 Arten an. Ob alle Vertreter als Vektoren von *T. cruzi* fungieren, ist nicht endgültig geklärt. Jedoch scheint nur ein geringer Anteil (ca. zwölf Arten) zur Aufrechterhaltung des Lebenszyklus des Parasiten beizutragen (7, 9, 13, 14). Die häufigsten Vektoren sind *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* und *Panstrongylus megistus* in den Ländern des südamerikanischen Südkegels, *Rhodnius prolixus* und *Triatoma dimidiata* in den Ländern der Andengemeinschaft und Teilen Mittelamerikas



**Abbildung 2.** *Triatoma infestans*; aus (1)

und *T. dimidiata* und *Triatoma barberi* in Mexiko (15). Die Wanzen sind hauptsächlich nachtaktiv und befähigt, kurze Distanzen zu fliegen. Die Flugdistanz liegt bei ca. 500 m (16), durch passives Treiben im Wind kann dieser Radius aber vergrößert werden. Während sich die für die Übertragung der Chagas-Erkrankung verantwortlichen Raubwanzen unter Tags üblicherweise in Rissen und Ritzen in Häuserwänden oder anderen Verstecken aufhalten, treten sie für die nächtliche Blutmahlzeit daraus hervor. Ein häufiger Aufenthaltsort ist in den Wänden von Lehmhäusern, welche in ärmlichen Gegenden in Südamerika häufig zu finden sind (siehe Abbildung 3). Es saugen sowohl männliche, als auch weibliche *Triatominae* Blut.

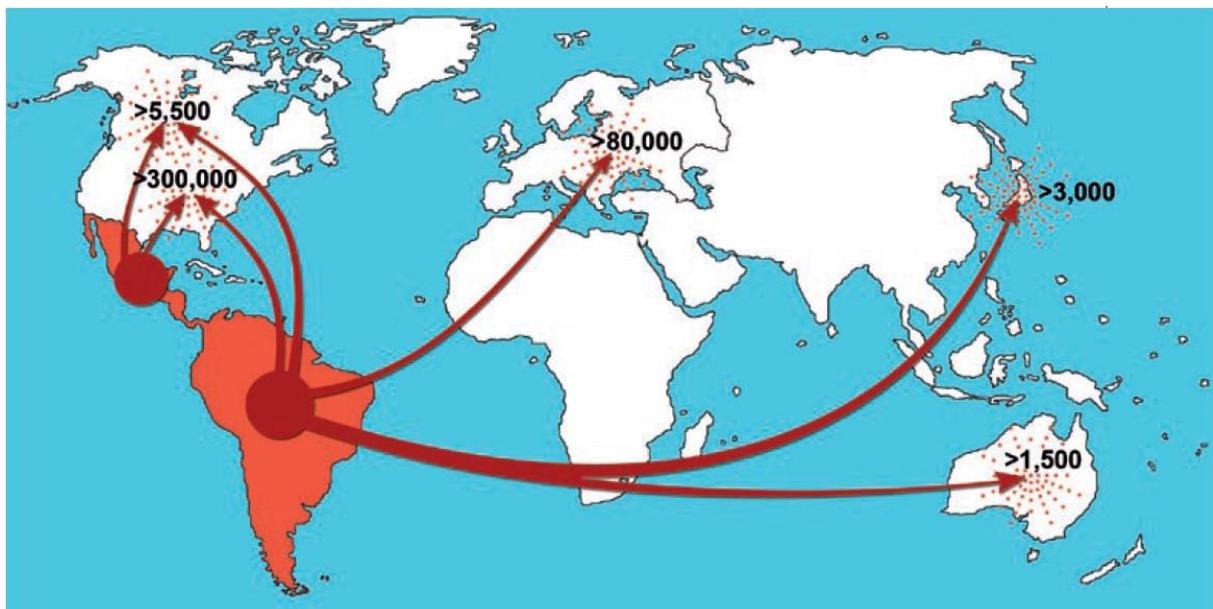


**Abbildung 3.** Lehmhäuser im bolivianischen Chagas-Endemiegebiet (Fotos: Peter Seiringer)

## 1.4 Epidemiologie

Die amerikanische Trypanosomiasis wurde 1909 von Carlos Chagas nach der Untersuchung von Feldarbeiterinnen und Feldarbeitern in Brasilien erstmalig beschrieben (17). Die Krankheit reicht aber viel weiter zurück, es konnte bereits in Mumien aus dem Jahr 7050 v. Chr. Erbmaterial von *T. cruzi* nachgewiesen werden (18). Als enzootische Infektion dürfte sie schon mehrere Millionen Jahre existieren (19).

Anders als noch vor ca. einem Jahrzehnt angenommen wurde, es gäbe weltweit bis zu 18 Millionen mit der Chagas-Erkrankung Infizierte (16), wird die Prävalenz momentan mit sechs bis acht Millionen Menschen weltweit beziffert, wovon die meisten in Lateinamerika leben (20, 21). Bis etwa Mitte des 20. Jahrhunderts beschränkte sich die Erkrankung auf ländliche Gebiete Süd- und Mittelamerikas, bevor es durch die Urbanisierung und Globalisierung – und die damit einhergehende stärkere Migration – auch zu einem relevanten Gesundheitsproblem in Städten und nicht-endemischen Gebieten wurde, wie zum Beispiel in Nordamerika, Europa und dem Nordwestlichen Pazifikraum (12, 22, 23).



**Abbildung 4.** Migration von Infizierten aus Süd- und Mittelamerika in nicht endemische Gebiete. Die Zahlen geben Schätzungen der Anzahl an Infizierten in den jeweiligen Gebieten an (19).

In Europa befinden sich die meisten Immigrantinnen und Immigranten aus Süd- und Mittelamerika in Spanien. 2010 wurden bis zu 1,7 Millionen Menschen aus 17 Ländern, die als Endemiegebiet für die Chagas-Erkrankung gelten, in Spanien vermutet. Bei einer angenommenen Durchseuchungsrate von 5,2% hieße dies, dass sich bis zu 87.000 mit *T. cruzi* Infizierte in Spanien befinden (12, 24). Sollten frühere Annahmen zutreffen, laut denen die Zahl der aus Bolivien stammenden Menschen in Spanien höher beziffert worden war (25), wäre die tatsächliche Zahl an Infizierten deutlich höher. Demgegen-

über wurde die Anzahl der mit der Chagas-Erkrankung infizierten erwachsenen Immigrantinnen und Immigranten aus Endemiegebieten in Spanien auf 42.173 geschätzt (26). In Deutschland befanden sich im Jahr 2010 nach Schätzungen ca. 2.200 Personen aus Süd- und Mittelamerika, welche mit *T. cruzi* infiziert waren (24). Da es hierzu nur wenige verlässliche Daten gibt, wurde im Jahr 2014 das deutschlandweite Projekt „El CiD“ (Erkennung und Lenkung von Chagas-Patienten in Deutschland) gestartet (weitere Informationen sh. 6.1) (27, 28). Zudem wurde im Zuge eines Pilotprojektes an der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (Tropeninstitut München) die epidemiologische Situation der Chagas-Erkrankung bei in München lebenden Personen mit bolivianischen Wurzeln untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz deutlich höher war als zuvor angenommen und bei einem bedeutenden Anteil der untersuchten Population ein Informationsdefizit bezüglich der Erkrankung besteht (29). Die molekularbiologische Diagnostik im Rahmen des Projektes wurde mit den Methoden, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, von mir durchgeführt.

## 1.5 Pathophysiologie

Durch die in den Wirt eingedrungenen Parasiten, welche sich intrazellulär im Gewebe befinden, kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Apoptose der betroffenen Zellen. Histologisch zeigt sich ein interstitielles Ödem, Lymphozyteninfiltration und eine reaktive Hyperplasie von benachbarten Lymphknoten (10, 30). Außerdem kann es an der Eintrittsstelle der Parasiten zu einer lokalen Entzündung kommen, dem sogenannten *Chagom*. Dies darf nicht mit dem *Romaña-Zeichen* verwechselt werden, welches sich in Form von Konjunktivitis und einseitigen periorbitalen Lidödem in der akuten Phase der Chagas-Erkrankung nach Parasiteneintritt durch die Konjunktiva äußert (10).

Die intrazellulären Parasitenansammlungen bilden gelegentlich Pseudozysten, welche aus sich vermehrenden Amastigoten bestehen. Wie zuvor im Falle der Wirtszellen beschrieben, können auch die Pseudozysten platzen, wodurch die Parasiten, welche sich nun wieder zur trypomastigoten Form entwickelt haben, in den Blutkreislauf des Wirtes ausgeschwemmt werden und von dort andere Organe, wie z.B. (Herz-)Muskelgewebe infiltrieren. Eine akute Myokarditis mit Nekrosearealen wird häufig beobachtet (31). Im Liquor cerebrospinalis können ebenfalls gelegentlich Parasiten nachgewiesen werden (32).

Die chronische Chagas-Erkrankung manifestiert sich am häufigsten am Herzen, am Ösophagus und/oder am Colon (33). Es existieren verschiedene Theorien, welche die Ätiologie der Manifestationen der Chagas-Erkrankung zu erklären versuchen. Einigkeit scheint darüber zu herrschen, dass mehrere Prozesse daran beteiligt sind. Einerseits wird durch die Parasiten direkt eine Entzündungsreaktion

hervorgerufen, andererseits scheinen (Auto-)Immunprozesse ebenfalls eine Rolle zu spielen (31, 33-36). Ein wichtiger Vorgang scheint die Denervierung des autonomen parasympathischen Nervensystems zu sein. Die laut Köberle (37) daraus resultierende relative Überlegenheit des Sympathikus stellt eine mögliche Erklärung für die kardialen und gastrointestinalen Symptome dar. Da aber unter anderem keine Korrelation zwischen der Denervierung und dem Grad der myokardialen Dysfunktion gefunden werden konnte, die Ausprägung der parasympathischen Beteiligung an den pathophysiologischen Vorgängen in Erkrankten hoch variabel ist und ebenfalls eine sympathische Denervierung nachgewiesen werden konnte, muss diese Theorie angezweifelt werden (2, 38).

Am Herzen kommt es zu einer myokardialen Hypertrophie, Myokarditis, Dilatation der Ventrikel (dilatative Kardiomyopathie), Herzspitzenaneurysmata und thrombembolischen Ereignissen (2, 34, 36). Weiters sind Läsionen des Reiz-Leitungssystems am Herzen häufig nachzuweisen (2, 39). Sämtliche genannten Schädigungen werden durch Mikrogefäßveränderungen, kontinuierliche diffuse Fibrosierung der Myozyten und Einwanderung von Monozyten in die Herzmuskulatur begünstigt (2, 34).

Im Gastrointestinaltrakt kommt es vor allem am Ösophagus und/oder am Colon zu einer Dilatation (Megaösophagus, Megacolon), Wandverdickung und Aperistaltik, welche auf die Zerstörung des Plexus myentericus bzw. parasympathischer und sympathischer Nervenfasern zurückgeführt werden (33, 36, 40-42). Bei immunsupprimierten Patientinnen und Patienten, z.B. nach einer Organtransplantation oder bei einer Koinfektion mit HIV, kann es zu einer Reaktivierung einer bestehenden Infektion mit *T. cruzi* kommen (10, 43).

## **1.6 Symptome**

Die Chagas-Erkrankung verläuft in zwei Phasen, der akuten und der chronischen. Die chronische Phase wiederum kann in eine indeterminierte (asymptomatische) und eine determinierte (symptomatische) Form unterteilt werden (2, 38, 44). Manche Autoren nehmen diese Unterteilung nicht an und sprechen von drei Phasen, einem akuten, einem intermediären und einem chronischen Stadium (45). Hierbei ist das intermediäre (Latenz-)Stadium der indeterminierten und das chronische Stadium der determinierten Form der oben genannten Einteilung gleichzusetzen. In dieser Arbeit findet ausschließlich die erstgenannte Einteilung Verwendung.

### **1.6.1 Akute Phase**

Die akute Phase dauert zwischen vier und acht Wochen ab Parasiteneintritt an. Häufig bleibt sie symptomlos. Treten Symptome auf, passiert dies nach ca. ein bis zwei Wochen, diese klingen aber im Großteil der Fälle auch ohne Therapie ab. Im Falle einer Übertragung durch eine Bluttransfusion können akute Symptome bis zu einige Wochen nach der Transfusionsgabe auftreten (2).

Die Symptome der akuten Phase sind oft mild und unspezifisch, was zur Folge hat, dass vor allem Betroffene aus ärmlichen ländlichen Gegenden Mittel- und Südamerikas auf einen Arztbesuch verzichten und die Erkrankung somit (vorerst) unentdeckt bleibt (9). Das *Romaña*-Zeichen und das Chagom zählen ebenfalls zu den akuten Symptomen, zeigen sich jedoch nur in einem Bruchteil der Fälle. Des Weiteren umfassen diese Fieber, Lymphknotenschwellung, Konjunktivitis, Hautveränderungen, Tachykardie und Hepatosplenomegalie (9, 10).

### 1.6.2 Chronische Phase

Bei den meisten von der Chagas-Erkrankung Betroffenen liegt die chronische, indeterminierte (asymptomatische) Form vor, die bis ans Lebensende unerkannt bleibt (46). Bei ca. 15-30% der Infizierten stellt sich jedoch nach einer Latenzzeit von 10-25 Jahren die determinierte Form ein, welche mit irreversiblen Organschädigungen einhergeht (23). Bei ca. 20-30% der Patienten, die unter der chronischen Chagas-Erkrankung leiden, kann eine Kardiomyopathie nachgewiesen werden, was somit die häufigste Manifestation darstellt (2, 34, 35). Die anfangs noch asymptomatischen EKG-Veränderungen (ST-Veränderungen, AV- und Rechtsschenkelblöcke, polymorphe ventrikuläre Extrasystolie) können nach Fortschreiten der Erkrankung zu schwereren Symptomen wie Herzinsuffizienz, Herzspitzenaneurysmata, Thrombembolien und schlussendlich zum plötzlichen Herztod führen. Letzterer ist für ca. zwei Drittel der Todesfälle der an der Chagas-Kardiomyopathie Leidenden verantwortlich (2).

Gastrointestinale Symptome, welche sich bevorzugt als sogenannte Megabildungen an Ösophagus und Colon (Megaösophagus, Megacolon) äußern, treten bei ca. 10-15% der an der chronischen Form der Erkrankung Leidenden auf (2). Diese Symptome finden sich hauptsächlich bei Betroffenen, welche sich südlich des Amazonasbeckens infiziert haben (d. h. Argentinien, Brasilien, Chile und Bolivien), während sie in Mexiko und dem nördlichen Süd- und Mittelamerika nur selten zu beobachten sind. Dies ist vermutlich auf die Unterschiede zwischen den Parasitenstämmen (Discrete Typing Units; *DTUs*) zurückzuführen (2, 47). Der Megaösophagus hat Dysphagie mit Odynophagie, retrosternaler Schmerz, Regurgitation und Aufstoßen zur Folge. Das Megacolon, welches sich oft am Colon descendens, Sigma oder Rectum äußert, führt zu prolongierter Obstipation, Blähungen und Stuhlverhalt (2, 10). Die gastrointestinalen Symptome per se führen in der Regel nicht zu einer verminderten Lebenserwartung. Ob jedoch beim Vorliegen eines Megaösophagus ein erhöhtes Risiko für ein Ösophagus-Karzinom besteht, scheint nicht endgültig geklärt (2, 48, 49). Bei Betroffenen mit Megacolon scheint ein erhöhtes Auftreten von Colon-Karzinomen nicht gegeben zu sein (50).

## 1.7 Diagnostik

Die Diagnostik erfolgt je nach Krankheitsstadium auf unterschiedliche Weise. In der akuten Phase, in der die Parasitämie in der Regel hoch ist, können die Erreger oft im Blut, gelegentlich auch in anderen Körpersäften wie z.B. dem Liquor cerebrospinalis, direkt unter dem Mikroskop nachgewiesen werden. Verschiedene Techniken kommen zum Einsatz. Die Probe kann im direkten Blutaussstrich unter dem Mikroskop beurteilt werden, nativ oder nach Giemsa-Färbung. Der Dicke Tropfen oder Konzentrationsmethoden wie der Mikrohämatokrit („Buffy-Coat“) und die Methode nach Strout (s. u.) kommen ebenfalls zur Anwendung.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass speziell in Gebieten, in denen sowohl *T. cruzi*, als auch der apathogene Parasit *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) endemisch sind (51), zwischen diesen beiden Arten unterschieden werden muss, was unter dem Mikroskop oft schwierig ist. Nach Giemsa-Färbung ist ein mögliches Unterscheidungsmerkmal der Kinetoplast, welcher bei *T. cruzi* äußerst prominent ausgeprägt ist und im Mikroskop den Anschein hat, als wäre er dem Parasiten aufgelagert. Jedoch gelingt die rein morphologische Differenzierung nicht immer, weshalb im Zweifel auf molekularbiologische Methoden zurückgegriffen werden sollte (52-55).

Beim Mikrohämatokrit wird das Blut der betroffenen Person in einem Mikrohämatokritröhrchen abzentrifugiert, wodurch sich zwischen den Erythrozyten und dem Plasma der sogenannte „Buffy-Coat“ bildet, welcher neben Leukozyten und Thrombozyten auch gegebenenfalls vorhandene Parasiten enthält. Das Röhrchen wird im Bereich des „Buffy-Coats“ durchtrennt, die Grenzschicht auf einen Objektträger aufgetragen, wenn gewünscht nach Giemsa gefärbt und anschließend im Mikroskop auf das Vorhandensein von Parasiten beurteilt (56).

Bei der Konzentrationsmethode nach Strout werden 5-10 ml Blut entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit einem Holzstäbchen gefüllt. Das sich am Holzstäbchen nach kurzer Zeit gebildete, daran haftende Blutkoagel wird entfernt und das Röhrchen anschließend mit ca. 90-300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und mit ca. 600-900 x g erneut abzentrifugiert. Nun kann das Sediment im Mikroskop auf das Vorhandensein von Parasiten beurteilt werden (43, 57). Diese Methode beruht auf der Beobachtung von R. Strout aus dem Jahr 1962, wonach sich Flagellaten in koagulierendem Blut in das Serum flüchten und dort nachgewiesen werden können (58).

In der chronischen Phase sind die Parasiten auf Grund der niedrigen Parasitämie nur mehr selten in direkten Methoden nachweisbar. Der Fokus der Diagnostik liegt in dieser Phase deshalb auf serologischen Verfahren. Hierbei wird das Serum, der flüssige Bestandteil des Blutes ohne die Gerinnungsfaktoren, welches aus abgenommenem Vollblut durch Zentrifugation gewonnen wird, untersucht. Zur Anwendung kommen unter anderem indirekte Immunofluoreszenz, Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay (ELISA) und indirekte Hämagglutination (55, 59). In der Regel müssen zwei unabhängig voneinander durchgeführte serologische Verfahren, welche verschiedene Antigene nutzen, eine Infektion anzeigen, damit die Person als seropositiv gilt (59).

Eine weitere Methode zum Parasitennachweis im chronischen Stadium stellt die Xenodiagnose dar. Hierbei werden der betroffenen Person 40 (oder mehr) Nymphen von im Labor gezüchteten, nicht infizierten Raubwanzen in mehreren Kästchen aufgesetzt, welche auf der der Haut zugewandten Seite eine dünne, mit Löchern versehene Membran aufweist. Hierdurch können die Raubwanzen ihre Blutmahlzeit zu sich nehmen (55, 57). Zuletzt wurde diese „traditionelle“ Methode immer mehr durch die „artifizielle“ Methode ersetzt, welche die gleiche bzw. eine höhere Sensitivität aufweist. Bei der artifiziellen Methode wird der betroffenen Person Blut abgenommen, welches im Anschluss heparinisiert, erwärmt und den Raubwanzen verabreicht wird (60). In beiden Fällen werden nach 30, 60 und 90 Tagen die Ausscheidungen (Kot, Urin) der Wanzen auf Trypomastigote untersucht (55).

In den letzten Jahren hat die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Diagnostikmethode an Bedeutung zugenommen. Sie wird vor allem gezielt bei Verdacht auf Infektion durch eine Bluttransfusion oder Organtransplantation, Reaktivierung im chronischen Krankheitsstadium durch Immunsuppression, konnatale Infektion und unbeabsichtigte Infektion, beispielsweise durch Laborunfälle, eingesetzt. Zusätzlich wird eine Polymerase-Kettenreaktion – häufig komplementär zu serologischen Methoden – durchgeführt. Ebenfalls hilfreich kann die durch eine PCR ermöglichte Sequenzierung des Genoms des Erregers sein, wenn nicht endgültige Sicherheit herrscht, um welche Gattung der *Trypanosomati-da* es sich handelt. Die Unterteilung in die verschiedenen Typen von *T. cruzi* kann auch damit erreicht werden. Bei Betroffenen, bei denen bereits eine Infektion mit *T. cruzi* nachgewiesen wurde und die behandelt werden, scheint sich die PCR für die Überwachung des Therapieerfolgs ebenfalls zu bewähren (55).

Bei der konnatalen Form kommen die direkten Nachweismethoden häufig zur Anwendung, zumal die Parasitämie in diesen Fällen in der Regel sehr hoch ist. Hierfür wird entweder venöses Blut oder Blut aus der Nabelschnur des Neugeborenen gewonnen. Bei Entnahme von Nabelschnurblut besteht jedoch die Möglichkeit, dass dieses mit Antikörpern der Mutter verunreinigt ist (55, 61). Serologische Methoden sind bei Neugeborenen nicht uneingeschränkt zu empfehlen, weil es zur Übertragung von maternalen Antikörpern auf das Kind kommen kann, die zu einem falsch-positiven Ergebnis führen können. Sollten die weiter oben genannten direkten Methoden beim Säugling nicht durchführbar sein, können serologische Verfahren acht bis zehn Monate nach Geburt durchgeführt werden, weil bis dahin in der Regel die maternalen Antikörper verschwunden sind (59, 62, 63).

## 1.8 Differentialdiagnostik

In der akuten Phase muss in der Differenzialdiagnostik an sämtliche fieberhafte Infektionen gedacht werden, die im Endemiegebiet und, bei Migranten, im Aufenthaltsland, vorkommen. Organmanifestationen der chronischen Phase am Herzen müssen gegen Kardiomyopathien anderer Ätiologie abgegrenzt werden. Beim Vorliegen gastrointestinaler Symptome muss bei Beteiligung der Speiseröhre an das Vorliegen einer Achalasie bzw. eines Ösophaguskarzinoms, bei Beteiligung des Colons an eine mechanische Obstruktion bzw. eine maligne Erkrankung gedacht werden (10).

## 1.9 Therapie

Gemäß Empfehlungen wird die Therapie der Chagas-Erkrankung in folgenden Fällen empfohlen:

- In der akuten Erkrankungsphase
- Nach einer konnatalen Übertragung
- In der symptomlosen (indeterminierte) chronischen Phase
- In der frühen symptomatischen (determinierten) chronischen Phase

Es konnte gezeigt werden, dass die medikamentöse Behandlung bei ca. 60-85% der Patientinnen und Patienten in der akuten Krankheitsphase, bei etwa 90% der Säuglinge mit konnataler Infektion (bei Behandlung innerhalb des ersten Lebensjahres) und bei ca. 60% der chronisch Infizierten erfolgreich war. Bei chronisch Infizierten ist die Effektivität der Therapie aber nach wie vor umstritten (43, 64-68). Die im Jahr 2015 veröffentlichten Ergebnisse der BENEFIT-Studie haben gezeigt, dass durch eine Therapie von Patientinnen und Patienten mit manifester Chagas-Kardiomyopathie mit Benznidazol zwar die Parasitenkonzentration im Serum signifikant verringert werden konnte, dies jedoch den weiteren Verlauf der kardialen Schädigung nicht signifikant verändert (69).

Es gibt zwei anti-parasitäre Medikamente für die Behandlung der Chagas-Erkrankung: Benznidazol und Nifurtimox. Da Benznidazol besser verträglich ist und effektiver wirkt, gilt es als Mittel der ersten Wahl (70). Die orale Einnahme von Benznidazol sollte in zwei bis drei Dosen pro Tag (insgesamt 5-8 mg/kg Körpergewicht (KG)) für 30-60 Tage erfolgen. Die häufigsten Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, Hautreaktionen, Leukopenie, Neuropathie, Schwindel und Schlafstörungen (71, 72). Bei mit HIV Koinfizierten gibt es keine genauen Daten für die Dauer der Therapie, jedoch wird häufig ein Zeitraum von 60-90 Tagen angegeben (73). Für Nifurtimox wird eine auf zwei bis drei Einnahmen aufgeteilte Tagesdosis von insgesamt 8-10 mg/kg KG für 60-120 Tage empfohlen. Die Nebenwirkungen sind mit denen bei der Einnahme von Benznidazol zu vergleichen, jedoch sind gastrointestinale Beschwerden unter Nifurtimox schwerer (43, 71, 74). Bei Schwangeren ist die Einnahme von anti-parasitären Medikamenten auf Grund der noch weitgehend unbekanntem Terato-

genität und der hohen Frequenz, mit der Nebenwirkungen im Erwachsenenalter auftreten, kontraindiziert (62).

### **1.10 Prävention**

Die Eradikation der Chagas-Erkrankung ist äußerst schwierig. Da kein Impfstoff vorhanden ist, muss das Ziel die Kontrolle über die Erkrankung mit all ihren Facetten sein, d.h. Kontrolle sowohl über die Vektoren, als auch über nicht-vektorielle Übertragungswege.

In Endemiegebieten sind die Häuser der Bevölkerung oft in einem schlechten Zustand und einfach gebaut (z.B. aus Lehm). Diese Umstände bieten idealen Schutz für die Raubwanzen, die sich unter Tags in den Ritzen und Löchern in den Wänden bzw. im Dach verstecken, um in der Nacht ihre Blutmahlzeit zu sich zu nehmen. Ein wichtiger Schritt in der Bekämpfung der Erkrankung ist somit die Verbesserung der Behausungssituation, sodass die Vektoren nicht in den Häusern der Bevölkerung verweilen und sich dort vermehren können. Des Weiteren muss die Bevölkerung über die Ätiologie der Chagas-Erkrankung, ihre Übertragungswege, Symptome und die schlechten Therapiemöglichkeiten aufgeklärt werden. Wie zuvor erwähnt, zeigte ein Pilotprojekt in München, dass die untersuchte, aus Bolivien stammende Population bezüglich der Erkrankung schlecht informiert war (29). Das ebenfalls bereits erwähnte deutschlandweite Projekt „EL CiD“ (Erkennung und Lenkung von Chagas-Patienten in Deutschland) versucht diesem Missstand entgegenzuwirken (siehe auch 6.1)

Um nicht-vektorielle Ausbreitungswege zu verhindern, müssen serologische Untersuchungen bei den Beteiligten (Blut-/Organspender und -innen, Schwangere) durchgeführt und im Anschluss die nötigen Konsequenzen gezogen werden. Außerdem sollte das Blut von Neugeborenen seropositiver Mütter nach der Geburt auf Trypanosomen untersucht werden. Im Falle eines positiven Ergebnisses wird eine anti-parasitäre Therapie empfohlen (10, 43). In den letzten 25 Jahren wurden mit Hilfe der Pan American Health Organization (PAHO) und der World Health Organization (WHO) zahlreiche Initiativen zur Kontrolle und Elimination der Chagas-Erkrankung ins Leben gerufen. Dazu zählen die 1992 gegründete Southern Cone Initiative (INCASUR; in Argentinien, Bolivien, Brasilien, Chile, Paraguay, Uruguay), die 1997 gegründete Central American Initiative (IPCA; in Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panama), die 1998 gegründete Andean Initiative (IPA; in Kolumbien, Ecuador, Peru, Venezuela) und die 2005 gegründete Amazon Initiative (AMCHA; in Bolivien, Brasilien, Kolumbien, Ecuador, Guyana, Französisch-Guyana, Peru, Suriname, Venezuela) (5, 75). Dadurch konnten die jährlichen Todeszahlen von ca. 45.000 Personen/Jahr (Anfang der 1990er-Jahre) auf ca. 12.000/Jahr (2008) reduziert werden. Die Jahresinzidenz der Chagas-Erkrankung verringerte sich in diesem Zeitraum von 700.000 auf 56.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Die Mortalität (Gesamtzahl aller Infizierten) verminderte sich von ca. 30 Millionen auf sechs bis acht Millionen Erkrankte (76-78).

## 2 Zielsetzung und Vorbereitung

In Deutschland wurden bisher routinemäßig neben den klassischen, sehr aufwendigen direkten Nachweismethoden unter dem Mikroskop nur serologische Verfahren angeboten. In einigen Fällen ist jedoch der direkte Nachweis der Parasiten-DNA mittels PCR zu bevorzugen (Transfusion, maternale Übertragung, Reaktivierung etc.) (79). Deshalb wurde im Zuge der Vorbereitung der 2014 ins Leben gerufenen deutschlandweiten Studie zur Chagas-Erkrankung das übergeordnete Ziel definiert, ein molekularbiologisches Verfahren für die Routinediagnostik in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München zu etablieren. Die PCR sollte die Detektion von *T. cruzi* kostengünstig, schnell und zuverlässig ermöglichen.

Als konkrete Aufgaben bzw. Ziele wurden definiert:

- 1) Erlernen gängiger molekularbiologischer Diagnostikmethoden der Chagas-Erkrankung im Instituto de Salud Carlos III in Majadahonda-Madrid, Spanien.
- 2) Vergleich von vier PCR-Methoden zur Detektion von *T. cruzi* am Tropeninstitut München.
- 3) Etablierung eines Algorithmus für die molekulare Diagnostik der Amerikanischen Trypanosomiasis am Tropeninstitut München.

Nachdem die Zielsetzung des Projektes definiert worden war, wurde Kontakt zum spanischen Referenzlabor für die Diagnostik der Chagas-Erkrankung, dem Departamento de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda-Madrid, Spanien (ISCIII), aufgenommen. Die Verantwortliche vor Ort, Dr. María Flores-Chavez, ermöglichte mir einen zweiwöchigen Aufenthalt am Labor in Spanien, um einen Einblick in die Diagnostik der Chagas-Erkrankung zu erlangen und gängige molekularbiologische Nachweismethoden zu erlernen. Während der Arbeit im Labor erlernte ich serologische Diagnostikmethoden (ELISA, IFT), Parasitenzucht, verschiedene DNA-Extraktionsmethoden, eine konventionelle und eine Real-Time PCR Methode. Um die anderen Aspekte wie Ätiologie, klinische Symptome und Therapie der Chagas-Erkrankung besser zu verstehen, durfte ich die Ambulanz des Instituts für Infektions- und Tropenmedizin des Krankenhauses Ramon y Cajal in Madrid besuchen.

Zudem war ich seit 2010 mehrmals in den Endemiegebieten in Südamerika und konnte vor Ort mit betroffenen Familien sprechen und deren Häuser besichtigen. In zahlreichen Gesprächen mit auf die Chagas-Erkrankung spezialisierten Ärztinnen und Ärzten konnte ich mein Verständnis für die Erkrankung vertiefen. Zudem wurde mir ein Besuch des *Cenetrop* in Santa Cruz, Bolivien, einem der größten Diagnostikzentren für tropische Erkrankungen in Südamerika, ermöglicht.

In München wurden sämtliche Empfehlungen der Expertinnen und Experten zusammengetragen. Es folgte eine eingehende Literaturrecherche zu den gängigen PCR-Methoden in der Diagnostik der Chagas-Erkrankung. Nachdem genügend Informationen gesammelt und die Gegebenheiten am Labor der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München berücksichtigt wurden, kristallisierten sich vier PCR-Methoden heraus, die schlussendlich auf deren Effizienz getestet, analysiert und verglichen wurden. Ebenfalls in den Vergleich miteingeflossen sind die Benutzerfreundlichkeit und die Kosten der einzelnen Methoden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Reagenz	Firma	Anwendungsbereich
Agarose GTQ ROTI®GAROSE	Carl Roth GmbH	PCR-1,2
Ampli Taq Gold®	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1,2
Ampli Taq Gold®	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1,2
Binding Buffer*	Roche Diagnostics GmbH	DNA-Isolierung
Blue Juice (Blaupuffer) 10x	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1,2
EDTA	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Vorbereitung der Blutproben für die DNA-Isolierung
Elution Buffer*	Roche Diagnostics GmbH	DNA-Isolierung
Ethanol absolut	Merck KGaA	Vorbereitung der Blutproben für die DNA-Isolierung
Fetale bovine serum (FBS)	Biochrom GmbH	Parasitenzüchtung
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium	PCR-1,2
GeneAmp® 10x PCR Gold Buffer+ MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1,2
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Vorbereitung der Blutproben für die DNA-Isolierung
Hepes	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Parasitenzüchtung
Inhibitor Removal Buffer*	Roche Diagnostics GmbH	DNA-Isolierung
Isopropanol (2-Propanol) absolut	AppliChem GmbH	DNA-Isolierung
Komponent A (darin enthalten: Puffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs, Taq-Polymerase)**	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4
Komponent B (Primer, Sonden)**	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4
Komponent C (Wasser)**	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4
Komponent NTC (no template-Kontrolle)**	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4

M199	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Parasitenzüchtung
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Parasitenzüchtung
NaOH 5 M	Sigma-Aldrich / Merck KGaA	Vorbereitung der Blutproben für die DNA-Isolierung
Natrium-Hypochlorid	Merck KGaA	Oberflächenreinigung und -desinfektion
Penicillin/Streptomycin (PS)	Biochrom GmbH	Parasitenzüchtung
Proteinase K*	Roche Diagnostics GmbH	DNA-Isolierung
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	DNA-Messung
Roche FastStart Universal Probe Master Mix (darin enthalten: FastStart Taq-Polymerase, Reaction Buffer, dNTPs, reference dye)	Roche Diagnostics GmbH	PCR-3
Steriles, zweifach destilliertes Wasser (Aqua bidest.)	H. Kerndl GmbH	Vorbereitung der Blutproben für die DNA-Isolierung
Tissue Lysis Buffer*	Roche Diagnostics GmbH	DNA-Isolierung
TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer 10x	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1,2
Wash Buffer*	Roche Diagnostics GmbH	DNA-Isolierung
Wasser Rotipuran®	Carl Roth GmbH	DNA-Isolierung, PCR-1,2,3

\* im High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche enthalten

\*\* im Trypanosoma cruzi-Kit der Firma DiaPro enthalten

### 3.1.2 Geräte

Bezeichnung	Firma
„BioPhotometer Plus“	Eppendorf AG
Drucker LBP-800	Canon GmbH
Gel-Kammer „40-0708“	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Gel-Kammer „40-1214“	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Handzentrifuge „Prism Mini“	Labnet International, Inc.
Heating Thermo Shaker „MHL20“	Hettich Benelux B.V.
Kamm für Agarose-Gel, 10 Taschen	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Kamm für Agarose-Gel, 25 Taschen	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Kühlschrank KT 1414	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank RR 16A	Siemens AG

Mikroskop „Standard 20“	Carl Zeiss Jena GmbH
Mikrowelle 8017 E	Privileg / Bauknecht Hausgeräte GmbH
Netzteil für Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Pipetten „Pipetman“ 2,5 µl, , 20 µl, 200 µl, 1.000 µl	Gilson, Inc.
Pipetten 10 µl	Eppendorf AG
Qubit® Fluorometer	Thermo Fisher Scientific GmbH
Schüttler (Vortex) „Genius 3“	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Schüttler (Vortex) „MS 2 Minishaker“	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Schüttler (Vortex) „MS 3 Basic“	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Thermocycler “C1000 CFX96”	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermocycler „TProfessional“	Biometra GmbH
Thermocycler „Uno II“	Biometra GmbH
Tiefkühlschrank GP 1456	Liebherr-International Deutschland GmbH
Tiefkühlschrank GS 15025	Liebherr-International Deutschland GmbH
Tiefkühlschrank KS155TA	AEG / Electrolux Hausgeräte GmbH
Transilluminator „S29 Nr98“	Bachofer
Ultraviolet Transilluminator	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH
Wasserbad „D8 / L“	HAAKE
Zentrifuge „EBA 12“	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Zentrifuge „Heraeus Biofuge Pico“	Thermo Fisher Scientific GmbH
Zentrifuge „Mikro 22 R“	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

### 3.1.3 Nukleotide

Reagenz	Firma	Anwendungsbereich
Desoxyribonukleotid Triphosphate (dNTP) Mix, 100 mM	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1, PCR-2
DNA Leiter 100 Basenpaare	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1, PCR-2
Komponent CTRL-H (hoch-Positivkontrolle)**	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4
Komponent CTRL-L (niedrig-Positivkontrolle)**	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4
Komponent I.C. (Internal Control)	Diagnostic Bioprobes Srl (DiaPro)	PCR-4
Primer 121	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1
Primer 122	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-1
Primer cruzi1	TIB MOLBIOL GmbH	PCR-3
Primer cruzi2	TIB MOLBIOL GmbH	PCR-3
Primer TczF	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-2
Primer TczR	Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH	PCR-2
TaqMan® Sonde cruzi3	TIB MOLBIOL GmbH	PCR-3

\*\* im Trypanosoma cruzi-Kit der Firma DiaPro enthalten

### 3.1.4 Probenmaterial

Folgendes Probenmaterial wurde für den Vergleich bei allen vier Methoden verwendet:

- Zuvor negativ getestetes EDTA-Blut von gesunden Individuen (Tropeninstitut München)  
Drei Proben von gesunden Erwachsenen, die mittels ELISA und IFAT negativ auf anti-*T. cruzi*-AK getestet wurden.
- Auf *T. cruzi* positiv getestetes EDTA-Blut von Patienten (ISCIII):  
50 Proben von Patientinnen und Patienten, die in den Jahren 2010, 2011 und 2013 am ISCIII in Spanien mittels ELISA, IFAT und PCR positiv getestet worden waren

- Auf *Leishmania spp.* und *Trypanosoma brucei brucei* positiv getestetes EDTA-Blut von Patienten (Tropeninstitut München):  
Am Tropeninstitut München positiv getestete Blutproben von Patientinnen und Patienten, welche mit folgenden Parasiten infiziert waren: *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major* und *Trypanosoma b. brucei*
- Kulturmaterial vom *T. cruzi*-Stamm Dm28 (ISCIII):  
Am ISCIII in Spanien gezüchtet und am Tropeninstitut München extrahiert
- Kulturmaterial von *T. rangeli* (Tropeninstitut München):  
Gezüchtet und extrahiert am Tropeninstitut München

### 3.1.5 Sonstiges Material

Bezeichnung	Firma
96-Well PCR Platte	Bio-Rad Laboratories GmbH
Einmalhandschuhe (Vasco Nitril light)	Braun / Procter & Gamble Service GmbH
Falcon-Tubes 20 ml und 50 ml	Sigma-Aldrich / Merck KGaA
Glasflaschen für Guanidin-HCl-EDTA	Herstellerefirma unbekannt
Klebefolie "Microseal" Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories GmbH
Sterile Einmalskalpelle	Braun / Procter & Gamble Service GmbH
Tubes 200 µl, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG
Tubes, 500 µl (für Qubit® Fluorometer)	Thermo Fisher Scientific GmbH

## 3.2 Methoden

Es wurden vier verschiedene PCR Methoden mit jeweils denselben Proben durchgeführt (siehe Tabelle 1) und anschließend die Ergebnisse unter anderem auf folgende Parameter miteinander verglichen:

Methoden	PCR Art	Target	Primer (Namen und Sequenzen)	Zyklen
PCR-1	konventionell	kDNA	<b>121:</b> 5'-AAA TAA TGT ACG GGK GAG ATG CAT GA-3' (wobei K=T oder G) <b>122:</b> 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'	35
PCR-2	konventionell	Sat-DNA	<b>TczF:</b> 5'-GCT CTT GCC CAC AMG GGT GC-3' (wobei M=A oder C) [modifiziert nach (54, 80)] <b>TczR:</b> 5'-CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG-3' [modifiziert nach (54, 80)]	40
PCR-3	Real-Time	Sat-DNA	<b>cruzi1:</b> 5'-AST CGG CTG ATC GTT TTC GA-3' (wobei S=G oder C) <b>cruzi2:</b> 5'-AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA-3' <b>cruzi3</b> (TaqMan®-Sonde): 5'-CAC ACA CTG GAC ACC AA-3' markiert am 5'-Ende mit 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) und BBQ-Quencher am 3'-Ende	45
PCR-4	Real-Time	Sat-DNA	kommerzielles Kit (Trypanosoma cruzi DNA der Firma DiaPro)	40

**Tabelle 1. Methoden.** Übersicht über die vier verglichenen PCR-Methoden

### 3.2.1 Intraassay (Intra)

Für die Ermittlung der Intraassay-Präzision wurde eine positive und eine negative Probe am ersten Tag der Evaluation im Dreifachansatz getestet.

### 3.2.2 Interassay I (Inter I) und Interassay II (Inter II)

Um die Intraassay-Präzision zu ermitteln, wurde dieselbe positive und dieselbe negative Probe, welche für die Intraassay-Präzision verwendet wurde, am zweiten (Inter I) und am dritten Tag (Inter II) im Einfachansatz untersucht.

### 3.2.3 Sensitivität (Sens)

Für die Sensitivität wurden 50 bekannt positive Proben von Patientinnen und Patienten getestet.

### 3.2.4 Detektionslimit (Limit of Detection; LOD)

Das LOD wurde als die minimale Anzahl an Target-Kopien, bei der noch mindestens 95% der Proben Positivität zeigen, festgelegt. Die Richtlinien der *Minimum Information for Publication of Quantitati-*

ve Real-Time PCR Experiments (MIQE) wurden für diese Definition berücksichtigt (81). Zur Bestimmung des LOD wurde Kulturmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28 aus der Zucht des ISCIII verwendet.

#### 3.2.4.1 Konventionelle PCR

Das  $1:10^{-7}$ -verdünnte Extrakt des *T. cruzi* Dm28-Stamms wurde protokollkonform in die beiden konventionellen PCRs eingesetzt (Lauf 1). Nach abgeschlossener Amplifikation und Elektrophorese im Agarose-Gel wurde die ca. 330-bp lange (PCR-1) bzw. die ca. 182-bp lange Bande (PCR-2) ausgeschnitten und mittels Zentrifugation bei  $9.000 \times g$  für 10 min purifiziert. Im Anschluss wurde eine DNA-Messung mittels Qubit® (Firma Life Technologies / Thermo Fisher Scientific GmbH) durchgeführt. Das Messergebnis wurde in eine Software zur Berechnung der Kopienzahl (c)/ $\mu\text{l}$  eingesetzt und anschließend so verdünnt, dass Dilutionen von  $10^6$  c/ $\mu\text{l}$  bis 0,0001 c/ $\mu\text{l}$  entstehen. Diese wurden nun als Template in die jeweilige PCR erneut eingesetzt und amplifiziert (Lauf 2). In einen dritten Lauf (Lauf 3) wurden die drei letzten Verdünnungen, bei denen in Lauf 2 noch Banden sichtbar waren und die erste Verdünnung, bei der in Lauf 2 keine Bande mehr sichtbar war, jeweils im 10-fach Ansatz eingesetzt und amplifiziert (82). Das LOD der jeweiligen PCR wurde dann definiert als die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch 10 von 10 Banden sichtbar waren.

#### 3.2.4.2 Real-Time PCR

Bei den beiden Real-Time PCR-Methoden PCR-3 und PCR-4 wurde sehr ähnlich vorgegangen, wie dies bei den konventionellen PCRs der Fall war. Das Amplifikat aus Lauf 1, welcher nach Protokoll durchgeführt wurde, wurde aber für eine Real-Time PCR untypisch ebenfalls in ein 2%-iges Agarosegel in TAE eingesetzt und nach der Elektrophorese, wie im Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben, purifiziert. Lauf 2 und Lauf 3 waren wieder protokollkonforme Läufe, wie beschrieben im Abschnitt 3.2.12. In Lauf 3 wurden die zwei letzten Verdünnungen, bei denen in Lauf 2 noch Fluoreszenz detektiert wurde und die erste Verdünnung, bei der in Lauf 2 keine Fluoreszenz mehr registriert werden konnte, jeweils im 10-fach Ansatz eingesetzt und amplifiziert. Das LOD der jeweiligen PCR wurde definiert als die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch 10 von 10 Ansätzen einer Verdünnungsstufe Fluoreszenz über dem Threshold zeigten.

#### 3.2.5 Spezifität Teil 1 (Spec)

Im ersten Teil der Spezifitätsanalyse wurden drei bekannt negative Patientenproben getestet.

#### 3.2.6 Spezifität Teil 2 (CR; Cross-reactivity)

Im zweiten Teil der Spezifitätsanalyse wurden potenziell kreuzreaktive Analyten untersucht. Es wurden dabei Blutproben von Nicht-Infizierten, die mit *T. rangeli* versetzt waren und Blutproben von

Patienten, die mit *T. b. brucei*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* und *Leishmania major* infiziert waren, untersucht.

### **3.2.7 Matrix (Mtx)**

Im Zuge der Matrix-Analyse zur Detektion von Inhibitionsfaktoren wurde eine bekannt negative Blutprobe mit Kulturmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28 (TcI) (83) versetzt. Anschließend wurde die nicht mit *T. cruzi* versetzte und die mit *T. cruzi* versetzte Probe untersucht.

### **3.2.8 Parasitenzucht**

*T. cruzi*: Das Kulturmaterial von *T. cruzi*-Stamm Dm28, welcher u.a. als Positivkontrolle und zur Bestimmung der LOD verwendet wurde, stammt aus der Zucht des ISCIII und wurde aus Spanien zugeschickt.

*T. rangeli*: *T. rangeli* aus der Stammsammlung des Tropeninstitut Münchens wurde auf M199-Nährmedium gezüchtet, mehrfach gesplittet und anschließend in Zählkammern ausgezählt. Bekannt negatives Blut wurde im Anschluss mit den Parasiten versetzt („gespiked“).

### **3.2.9 Vorbereitung der Proben für die DNA-Isolierung**

Die hier beschriebene Vorgehensweise entspricht der Standard Operating Procedure (SOP) mit dem Titel „Extraktion von DNA aus Blut für *Trypanosoma cruzi*-PCR“, Version 1 vom 28.04.2014 (Erstellung: Peter Seiringer; Prüfung: Carolin Mengele, PD Dr. Nicole Berens-Riha, Freigabe durch Laborleitung: Prof. Dr. Gisela Bretzel; Inkraftsetzung: Susanne Steidl), der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Zunächst wurden die Blutproben (Voll- bzw. EDTA-Blut) mit einer Lösung aus Guanidin-HCl-EDTA im Verhältnis 1:1 versetzt, für mindestens 12 Stunden inkubiert und anschließend für 15 Minuten in einem Wasserbad abgekocht. Dieses Vorgehen erfolgte zur Lyse und Inaktivierung des potenziell infektiösen Probenmaterials und zur partiellen Spaltung der kDNA-Minicircles (84-88).

### 3.2.9.1 Zubereitung der Lösung aus Guanidin-HCl-EDTA

Volumen / Masse der Reagenzien für **500 ml** Lösung:

Bezeichnung	Zustand	Volumen / Masse
NaOH 5 M	flüssig	25 ml
EDTA	Pulver	37,23 g
Guanidin-HCl	Pulver	286,58 g
Aqua bidest., steril	flüssig	< 500 ml

1. Die 25 ml NaOH 5 M wurden in 175 ml sterilem Aqua bidest. aufgelöst.
2. 37,23 g EDTA wurde zugegeben.
3. Die Lösung wurde zur Beschleunigung des Dilutionsprozesses auf 50 °C erhitzt.
4. Sobald das EDTA vollständig aufgelöst war, wurden 286,58 g Guanidin-HCl zugeben.
5. Nun wurde der Heizer ausgeschaltet, da es sich um eine endothermische Reaktion handelt.
6. Durch Zugabe von Aqua bidest. bzw. NaOH 5 M wurde der pH-Wert auf 8 nachjustiert und die Lösung anschließend gut gemischt.
7. Zuletzt wurde das Glasgefäß mit der Lösung in Alufolie eingewickelt, um den nötigen Lichtschutz zu gewähren. Die Konservierung erfolgte bei Raumtemperatur.

### 3.2.9.2 Vorgehensweise zur Vorbereitung der Proben (inklusive Extraktionskontrolle) für die DNA-Isolierung

1. Das gesamte Volumen an Vollblut bzw. EDTA-Blut wurde in ein leeres Falcon Tube (50 ml) umgefüllt und die Lösung aus Guanidin-HCl-EDTA im Verhältnis 1:1 zugegeben.  
Bsp.: 4,5 ml Guanidin-HCl-EDTA + 4,5 ml Vollblut
2. Als Extraktionskontrolle wurden 500 µl der Lösung aus Guanidin-HCl-EDTA in ein leeres Falcon Tube (50 ml) gefüllt und im Folgenden wie eine Patientenprobe behandelt.
3. Das Gemisch wurde gut gemischt und unter ständiger Agitation (z.B. am Schüttler) mindestens zwölf Stunden (oder über Nacht) bei Raumtemperatur zur Inkubation belassen, bis die Farbe der Mischung dunkelbraun war.
4. Das Falcon Tube wurde für 15 Minuten in kochendes Wasserbad bzw. in einen Topf mit kochendem Wasser gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Wasserspiegel im Wasserbad den Flüssigkeitspegel im Falcon Tube um mindestens 1,5 cm überragt.
5. Nach Abkühlung des Gemischs wurde mit der DNA-Isolierung fortgefahren. Wenn diese nicht direkt im Anschluss erfolgte, wurde das Material bei 2-8 °C konserviert.

Die Vorgehensweise in 3.2.9.1 und 3.2.9.2 wurden vom ISCIH empfohlen und in der Literatur bereits mehrmals beschrieben (84, 85).

*Anmerkung:* Die auf *L. spp.* positiv getesteten Proben wurden vor der DNA-Isolation nicht mit Guanidin-EDTA vorbehandelt, da die DNA zu einem früheren Zeitpunkt mit einem anderen Extraktionskit (Whole blood extraction kit, QUIAGEN) isoliert wurde. Die purifizierte DNA wurde nach der Extraktion bei  $\leq -20$  °C gelagert und für diese Untersuchung aufgetaut.

### 3.2.10 DNA-Isolierung

Die hier beschriebene Vorgehensweise entspricht ebenfalls der Standard Operating Procedure (SOP) mit dem Titel „Extraktion von DNA aus Blut für *Trypanosoma cruzi*-PCR“, Version 1 vom 28.04.2014 (Erstellung: Peter Seiringer; Prüfung: Carolin Mengele, PD Dr. Nicole Berens-Riha, Freigabe durch Laborleitung: Prof. Dr. Gisela Bretzel; Inkraftsetzung: Susanne Steidl), der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Nachdem die Vorbereitung der Proben abgeschlossen war (siehe 3.2.9), wurde Gesamt-DNA aus der hergestellten Vollblut-(bzw. EDTA-Blut)-Guanidin-HCl-Mischung extrahiert. Dazu wurde das „High Pure PCR Template Preparation“- Handbuch der Firma Roche (Version 20 von Oktober 2012); Protokoll 2.2 „Experimental overview (e.g., whole blood)“ in leicht abgeänderter und optimierter Form angewandt.

#### 3.2.10.1 Protokoll zur DNA-Isolierung

Nachdem die Reagenzien des „High Pure PCR Template Preparation“-Kits der Firma Roche nach erstmaliger Öffnung protokollgemäß vorbereitet wurden, konnte mit der DNA-Isolierung fortgefahren werden:

1. Das benötigte Volumen des Elution Buffers (100  $\mu$ l pro Probe) wurde in ein Eppendorf Tube (1,5 ml) aliquotiert und dieses bei 70 °C im Thermomixer inkubiert (nötig für Schritt 16.).
2. Pro zu extrahierender Probe wurden 40  $\mu$ l Proteinase K in ein Eppendorf Tube (1,5 ml) gefüllt.
3. 100  $\mu$ l Binding Buffer wurden hinzugefügt.
4. 300  $\mu$ l (Vollblut-/EDTA-Blut)-Guanidin-HCl-EDTA-Mischung wurden zugegeben.
5. Das Gemisch wurde im Anschluss für 15 Sekunden am Vortex geschüttelt, bei 70 °C im Thermomixer für 10 Minuten inkubiert und danach kurz abzentrifugiert.
6. Nun folgte die Zugabe von 100  $\mu$ l Isopropanol.
7. Abermals wurde das Gemisch am Vortex für 15 Sekunden geschüttelt, anschließend kurz abzentrifugiert und in ein High Pure Filter Tube (mit Collection Tube) gefüllt.
8. Das Gemisch wurde bei 8.000 x g (z.B. Heraeus Biofuge pico 9200 rpm) für 1 Minute zentrifugiert. Zudem wurde das Filter Tube in neues Collection Tube gestellt und das soeben verwendete Collection Tube (mit Filtrat) verworfen.
9. Es folgte die Zugabe von 500  $\mu$ l Inhibitor Removal Buffer.

10. Im Anschluss wurde das Gemisch abermals bei 8.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Das Filter Tube wurde danach in ein neues Collection Tube gestellt und das soeben verwendete Collection Tube (mit Filtrat) verworfen.
11. Die Zugabe von 500 µl Wash Buffer folgte.
12. Eine Zentrifugation bei 8.000 x g für 1 Minute wurde durchgeführt, im Anschluss das Filter Tube in ein neues Collection Tube gestellt und das soeben verwendete Collection Tube (mit Filtrat) verworfen.
13. 500 µl Wash Buffer wurden zugegeben.
14. Erneut wurde bei 8.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Nun wurde jedoch nur das Filtrat verworfen und das Filter Tube in das soeben verwendete Collection Tube zurückgestellt.
15. Eine Zentrifugation bei 13.000 x g (z.B. Heraeus Biofuge pico 11700 rpm) für 10 Sekunden folgte, bevor das Filter Tube in ein neues Eppendorf Tube (1,5 ml bzw. 2 ml) gestellt und das soeben verwendete Collection Tube (mit Filtrat) verworfen wurde.
16. Die bei 70 °C inkubierten 100 µl Elution Buffer wurden jetzt zugegeben.
17. Eine Zentrifugation bei 8.000 x g für 1 Minute folgte.
18. Das Filtertube wurde verworfen. Nun befand sich die purifizierte Nukleinsäure im Eppendorf Tube und konnte in die PCR als sogenanntes „Template“ eingesetzt werden.

#### 3.2.10.2 Lagerung der DNA-Extrakte

Sofern die DNA-Extrakte nicht direkt nach der Isolation für die PCR verwendet wurden, wurden sie im Tropeninstitut München in Aliquots auf  $\leq -20$  °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

#### 3.2.10.3 Qualitätskontrolle der DNA-Isolierung

Es wurde nach jeder DNA-Isolierung die mitgeführte Extraktionskontrolle in mindestens eine der PCRs eingesetzt, um Kontaminationen in einem der verwendeten Reagenzien auszuschließen.

### 3.2.11 Konventionelle PCRs

Die Amplifikation der Proben in PCR-1 und PCR-2 wurden in einem TProfessional Standard-Thermocycler (Firma Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die PCR Produkte dieser beiden Methoden wurde durch Elektrophorese in einem 2%-igen Agarosegel in TAE-Puffer durchgeführt. Für die Herstellung des Gels wurden, je nach Größe der Gelkammer, 3,0 g Agarose mit 150 ml TAE-Puffer bzw. 1,5 g Agarose mit 75 ml TAE-Puffer vermischt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt, um den Dilutionsprozess zu unterstützen. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurden, je nach Volumen des TAE-Puffers (150 ml oder 75 ml), 15 µl oder 7,5 µl Gelred™ hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurde das Gel in eine Kammer gegossen und einer bis vier Kämme mit jeweils zehn bis 25 Taschen („Wells“) hineingesteckt. Nachdem das Gel erstarrt war, wurden die Kämme entnommen, welche kleine Einkerbungen im Gel zurückließen, in die nun die amplifizierten Proben, welche zuvor noch im Verhältnis 1:10 mit Blaupuffer (Firma Life Technologies GmbH) vermischt worden waren, pipettiert wurden.

Im Anschluss folgte eine Elektrophorese für ca. 30-60 min (je nach Spannung und Größe der Kammer) bei 80-100 mV.

#### 3.2.11.1 PCR-1

Reagenz	Volumen	Konzentration Gebrauchslösung	Endkonzentration
Wasser steril, zweifach destilliert	48,40 µl		
Ampli Taq Gold Buffer ®	7,50 µl	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	6,00 µl	25 mM	2,00 mM
Primer 121	1,00 µl	25 µM	0,33 µM
Primer 122	1,00 µl	25 µM	0,33 µM
dNTPs	0,60 µl	25 mM	0,20 mM
Ampli Taq Gold ®	0,50 µl	5 U/µl	0,03 U/µl
Mastermix Volumen	65 µl		
Template Volumen	10 µl		
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>75 µl</b>		

Die Primer 121-122 binden an die konservierte Region des kDNA-Minircircles und amplifizieren ein ca. 330 Basenpaar (bp) langes Stück der variablen Region des kDNA-Minircircles (53, 89, 90).

Schritt	Temperatur	Dauer	Bezeichnung
1	95 °C	5 min	Initiale Denaturierung
2	35x 64 °C	1 min	Denaturierung
3		1 min	Annealing
4		1 min	Elongation
5	72 °C	10 min	Finale Elongation

### 3.2.11.2 PCR-2

Das Protokoll wurde der Arbeit von Schijman et al. entnommen und den Gegebenheiten im Tropeninstitut München angepasst (91).

Reagenz	Volumen	Konzentration Gebrauchslösung	Endkonzentration
Wasser steril, zweifach destilliert	36,20 µl		
Ampli Taq Gold Buffer ®	5,00 µl	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	6,00 µl	25 mM	3 mM
Primer TczF	1,00 µl	25 µM	0,50 µM
Primer TczR	1,00 µl	25 µM	0,50 µM
dNTPs	0,50 µl	25 mM	0,25 mM
Ampli Taq Gold ®	0,30 µl	5 U/µl	0,0333 U/µl
Mastermix Volumen	50 µl		
Template Volumen	10 µl		
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>60 µl</b>		

Die Primer TczF-TczR amplifizieren ein ca. 182-bp langes Stück der 195-bp langen *Short Tandem Repeat* Sequenz der Sat-DNA (80, 91).

Schritt	Temperatur	Dauer	Bezeichnung
1	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
2	40x 68 °C	45 s	Denaturierung
3		1 min	Annealing
4		72 °C	1 min
5	72 °C	10 min	Finale Elongation

### 3.2.12 Real-Time PCR

Die Amplifikation der Proben in PCR-1 und PCR-2 wurden in einem CFX C1000 Real-Time Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) durchgeführt.

Die Datenanalyse erfolgte mit der CFX Manager Software Version 2.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

#### 3.2.12.1 PCR-3

Das Protokoll wurde der Arbeit von Schijman *et al.* entnommen und den Gegebenheiten im Tropeninstitut München angepasst (91).

Reagenz	Volumen	Konzentration Gebrauchslösung	Endkonzentration
Wasser steril, zweifach destilliert	6,25 µl		
FastStart Universal Probe Master (ROX) ®	10,00 µl	2x	1x
Primer cruzi1	0,75 µl	20 µM	0,75 µM
Primer cruzi2	0,75 µl	20 µM	0,75 µM
TaqMan® Sonde cruzi3	0,25 µl	20 µM	0,25 µM
Mastermix Volumen	18 µl		
Template Volumen	2 µl		
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>		

Die Primer cruzi1 und cruzi2 amplifizieren ein 166-bp langes Stück der 195-bp langen „tandem repeat“ Sequenz der Sat-DNA (80, 92, 93).

Schritt	Temperatur	Dauer	Bezeichnung
1	95 °C	15 min	Initiale Denaturierung
2	95 °C	10 s	Denaturierung
3	54 °C	1 min	Annealing

Die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus mit 54 °C gemessen und von der Software automatisch aufgezeichnet.

### 3.2.12.2 PCR-4

PCR-4 war ein kommerzielles Kit der Firma DiaPro aus Italien. Die genauen Inhalte und Konzentrationen der Reagenzien waren uns nicht bekannt.

Reagenz	Volumen
Mastermix (Komponent A)	12,50 µl
Primer/Sonden (Komponent B)	2,00 µl
Internal Control (Komponent I.C.)	0,50 µl
MG Water (Komponent C)	5,00 µl
Mastermix Volumen	20 µl
Template Volumen	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

Die Primer amplifizieren ein Stück der Sat-DNA.

Schritt	Temperatur	Dauer	Bezeichnung
1	50 °C	2 min	Initiale Denaturierung
2	95 °C	10 min	
2	40x	95 °C	Denaturierung
3		60 °C	Annealing

Die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus mit 60 °C gemessen und von der Software automatisch aufgezeichnet.

### 3.2.13 Qualitätskontrollen

Es wurden in jedem der Läufe adäquate Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt, um Kontaminationen bzw. Inhibitionsfaktoren auszuschließen.

### 3.2.14 Threshold

Der Threshold (dt. „Schwelle“) bezeichnet den Kreuzungspunkt einer Amplifikationskurve und der durch den Untersucher festgelegten Threshold-Linie. Die Höhe der Threshold-Linie wird in relative fluorescence units (RFU) angegeben und wurde in der vorliegenden Untersuchung auf 50 RFU festgesetzt.

### 3.2.15 Datenauswertung

Alle Daten wurden anonym ausgewertet. Die Berechnungen erfolgten mit MS Excel (Version 14.0.7188.5002).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Übersicht

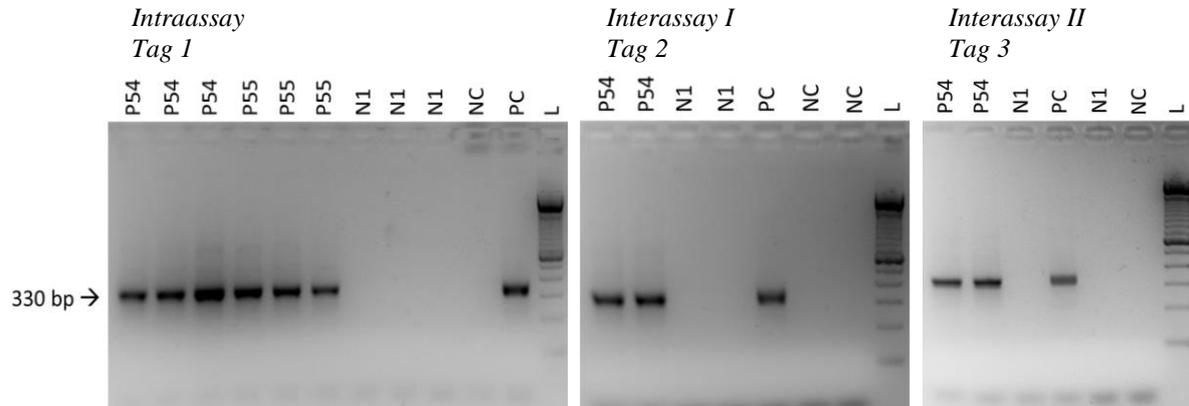
	Konventionell						Real-Time					
	PCR-1			PCR-2			PCR-3			PCR-4		
<b>Primer</b>	121-122			TczF-TczR			cruzi1-cruzi2			Dia.Pro kit		
<b>Target</b>	kDNA			Sat-DNA			Sat-DNA			Sat-DNA		
<b>Intra</b>	Tasche 1 pos	Tasche 2 pos	Tasche 3 pos	Tasche 1 pos	Tasche 2 pos	Tasche 3 pos	Tasche 1 Cq=38,72	Tasche 2 Cq=37,02	Tasche 3 Cq=35,40	Tasche 1 Cq=30,06	Tasche 2 Cq=28,80	Tasche 3 Cq=30,08
<b>Inter 1</b>	pos			pos			Cq=36,66			Cq=29,98		
<b>Inter 2</b>	pos			pos			Cq=36,55			Cq=29,81		
<b>Sens (n=50)</b>	50/50 pos			47/50 pos			45/50 pos			49/50 pos		
<b>LOD</b>	relativ 40 Kopien/µl	absolut 400 Kopien		relativ 40 Kopien/µl	absolut 400 Kopien		relativ 20 Kopien/µl	absolut 40 Kopien		relativ 2 Kopien/µl	absolut 10 Kopien	
<b>Spec (n=3)</b>	3/3 neg			3/3 neg			3/3 neg			3/3 neg		
<b>CR (n=7)</b>	1/7 pos			1/7 pos			1/7 pos			1/7 pos		
<b>Mtx</b>	pos			pos			pos			pos		

**Tabelle 2. Ergebnisse.** Übersicht der Ergebnisse der vier PCR-Methoden. *Intra, Intraassay. Inter 1, Interassay I. Inter 2, Interassay II. Sens, Sensitivität. LOD, Detektionslimit (Limit of Detection). Spec, Spezifität Teil 1. CR, Spezifität Teil 2 (Untersuchung potenziell kreuzreaktiver Analyten). Mtx, Matrixeffekt.*

## 4.2 Intra- und Interassay

### 4.2.1 PCR-1

121-122



**Abbildung 5. Intra- und Interassay.** Es wurden zwei bekannt positive (P54 und P55) und eine bekannt negative Probe (N1) jeweils im Dreifach-Ansatz am ersten Tag (Intraassay) und jeweils im Zweifachansatz am zweiten und dritten Tag untersucht. Ein Einfachansatz am zweiten und dritten Tag wäre laut Richtlinien des Studienlabors ebenfalls möglich gewesen. *NC, Negativkontrolle. PC, Positivkontrolle. L, 100 bp Leiter.*

Bei den bekannt positiven Proben kam es zu einer deutlichen Amplifikation, bei den bekannt negativen zu keiner Amplifikation.

Mittelwert Intraassay (Anzahl an +-Zeichen, Erläuterung sh. 4.3.1.1): 4,00 (Standardabweichung SD = 0,00)

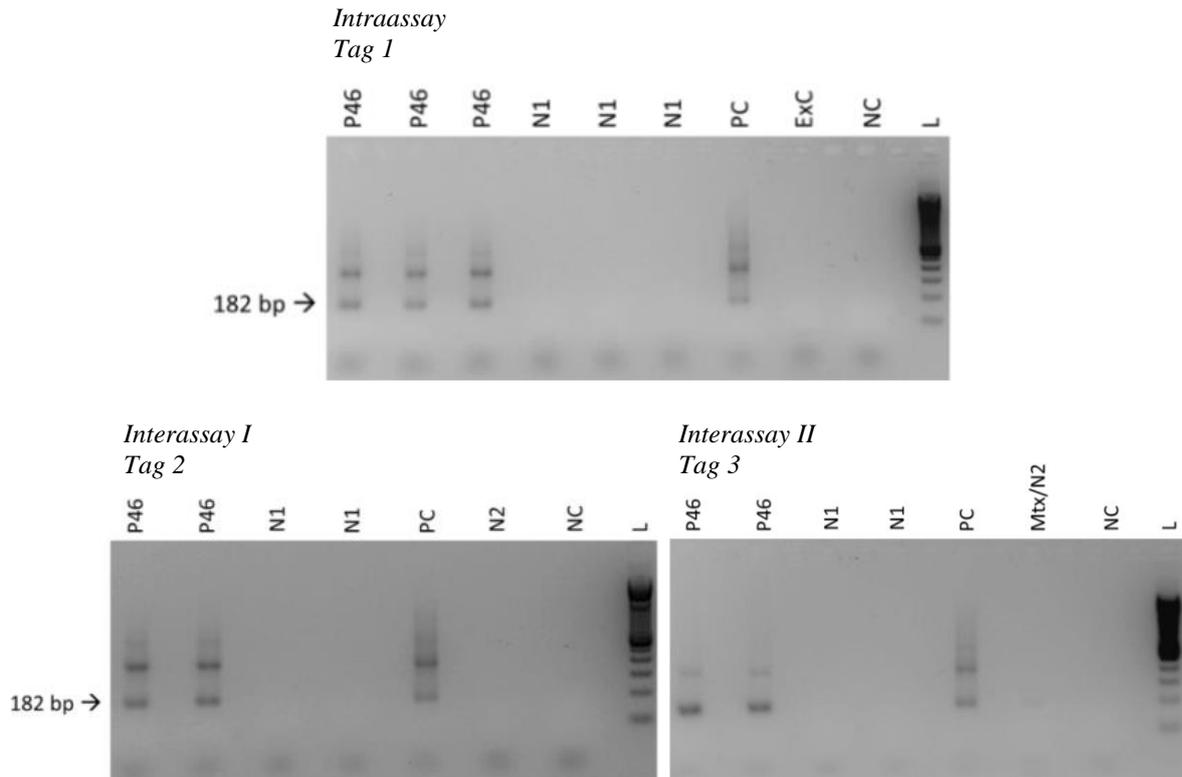
Mittelwert Interassay I (Anzahl an +-Zeichen); 4,00 (SD=0,00)

Mittelwert Interassay II (Anzahl an +-Zeichen): 4,00 (SD = 0,00)

Mittelwert Intra- und Intraassays (I+II) gesamt (Anzahl an +-Zeichen): 4,00 (SD = 0,00)

#### 4.2.2 PCR-2

TczF-TczR



**Abbildung 6. Intra- und Interassay.** Es wurde eine bekannt positive (P46) und eine bekannt negative Probe (N1) jeweils im Dreifach-Ansatz am ersten Tag (Intraassay) und jeweils im Zweifachansatz am zweiten und dritten Tag untersucht. Ein Einfachansatz am zweiten und dritten Tag wäre laut Richtlinien des Studienlabors ebenfalls möglich gewesen.

Zusätzlich wurde eine weitere negative Probe (N2) im Einfachansatz am zweiten Tag und die gleiche Probe, versetzt mit dem verdünnten DNA-Extrakt ( $10^{-9}$ ) von positivem Parasitenmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28 (Mtx/N2), am dritten Tag untersucht.

NC, Negativkontrolle. PC, Positivkontrolle. L, 100 bp Leiter.

Bei den bekannt positiven Proben kam es zu einer deutlichen Amplifikation, bei den bekannt negativen zu keiner Amplifikation.

Mittelwert Intraassay (Anzahl an +-Zeichen, Erläuterung sh. 4.3.1.1): 2,00 (Standardabweichung SD = 0,00)

Mittelwert Interassay I (Anzahl an +-Zeichen): 2,00 (SD = 0,00)

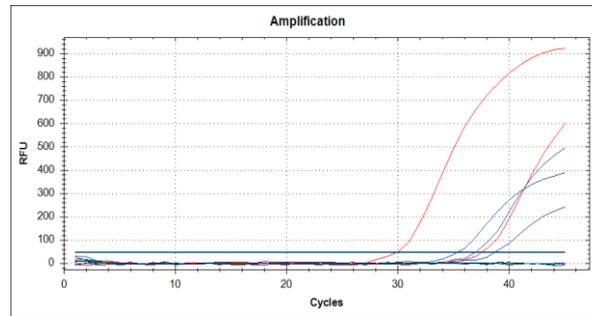
Mittelwert Interassay II (Anzahl an +-Zeichen): 2,00 (SD = 0,00)

Mittelwert Intra- und Intraassays (I+II) gesamt (Anzahl an +-Zeichen): 2,00 (SD = 0,00)

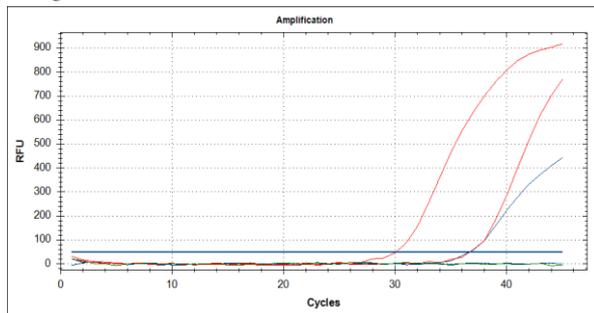
### 4.2.3 PCR-3

cruzi1-cruzi2

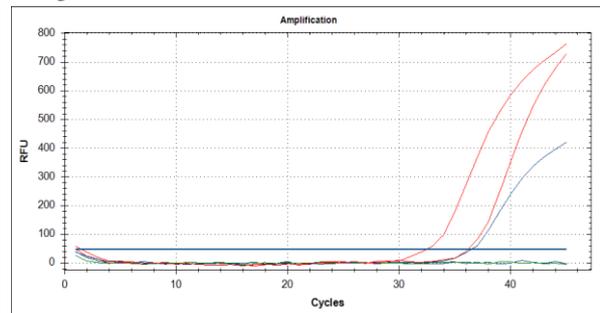
*Intraassay  
Tag 1*



*Interassay I  
Tag 2*



*Interassay II  
Tag 3*



**Abbildung 7. Intra- und Interassay.** Es wurde eine bekannt positive (P45) und eine bekannt negative Probe (N1) jeweils im Dreifach-Ansatz am ersten Tag (Intraassay) und jeweils im Einfachansatz am zweiten (Interassay I) und dritten (Interassay II) Tag untersucht. *Blaue Amplifikationskurven, bekannt positive Probe. Graue Amplifikationskurven (nicht sichtbar), bekannt negative Probe. Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold (Cq=50 RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

Bei der bekannt positiven Probe kam es zu einer Amplifikation, bei der bekannt negativen zu keiner Amplifikation.

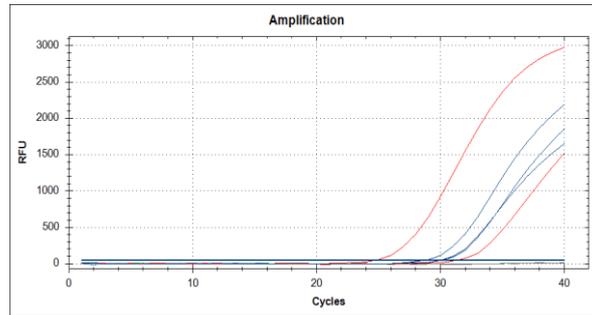
Mittelwert Intraassay: 37,05 (Standardabweichung SD = 1,36)

Mittelwert Intra- und Intraassays (I+II) gesamt: 37,31 (SD = 1,00)

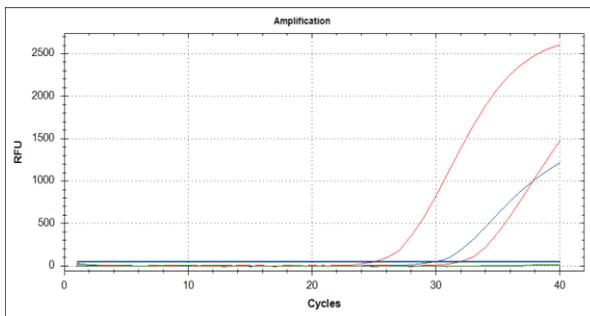
#### 4.2.4 PCR-4

DiaPro

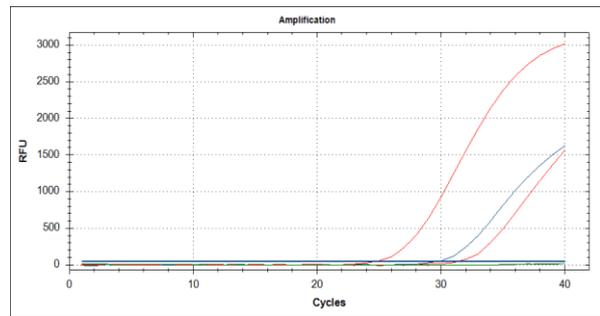
*Intraassay  
Tag 1*



*Interassay I  
Tag 2*



*Interassay II  
Tag 3*



**Abbildung 8. Intra- und Interassay.** Es wurde eine bekannt positive (P45) und eine bekannt negative Probe (N1) jeweils im Dreifach-Ansatz am ersten Tag (Intraassay) und jeweils im Einfachansatz am zweiten (Interassay I) und dritten (Interassay II) Tag untersucht. *Blaue Amplifikationskurven, bekannt positive Probe. Graue Amplifikationskurven (nicht sichtbar), bekannt negative Probe. Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold ( $C_q=50$  RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

Bei der bekannt positiven Probe kam es zu einer Amplifikation, bei der bekannt negativen zu keiner Amplifikation.

Mittelwert Intraassay: 29,65 (Standardabweichung SD = 0,60)

Mittelwert Intra- und Intraassays (I+II) gesamt: 29,95 (SD = 0,10)

## 4.3 Sensitivität

### 4.3.1 Untersuchung von 50 bekannt positiven Proben

#### 4.3.1.1 Übersicht

Probe	Jahr	PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4
		121-122	TczF-TczR	Roche	DiaPro
P1	2010	++	++	34,17	32,27
P2	2010	+	+	35,51	35,50
P3	2010	++	+	32,27	32,37
P4	2011	+	++	35,03	33,53
P5	2011	+++	++	30,25	30,70
P6	2011	(+)	+	N/A	34,63
P7	2011	+++	++	34,41	35,90
P8	2011	+++	++	32,42	30,79
P9	2011	(+)	+	36,59	33,13
P10	2011	++	+	34,44	31,72
P11	2011	+++	++	31,46	29,26
P12	2011	++	++	34,91	31,35
P13	2011	++	+	35,25	33,24
P14	2011	+	-	39,37	33,47
P15	2011	+	+	35,20	33,28
P16	2011	++	++	33,31	32,14
P17	2011	+++	++	28,12	25,56
P18	2011	+	+	36,16	31,69
P19	2011	+	-	N/A	39,39
P20	2011	(+)	(+)	N/A	37,99
P21	2011	+++	++	28,46	25,95
P22	2011	+	++	N/A	35,35
P23	2013	+	-	N/A	N/A
P24	2013	+	++	35,12	31,43
P25	2013	++	++	35,78	33,25
P26	2013	(+)	++	33,97	35,13
P27	2013	++++	++	28,87	32,24
P28	2013	++++	++	29,48	30,95
P29	2013	+++	++	30,22	27,51
P30	2013	+++	++	29,11	26,66
P31	2013	+++	++	30,57	31,22
P32	2013	+++	++	30,47	28,26
P33	2013	+++	++	27,77	27,43
P34	2013	+++	+	30,45	28,02
P35	2013	+++	++	30,50	27,96
P36	2013	+++	+	30,05	28,13
P37	2013	++++	++	28,15	27,02

<b>P38</b>	2013	+++	++	35,10	35,34
<b>P39</b>	2013	++++	++	29,44	27,18
<b>P40</b>	2013	++++	++	31,26	32,98
<b>P41</b>	2013	++++	++	31,24	29,00
<b>P42</b>	2013	++++	++	28,45	27,09
<b>P43</b>	2013	++++	+++	29,06	27,42
<b>P44</b>	2013	++	++	31,65	30,95
<b>P45</b>	2013	++	++	31,22	29,73
<b>P46</b>	2013	++	++	31,18	29,62
<b>P47</b>	2013	++++	++	30,08	27,25
<b>P48</b>	2013	++++	++	34,08	32,68
<b>P49</b>	2013	++++	+++	29,87	27,48
<b>P50</b>	2013	+++	+++	29,56	27,50
Median 2010		2,00	1,00	34,17	32,37
[IQR]		[1,00;2,00]	[1,00;2,00]	[32,27;35,51]	[32,27;35,50]
(95% CI)		(1,00-2,00)	(1,00-2,00)	(32,27-35,51)	(32,27-35,50)
Median 2011		2,00	2,00	34,44	33,13
[IQR]		[1,00;3,00]	[1,00;2,00]	[31,46;35,25]	[30,79;34,63]
(95% CI)		(1,00-3,00)	(1,00-2,00)	(31,63-35,24)	(31,18-33,87)
Median 2013		3,00	2,00	30,45	28,26
[IQR]		[2,25;4,00]	[2,00;2,00]	[29,44;31,26]	[27,43;31,43]
(95% CI)		(3,00-4,00)	(2,00-2,00)	(29,56-31,22)	(27,50-30,97)
Median		3,00	2,00	31,24	31,22
[IQR]		[1,00;3,00]	[1,00;2,00]	[29,72;34,68]	[27,74;33,25]
(95% CI)		(2,00-3,00)	(2,00-2,00)	(30,33-33,71)	(29,31-32,27)

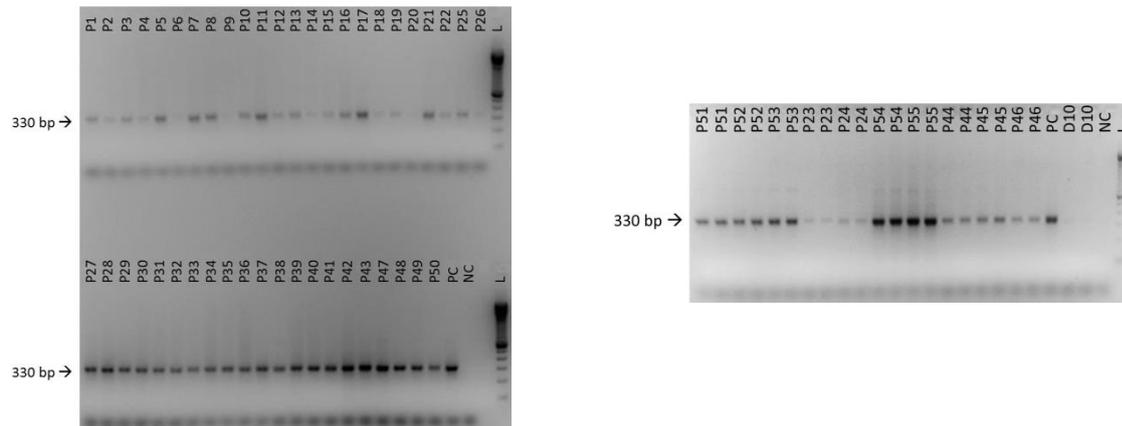
**Tabelle 3. Sensitivität.** Intensität der Bandendicke unter UV-Licht nach Elektrophorese: sehr schwach (+), schwach ++, moderat ++, stark +++ und sehr stark +++++. Mediane, Interquartilsabstände und Konfidenzintervalle wurden für PCR-1 und PCR-2 mittels der Anzahl der +-Zeichen berechnet: (+)=0,50; +=1,00; ++=2,00; +++=3,00; +++++=4,00. Die Berechnung für PCR-3 und PCR-4 erfolgte auf Basis der Cq-Werte (MS Excel, Version 14.0.7188.5002). Es wurden die Mediane der Jahre, in denen die Proben entnommen wurden (2010, 2011, 2013) einzeln und kumulativ (gesamt) bestimmt. Cq-Werte bei einem Threshold von 50 RFU mit der verwendeten CFX Manager Software Version 2.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). *CI*, Konfidenzintervall. *IQR* (interquartile range), Interquartilsabstand. *Jahr*, Jahr der Probenentnahme. *N/A*, not applicable (kein Wert). *RFU*, relative fluorescence units.

Beim Vergleich der Bandendicke bzw. der Thresholds der Jahre 2011 und 2013 (Anzahl der Proben aus 2010 für die statistische Auswertung nicht ausreichend) fielen statistisch signifikante Unterschiede auf ( $p < 0,05$ ). Die Intensität der Banden war signifikant geringer bei Proben aus 2011 im Vergleich zu 2013 (Methode 1:  $p = 0,0003$ ; Methode 2:  $p = 0,0032$ , Wilcoxon ranksum (Mann-Whitney) Test). Der Threshold war signifikant niedriger im Jahr 2013 im Vergleich zu 2011 (Methode 3:  $p = 0,0044$ ; Methode 4:  $p = 0,0033$ , Wilcoxon ranksum (Mann-Whitney) Test).

Es sei erwähnt, dass in Tabelle 3 bei PCR-1 und PCR-2 die Amplifikation umso stärker war, je höher der Mittelwert bzw. die Anzahl an +-Zeichen angegeben wurde. Bei PCR-3 und PCR-4 jedoch bedeutet ein niedrigerer C<sub>q</sub>-Wert eine stärkere Amplifikation.

#### 4.3.1.2 PCR-1

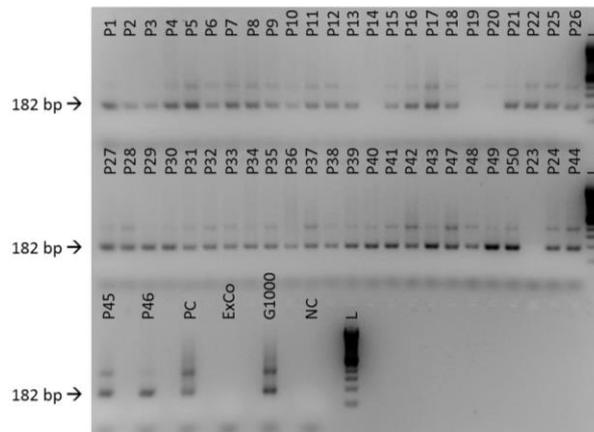
121-122



**Abbildung 9. Sensitivität.** Es wurden 55 bekannt positive Proben (P1-P55) untersucht. Sämtliche Proben konnten mit den verwendeten Primern amplifiziert werden und waren nach der Elektrophorese unter dem UV-Licht sichtbar. Da von den Proben 51-55 zu wenig Material für die restlichen PCR-Läufe vorhanden war, wurden diese in der Analyse nicht berücksichtigt. *PC*, Positivkontrolle. *NC*, Negativkontrolle. *D10*, extrahierte DNA des *T. cruzi*-Stamms *Dm28* in Verdünnung ( $10^{-10}$ ). *L*, 100 bp Leiter.

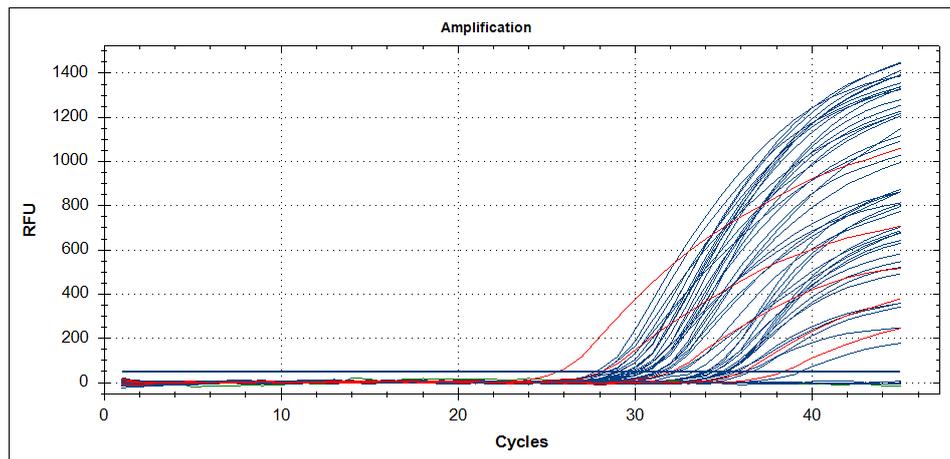
#### 4.3.1.3 PCR-2

TczF-TczR



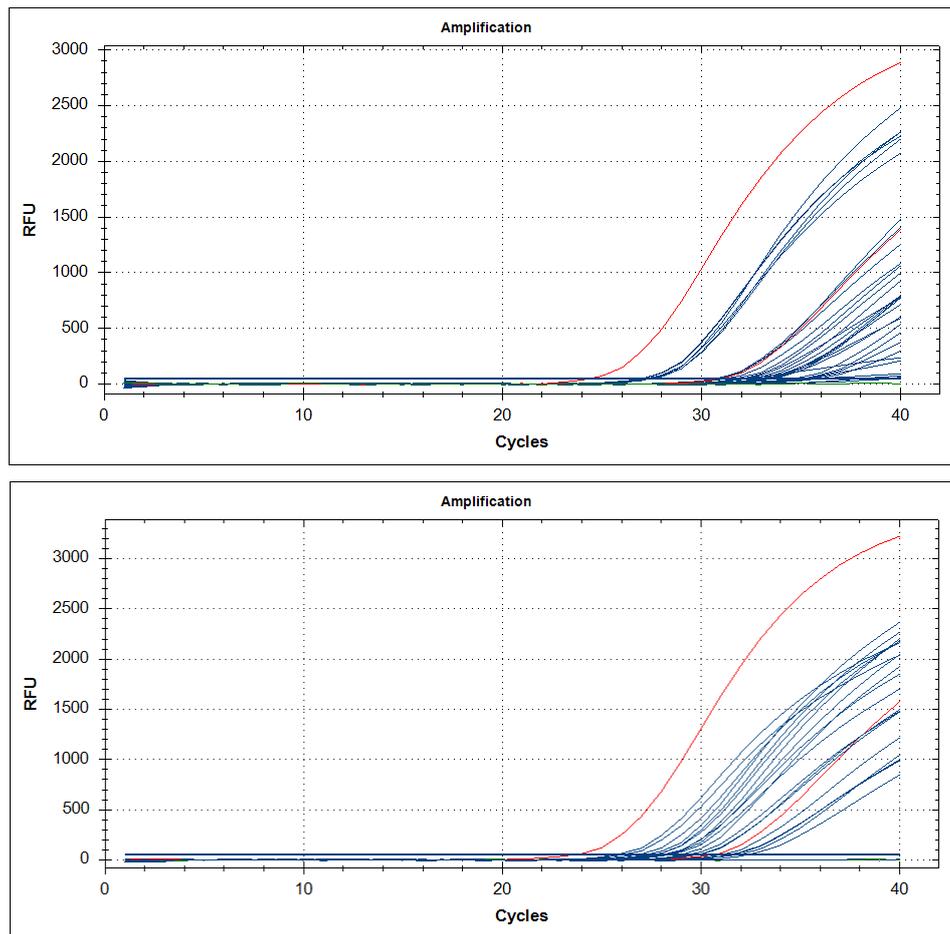
**Abbildung 10. Sensitivität.** Es wurden 50 bekannt positive Proben (P1-P50) untersucht. Drei Proben konnten mit den verwendeten Primern nicht amplifiziert werden (P14, P19 und P23). *PC*, Positivkontrolle. *NC*, Negativkontrolle. *G1000*, extrahierte *T. cruzi*-DNA einer mit 1000 Parasiten/ml versetzten, nicht infizierten Blutprobe. *ExCo*, Extraktionskontrolle. *L*, 100 bp Leiter.

#### 4.3.1.4 PCR-3 cruzi1-cruzi2



**Abbildung 11. Sensitivität.** Es wurden 50 bekannt positive Proben untersucht. Fünf Proben konnten mit den verwendeten Primern nicht amplifiziert werden (P6, P19, P20, P22 und P23). *Blaue Amplifikationskurven, bekannt positive Proben. Rote Amplifikationskurven, titrierte Positivkontrollen. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold (Cq=50 RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

#### 4.3.1.5 PCR-4 DiaPro

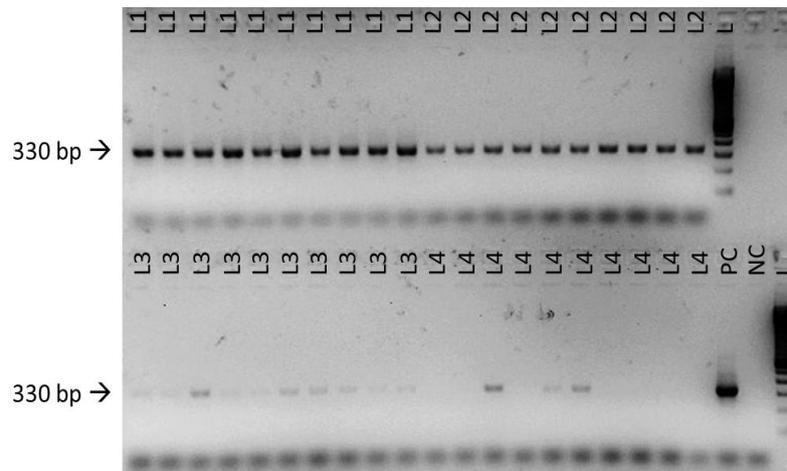


**Abbildung 12. Sensitivität.** Es wurden 50 bekannt positive Proben (P1-P50) in zwei Läufen untersucht. Die Amplifikationskurven der ersten 30 Proben sind auf der oberen, die restlichen 20 Proben auf der unteren Grafik dargestellt. Eine Probe konnten mit den verwendeten Primern nicht amplifiziert werden (P23). *Blaue Amplifikationskurven, bekannt positive Proben. Rote Amplifikationskurven, titrierte Positivkontrollen. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold ( $Cq=50$  RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

## 4.3.2 Bestimmung des Detektionslimits

### 4.3.2.1 PCR-1

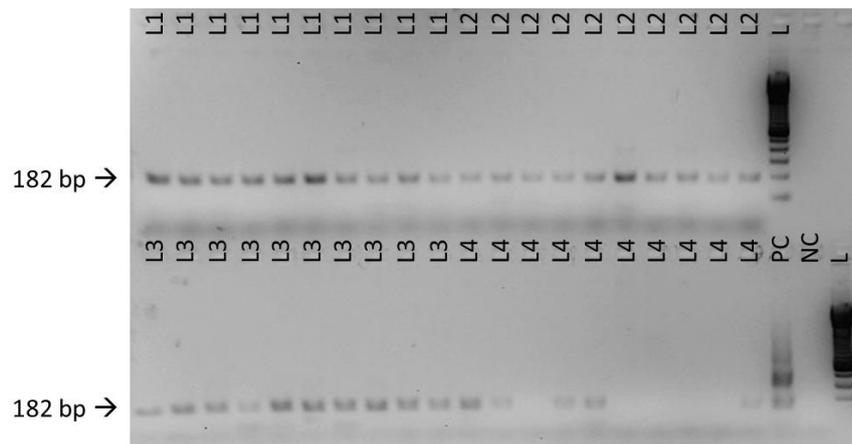
121-122



**Abbildung 13. Detektionslimit (Limit of Detection).** Es wurden purifizierte Amplifikate des *T. cruzi*-Stamms Dm28 mit Hilfe einer DNA-Fluoreszenzmessung und einer Software quantifiziert, sodass die Kopienzahl des Targets im Template bekannt war. Dieses wurde anschließend mehrmals jeweils im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt und im Zehnfachansatz in die PCR eingesetzt. Als LOD wurde die letzte Verdünnungsstufe definiert, bei der 10 von 10 Proben ein positives Ergebnis zeigen. Bei den hier verwendeten Primern ist dies bei 40 Kopien/ $\mu$ l der Fall. *L1*, 4.000 Kopien/ $\mu$ l. *L2*, 400 Kopien/ $\mu$ l. *L3*, 40 Kopien/ $\mu$ l. *L4*, 4 Kopien/ $\mu$ l. *PC*, Positivkontrolle. *NC*, Negativkontrolle. *L*, 100 bp Leiter.

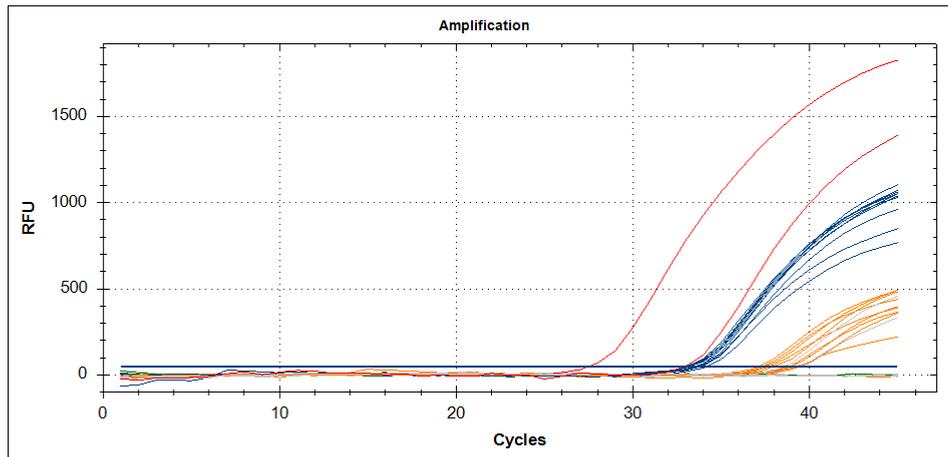
#### 4.3.2.2 PCR-2

TczF-TczR



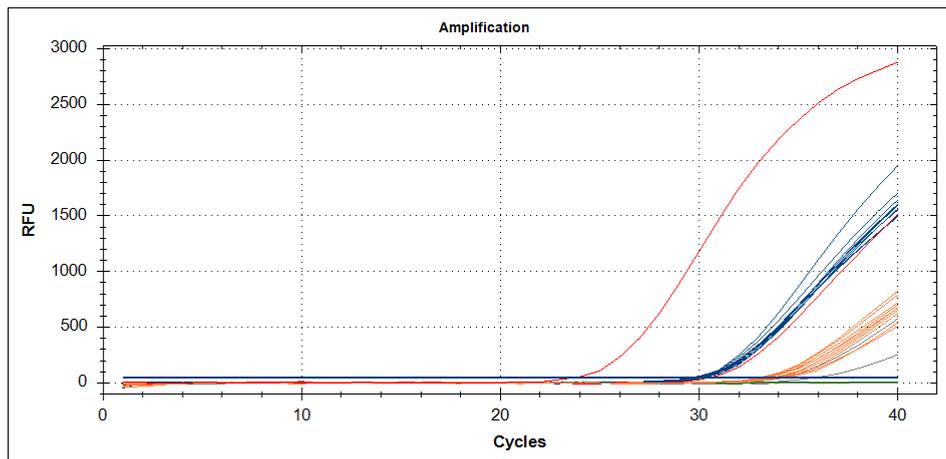
**Abbildung 14. Detektionslimit (Limit of Detection).** Es wurden purifizierte Amplifikate des *T. cruzi*-Stamms Dm28 mit Hilfe einer DNA-Fluoreszenzmessung und einer Software quantifiziert, sodass die Kopienzahl des Targets im Template bekannt war. Dieses wurde anschließend mehrmals jeweils im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt und im Zehnfachansatz in die PCR eingesetzt. Als LOD wurde die letzte Verdünnungsstufe definiert, bei der 10 von 10 Proben ein positives Ergebnis zeigen. Bei den hier verwendeten Primern ist dies bei bei 40 Kopien/ $\mu$ l der Fall. L1, 4.000 Kopien/ $\mu$ l. L2, 400 Kopien/ $\mu$ l. L3, 40 Kopien/ $\mu$ l. L4, 4 Kopien/ $\mu$ l. PC, Positivkontrolle. NC, Negativkontrolle. L, 100 bp Leiter.

#### 4.3.2.3 PCR-3 cruzi1-cruzi2



**Abbildung 15. Detektionslimit (Limit of Detection).** Es wurden purifizierte Amplifikate des *T. cruzi*-Stamms Dm28 mit Hilfe einer DNA-Fluoreszenzmessung und einer Software quantifiziert, sodass die Kopienzahl des Targets im Template bekannt war. Dieses wurde anschließend mehrmals jeweils im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt und im Zehnfachansatz in die PCR eingesetzt. Als LOD wurde die letzte Verdünnungsstufe definiert, bei der 10 von 10 Proben ein positives Ergebnis zeigen. Bei den hier verwendeten Primern ist dies bei 20 Kopien/ $\mu\text{l}$  der Fall. *Blaue Amplifikationskurven*, 200 Kopien/ $\mu\text{l}$ . *Orange Amplifikationskurven*, 20 Kopien/ $\mu\text{l}$ . *Graue Amplifikationskurven* (teils nicht sichtbar), 2 Kopien/ $\mu\text{l}$ . *Rote Amplifikationskurven*, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. *Grüne Amplifikationskurve* (nicht sichtbar), Negativkontrolle. *Blaue waagrechte Linie*, Threshold ( $C_q=50$  RFU). RFU, Relative fluorescence units.

#### 4.3.2.4 PCR-4 DiaPro

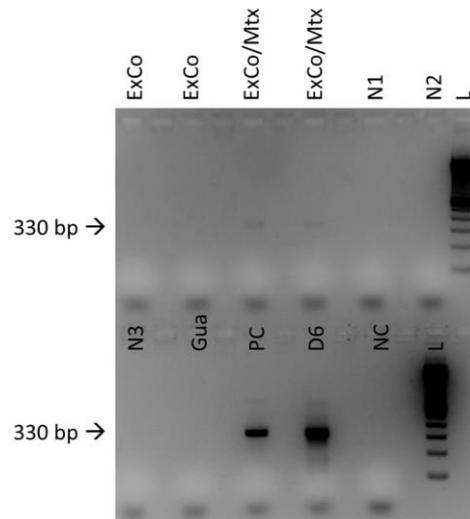


**Abbildung 16. Detektionslimit (Limit of Detection).** Es wurden purifizierte Amplifikate des *T. cruzi*-Stamms Dm28 mit Hilfe einer DNA-Fluoreszenzmessung und einer Software quantifiziert, sodass die Kopienzahl des Targets im Template bekannt war. Dieses wurde anschließend mehrmals jeweils im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt und im Zehnfachansatz in die PCR eingesetzt. Als LOD wurde die letzte Verdünnungsstufe definiert, bei der 10 von 10 Proben ein positives Ergebnis zeigen. Bei den hier verwendeten Primern ist dies bei 2 Kopien/ $\mu\text{l}$  der Fall. *Blaue Amplifikationskurven, 20 Kopien/ $\mu\text{l}$ . Orange Amplifikationskurven, 2 Kopien/ $\mu\text{l}$ . Graue Amplifikationskurven (teils nicht sichtbar), 0,2 Kopien/ $\mu\text{l}$ . Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold ( $C_q=50$  RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

## 4.4 Spezifität

### 4.4.1 Untersuchung von bekannt negativen Proben

#### 4.4.1.1 PCR-1 121-122

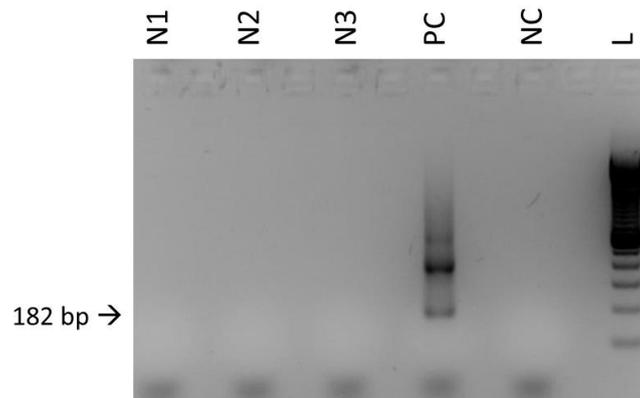


**Abbildung 17. Spezifität – Teil 1.** Im ersten Teil der Spezifitätsanalyse wurden drei bekannt negative Blutproben von gesunden Individuen untersucht (N1-N3). Keine der Proben zeigte eine Amplifikation. Es wurden außerdem die Extraktionskontrolle (ExCo), die mit Parasitenmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28 in Verdünnung ( $10^{-10}$ ) aufgestockte Extraktionskontrolle (ExCo/Mtx) und die Lösung aus Guanidin-EDTA (Gua) untersucht. PC, Positivkontrolle. D6, extrahierte DNA des *T. cruzi*-Stamms Dm28 in Verdünnung ( $10^{-6}$ ). NC, Negativkontrolle. L, 100 bp Leiter.

In keiner der untersuchten Proben konnte DNA amplifiziert werden. Der erste Teil der Spezifitätsanalyse mit den Primern 121-122 weist somit das erwartete Ergebnis auf.

#### 4.4.1.2 PCR-2

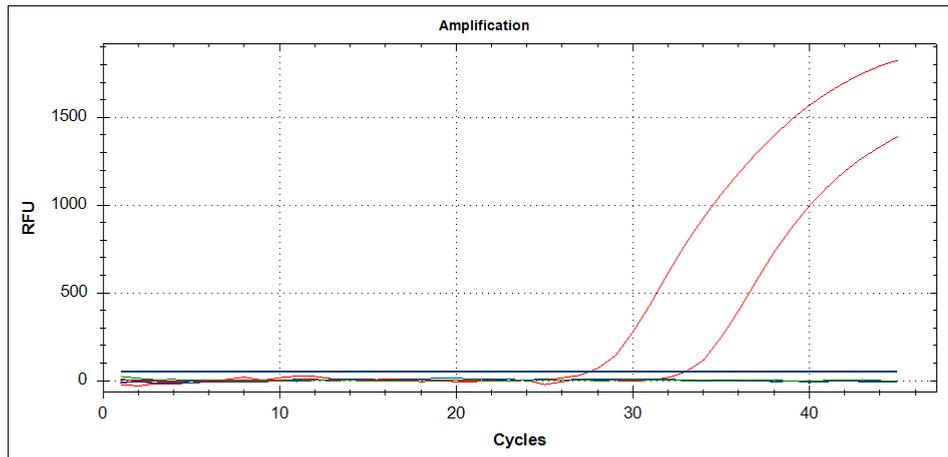
TczF-TczR



**Abbildung 18. Spezifität – Teil 1.** Im ersten Teil der Spezifitätsanalyse wurden drei bekannt negative Blutproben von gesunden Individuen untersucht (N1-N3). Keine der Proben zeigte eine Amplifikation, das erwartete Ergebnis konnte somit erzielt werden. *PC*, *Positivkontrolle*. *NC*, *Negativkontrolle*. *L*, *100 bp Leiter*.

In keiner der untersuchten Proben konnte DNA amplifiziert werden. Der erste Teil der Spezifitätsanalyse mit den Primern TczF-TczR weist somit das erwartete Ergebnis auf.

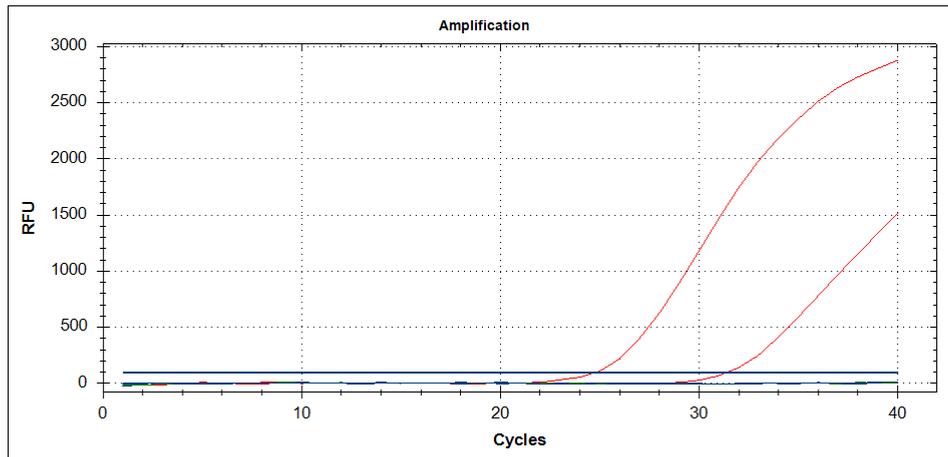
#### 4.4.1.3 PCR-3 cruzi1-cruzi2



**Abbildung 19. Spezifität – Teil 1.** Im ersten Teil der Spezifitätsanalyse wurden drei bekannt negative Blutproben von gesunden Individuen untersucht (N2-N4). *Blaue Amplifikationskurven (nicht sichtbar), bekannt negative Proben. Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold (C<sub>q</sub>=50 RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

In keiner der untersuchten Proben konnte DNA amplifiziert werden. Der erste Teil der Spezifitätsanalyse mit den Primern *cruzi1-cruzi2* weist somit das erwartete Ergebnis auf.

#### 4.4.1.4 PCR-4 DiaPro

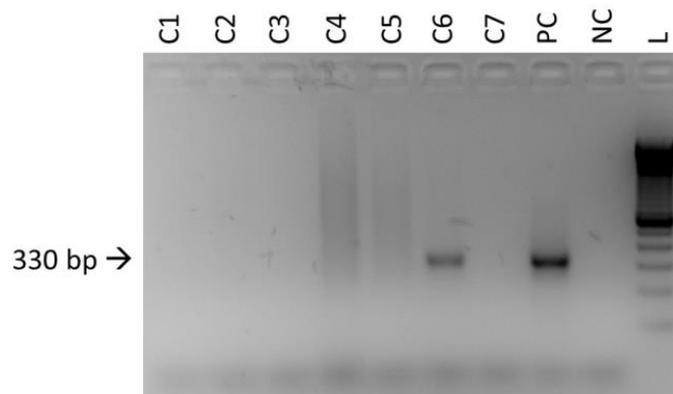


**Abbildung 20. Spezifität – Teil 1.** Im ersten Teil der Spezifitätsanalyse wurden drei bekannt negative Blutproben von gesunden Individuen untersucht (N2-N4). Keine der Proben zeigte eine Amplifikation, das erwartete Ergebnis konnte somit erzielt werden. *Blaue Amplifikationskurven (nicht sichtbar), bekannt negative Proben. Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold (C<sub>q</sub>=50 RFU). RFU, Relative fluorescence units.*

In keiner der untersuchten Proben konnte DNA amplifiziert werden. Der erste Teil der Spezifitätsanalyse mit den Primern der Firma DiaPro weist somit das erwartete Ergebnis auf.

## 4.4.2 Untersuchung von potenziell kreuzreaktiven Analyten

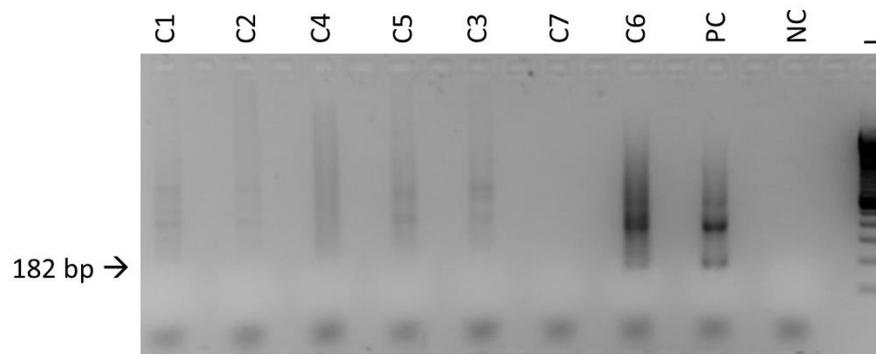
### 4.4.2.1 PCR-1 121-122



**Abbildung 21. Spezifität – Teil 2.** Im zweiten Teil der Spezifitätsanalyse wurden potenziell kreuzreaktive Analyten untersucht. Es konnte lediglich bei der nicht infizierten Blutprobe, welche mit *T. rangeli* in hoher Konzentration ( $10^6$  Parasiten/ml) versetzt war (C6) eine *T. cruzi*-spezifische Amplifikation beobachtet werden. Die übrigen Proben konnten mit den verwendeten Primern nicht amplifiziert werden. Somit muss bei Patientinnen und Patienten, welche aus einem Endemiegebiet kommen, in dem sowohl *T. cruzi* also auch *T. rangeli* endemisch sind, genau abgeklärt werden, welcher Parasit sich im Blutkreislauf befindet. C1, *Leishmania tropica*, C2, *Leishmania donovani*, C3, *Leishmania infantum*. C4, *Leishmania braziliensis*. C5, *Leishmania maior*. C6, *T. rangeli*. C7, *T. brucei brucei*. PC, Positivkontrolle. NC, Negativkontrolle. L, 100 bp Leiter.

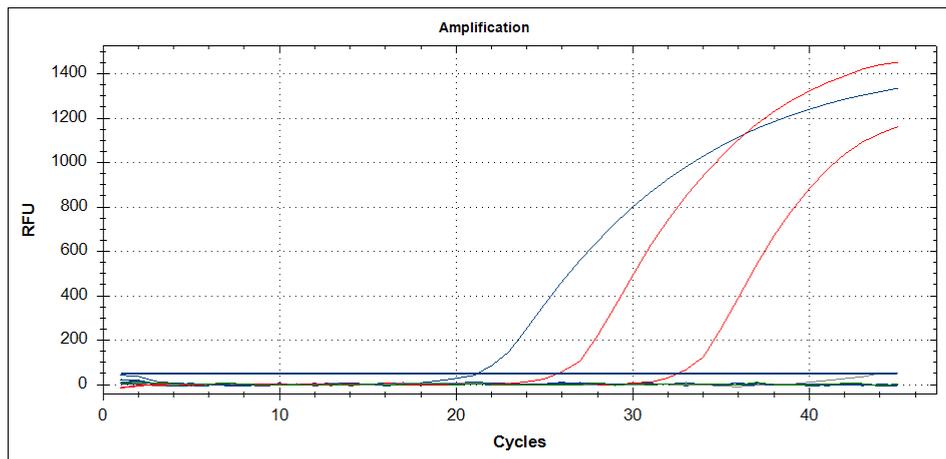
#### 4.4.2.2 PCR-2

TczF-TczR



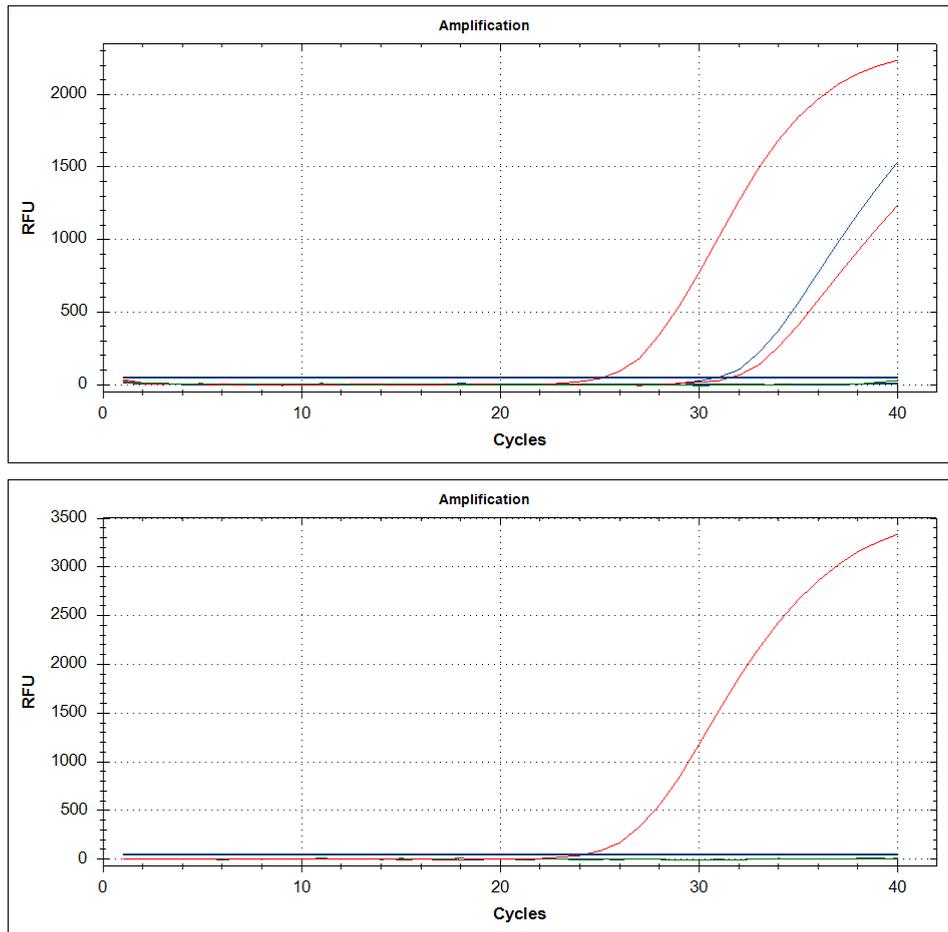
**Abbildung 22. Spezifität – Teil 2.** Im zweiten Teil der Spezifitätsanalyse wurden potenziell kreuzreaktive Analyten untersucht. Es konnte lediglich bei der nicht infizierten Blutprobe, welche mit *T. rangeli* in hoher Konzentration ( $10^6$  Parasiten/ml) versetzt war (C6) eine *T. cruzi*-spezifische Amplifikation beobachtet werden. Bei den übrigen Proben konnte mit den verwendeten Primern keine (C7, C4) bzw. eine schwache, *T. cruzi*-unspezifische Amplifikation (C1, C2, C3, C5) beobachtet werden. Somit muss auch bei Verwendung dieser Primer bei Patientinnen und Patienten, welche aus einem Endemiegebiet kommen, indem sowohl *T. cruzi* also auch *T. rangeli* endemisch sind, genau abgeklärt werden, welcher Parasit sich im Blutkreislauf befindet. C1, *Leishmania tropica*, C2, *Leishmania donovani*, C3, *Leishmania infantum*. C4, *Leishmania braziliensis*. C5, *Leishmania maior*. C6, *T. rangeli*. C7, *T. brucei brucei*. PC, Positivkontrolle. NC, Negativkontrolle. L, 100 bp Leiter.

#### 4.4.2.3 PCR-3 cruzi1-cruzi2



**Abbildung 23. Spezifität – Teil 2.** Im zweiten Teil der Spezifitätsanalyse wurden potenziell kreuzreaktive Analyten untersucht (*Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania maior*, *T. rangeli*, *T. brucei brucei*). Es konnte lediglich bei der nicht infizierten Blutprobe, welche mit *T. rangeli* versetzt war, eine *T. cruzi*-spezifische Amplifikation beobachtet werden (blaue Amplifikationskurve, die den Threshold überschreitet). Bei den übrigen Proben konnte mit den verwendeten Primern keine *T. cruzi*-unspezifische Amplifikation beobachtet werden. Somit muss bei Verwendung dieser Primer bei Patientinnen und Patienten, welche aus einem Endemiegebiet kommen, indem sowohl *T. cruzi* also auch *T. rangeli* endemisch sind, genau abgeklärt werden, welcher Parasit sich im Blutkreislauf befindet. Blaue Amplifikationskurven (teilweise nicht sichtbar), nicht infizierte Blutproben, welche mit potenziell kreuzreaktivem Material versetzt wurden. Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle. Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold ( $Cq=50$  RFU). RFU, Relative fluorescence units.

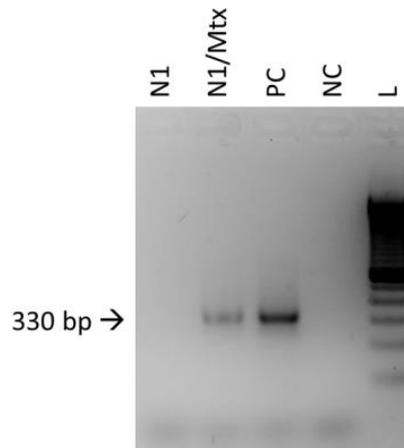
#### 4.4.2.4 PCR-4 DiaPro



**Abbildung 24. Spezifität – Teil 2.** Im zweiten Teil der Spezifitätsanalyse wurden potenziell kreuzreaktive Analyten untersucht (*Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania maior*, *T. rangeli* im oberen, *T. brucei brucei* im unteren Bild). Es konnte lediglich bei der nicht infizierten Blutprobe, welche mit *T. rangeli* versetzt war, eine *T. cruzi*-spezifische Amplifikation beobachtet werden (blaue Amplifikationskurve auf dem oberen Bild, die den Threshold überschreitet). Bei den übrigen Proben konnte mit den verwendeten Primern keine *T. cruzi*-unspezifische Amplifikation beobachtet werden. Somit muss bei Verwendung dieser Primer bei Patientinnen und Patienten, welche aus einem Endemiegebiet kommen, indem sowohl *T. cruzi* also auch *T. rangeli* endemisch sind, genau abgeklärt werden, welcher Parasit sich im Blutkreislauf befindet. Blaue Amplifikationskurven (teilweise nicht sichtbar), nicht infizierte Blutproben, welche mit potenziell kreuzreaktivem Material versetzt wurden. Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle (im unteren Bild nur Hochpositivkontrolle). Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle. Blaue waagrechte Linie, Threshold ( $C_q=50$  RFU). RFU, Relative fluorescence units.

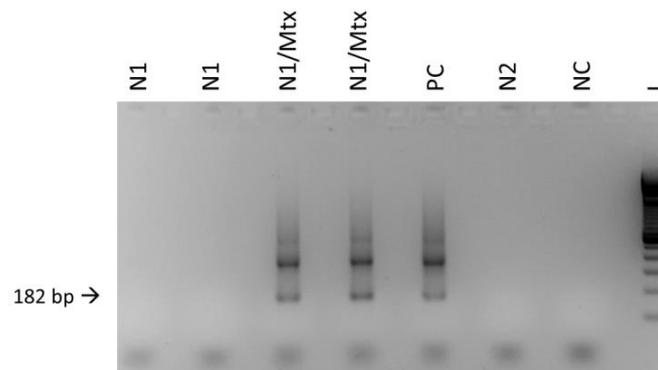
## 4.5 Matrixeffekt

### 4.5.1.1 PCR-1 121-122



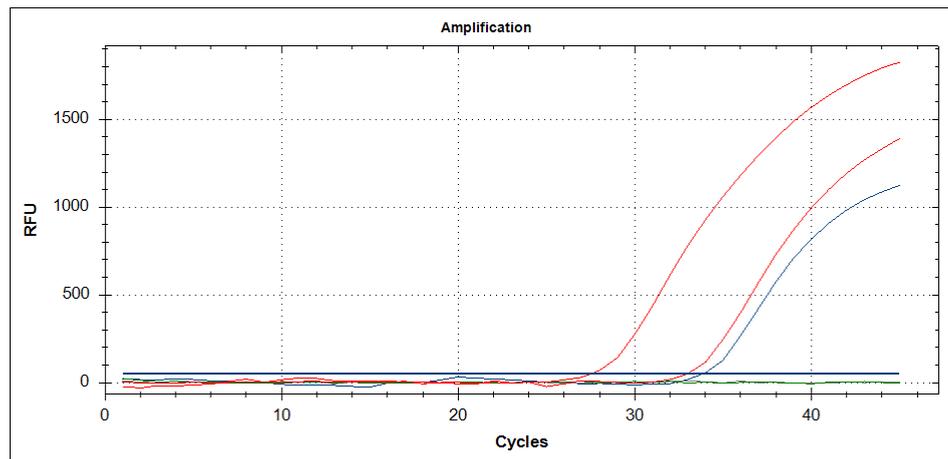
**Abbildung 25. Matrixeffekt.** Bei der Analyse des Matrixeffektes wurden eine bekannt negative Probe eines gesunden Individuums (N1) und dieselbe Probe, versetzt mit Kulturmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28 (N1/Mtx), getestet. Das Ergebnis fiel wie erwartet aus, weshalb inhibierende Faktoren in der PCR ausgeschlossen werden konnten. *PC*, Positivkontrolle. *NC*, Negativkontrolle. *L*, 100 bp Leiter.

### 4.5.1.2 PCR-2 TczF-TczR



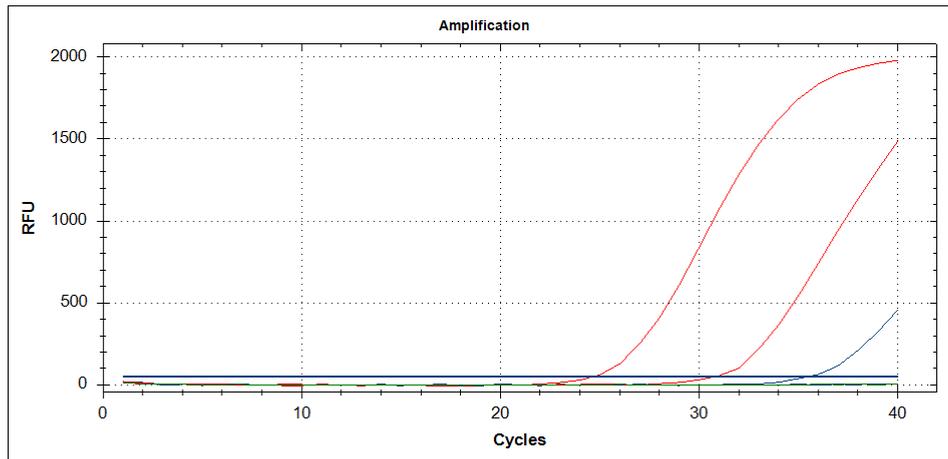
**Abbildung 26. Matrixeffekt.** Bei der Analyse des Matrixeffektes wurden eine bekannt negative Probe eines gesunden Individuums (N1) und dieselbe Probe, versetzt mit Kulturmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28 (N1/Mtx), im Zweifachansatz getestet. Zusätzlich wurde hier eine weitere bekannt negative Probe (N2) getestet. Das Ergebnis fiel wie erwartet aus, weshalb inhibierende Faktoren in der PCR ausgeschlossen werden konnten. *PC*, Positivkontrolle. *NC*, Negativkontrolle. *L*, 100 bp Leiter.

#### 4.5.1.3 PCR-3 cruzi1-cruzi2



**Abbildung 27. Matrixeffekt.** Bei der Analyse des Matrixeffektes wurden eine bekannt negative Probe eines gesunden Individuums und dieselbe Probe, versetzt mit Kulturmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28, getestet. Wie erwartet fand in der negativen Probe keine Amplifikation statt, in der mit Kulturmaterial versetzten Probe jedoch schon. Inhibierende Faktoren in der PCR konnten somit ausgeschlossen werden. *Blaue Amplifikationskurve, nicht infizierte Blutprobe, welche mit Kulturmaterial des T. cruzi-Stamms Dm28 versetzt wurde.* *Graue Amplifikationskurve (nicht sichtbar), negative Blutprobe.* *Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle.* *Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle.* *Blaue waagrechte Linie, Threshold (Cq=50 RFU).* RFU, Relative fluorescence units.

#### 4.5.1.4 PCR-4 DiaPro



**Abbildung 28. Matrixeffekt.** Bei der Analyse des Matrixeffektes wurden eine bekannt negative Probe eines gesunden Individuums und dieselbe Probe, versetzt mit Kulturmaterial des *T. cruzi*-Stamms Dm28, getestet. Wie erwartet fand in der negativen Probe keine Amplifikation statt, in der mit Kulturmaterial versetzten Probe jedoch schon. Inhibierende Faktoren in der PCR konnten somit ausgeschlossen werden. *Blaue Amplifikationskurve, nicht infizierte Blutprobe, welche mit Kulturmaterial des T. cruzi-Stamms Dm28 versetzt wurde.* *Graue Amplifikationskurve (nicht sichtbar), negative Blutprobe.* *Rote Amplifikationskurven, Hoch- und Niedrigpositivkontrolle.* *Grüne Amplifikationskurve (nicht sichtbar), Negativkontrolle.* *Blaue waagrechte Linie, Threshold (Cq=50 RFU).* *RFU, Relative fluorescence units.*

## 5 Diskussion

### 5.1 Serologie vs. PCR

Nach wie vor gilt die Serologie auf Grund ihrer hohen Sensitivität als Goldstandard bei der Diagnostik der Chagas-Erkrankung. Jedoch bringen serologische Testverfahren einige Nachteile mit sich:

In der Serologie werden die Erreger im Blut indirekt über die Antikörper, die der Körper gegen sie bildet, nachgewiesen. Es dauert nach dem Eintritt der Trypanosomen in den Körper einige Wochen, bis die Antikörper gebildet bzw. nachweisbar sind. In dieser Zeit fallen serologische Tests falsch negativ aus, während direkte (Mikroskop) und molekularbiologische Nachweismethoden (PCR) ein positives Ergebnis zeigen. Unabhängig von der Präsenz bzw. Anzahl der Parasiten bleiben die Antikörper im Blut der Patienten oft über Jahre bis Jahrzehnte nachweisbar. Für die Quantifizierung der Parasiten im Wirt bzw. die Überwachung des Therapieerfolgs sind serologische Tests demnach nicht geeignet.

Ein weiteres Problem ist die Kreuzreaktivität mit anderen Gattungen der *Trypanosomatida*, wie zum Beispiel *Leishmania spp.* bzw. mit anderen Arten von *Trypanosoma*, wie zum Beispiel dem apathogenen *T. rangeli*. Bei einer Infektion mit diesen Parasiten zeigt die Serologie ebenfalls falsch-positive Ergebnisse für das Vorhandensein von anti-*T. cruzi*-Antikörpern an. Des Weiteren können Antikörper von infizierten Müttern auf deren Kinder übertragen werden. Diese maternalen Antikörper reagieren mit den serologischen Tests und zeigen ein falsch-positives Ergebnis bei den Neugeborenen an. Vorteile und Anwendungsbereiche der PCR wurden bereits im Abschnitt 1.7 besprochen.

### 5.2 Probenvorbereitung und DNA-Isolation

#### 5.2.1 Probenvorbereitung

Da gezeigt werden konnte, dass das Prozessieren der Blutproben wie zuvor beschrieben (Versetzen mit Guanidin-HCl-EDTA und anschließendes Aufkochen) einen positiven Effekt auf das PCR-Outcome hat, wurde dieses Procedere ebenfalls angewandt (84-88, 91). Die Lyse der Parasiten und das damit einhergehende Ende der Infektiosität des Materials, die mögliche Lagerung bei Raumtemperatur und die erhöhte Stabilität der DNA über einen längeren Zeitraum sind weitere Vorteile, die die Probenvorbereitung mit sich bringt.

#### 5.2.2 DNA-Isolierung

Das High Pure PCR Template Preparation Kit (Firma Roche) wurde bereits mehrmals zuvor erfolgreich angewandt (88, 91, 92) und vom ISCIH empfohlen. Verglichen mit anderen Extraktionskits weist es einige Unterschiede auf, auf Grund deren das DNA-Produkt am Ende der Isolation laut Ex-

pertinnen und Experten eine höhere Reinheit aufweist (Konversation mit Dr. Maria Flores-Chavez, ISCIII). Zu den Besonderheiten dieses Protokolls zählen die Inkubation bei 70 °C für 10 min, das Hinzufügen von Isopropanol und Inhibitor Removal Buffer und die zweimalige Applikation von Wash Buffer.

### **5.3 Auswahl der zu vergleichenden PCR-Methoden**

Es wurden bereits zahlreiche Studien über PCR-Methoden zur Detektion von *T. cruzi* publiziert. Wir haben uns auf die Empfehlungen des ISCIII und die Arbeit von Schijman et al. (91) konzentriert, welche einen Überblick über die wichtigsten und gängigsten PCR-Methoden, die zurzeit angewandt werden, beinhaltet und diskutiert. Es wurden vier Methoden ausgewählt, welche auf Performance, Benutzerfreundlichkeit und Kosten analysiert und miteinander verglichen wurden.

#### **5.3.1 PCR-1**

Diese PCR wurde vom ISCIII empfohlen und ebenda von mir unter Anleitung von Dr. Flores-Chavez erlernt. Die gute Performance dieser Methode konnte bereits 1994 von Wincker et al. gezeigt werden (90). Die Primer 121-122 binden an den konstanten Abschnitt der kDNA Minicircles und amplifizieren deren komplette variable Region. Das DNA-Stück, das dabei amplifiziert wird, ist ca. 330 bp lang. Da jeder kDNA Minicircle vier, im 90°-Winkel voneinander entfernte, konstante Regionen besitzt, zwischen denen die variablen Regionen liegen, entstehen pro kDNA Minicircle bei Wahl der Primer 121-122 vier Amplifikate (53, 89, 94). Daraus lässt sich schließen, dass die Anzahl an Minicircles pro Parasit, multipliziert mit vier, die Anzahl der Target-Kopien pro Parasit darstellt. Die Angaben zur Anzahl an kDNA Minicircles pro Parasit sind aber in der Literatur sehr unterschiedlich und reichen von 5.000 bis zu 30.000, wodurch sich eine genaue Anzahl an Target-Kopien pro Parasit (20.000-120.000) nicht genau bestimmen lässt (53, 80, 85, 93-95). Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass sich die Sensitivität der PCR durch die hohe Anzahl an Kopien innerhalb eines Parasiten stark erhöht. Diese PCR ist außerdem vergleichsweise günstig und weist eine sehr hohe Sensitivität auf. Unter den vier getesteten PCRs schnitt diese am besten ab, weshalb sie auch als Diagnostikmethode am Tropeninstitut München etabliert wurde.

#### **5.3.2 PCR-2**

Diese PCR zählt zu den „best performing methods“ in der Arbeit von Schijman et al. (91) und verwendet ein ebenfalls häufig verwendetes, anderes Target als PCR-1 (55), weshalb sie als zweite konventionelle Methode zum Vergleich ausgewählt wurde. Die Primer TczF-TczR binden an den 195-bp lange Short Tandem Repeat der Sat-DNA, und amplifizieren ein ca. 182-bp langes DNA-Stück. Auch hier werden in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zu der Kopienzahl der Sat-DNA pro Parasit gemacht. Sie reichen von ca. 10.000 bis zu mehr als 120.000 Kopien pro Parasit (54, 93, 95-97).

Die Kopienanzahl der Sat-DNA pro Parasit nach PCR-2 ist also vermutlich mit der Anzahl an kDNA-Minircle Amplifikaten nach PCR-1 vergleichbar. Unterschiede in der Sensitivität der beiden PCRs können durch die verschiedenen Konditionen der PCRs, die Variabilität der Parasitämie, den Typ und das Volumen an biologischem Material der Patientinnen und Patienten oder durch unterschiedliche Discrete Typing Units der Parasiten bedingt sein (55).

### **5.3.3 PCR-3**

Auch die PCR-3 gehörte zu den „best performing methods“ in der Arbeit von Schijman *et al.* (91), weshalb sie zum Vergleich ausgewählt wurde. Die Primer *cruzi1* und *cruzi2* binden ebenfalls an den 195-bp langen Short Tandem Repeat der Sat-DNA, und amplifizieren ein ca. 166-bp langes DNA-Stück (80, 92, 93). Die TaqMan®-Sonde *cruzi3*, welche ein 17-bp langes DNA-Stück enthält und an das Amplifikat bindet, bewirkt nach Amplifikation durch ihre Markierung mit dem Farbstoff 5-FAM am 3'-Ende eine von der Software detektierbare Fluoreszenz. Durch die hohe Spezifität der TaqMan®-Sonde wird die Wahrscheinlichkeit, falsch-positive Ergebnisse zu erhalten, deutlich verringert (88, 92). Am 3'-Ende ist die Sonde mit einem BBQ-Quencher markiert, der das Fluoreszenzsignal vor der Amplifikation unterdrückt. Die Problematik bezüglich der genauen Kopienanzahl des Short Tandem Repeats pro Parasit wurde bereits unter Punkt 5.3.2 erläutert. Diese PCR ist zudem günstiger als andere kommerzielle Kits, die das gleiche bzw. ein ähnliches Target verwenden (wie z.B. PCR-4).

### **5.3.4 PCR-4**

Die PCR-4 ist ein kommerzielles, CE-zertifiziertes Kit der Firma DiaPro, welches sämtliche Reagenzien für die Durchführung einer Real-Time PCR zur Detektion von *T. cruzi* beinhaltet. Es wird durch die verwendeten Primer ebenfalls ein Stück der Sat-DNA amplifiziert. Um welche Sequenz es sich handelt, war uns nicht bekannt.

Die Firma DiaPro bietet neben dem qualitativen Kit auch ein quantitatives Kit an, welches Referenz-Standards enthält, wodurch die Anzahl an Parasiten in der Probe quantifiziert werden kann. Da Parasitenquantifizierung in der Zukunft vermutlich eine immer größere Rolle spielen wird, ist die Möglichkeit der Erweiterung dieser Methode durch ein quantitatives Kit sehr attraktiv.

## **5.4 Performance der Methoden**

Wie erwartet haben alle vier Methoden, die zum Vergleich ausgewählt wurden, sehr gut abgeschnitten. Trotzdem konnten beim Vergleich von Effizienz, Benutzerfreundlichkeit und Kosten kleine Unterschiede ausgemacht werden.

#### 5.4.1 Sensitivität und LOD

Der größte Unterschied zwischen den Tests konnte bei den Läufen zur Sensitivität bzw. zum LOD beobachtet werden. Von den 50 Proben, welche zuvor per Serologie und PCR am ISCIII positiv getestet worden waren, wurden 44 von allen vier Methoden als richtig positiv erkannt. Dies zeigt einmal mehr die gute Sensitivität aller untersuchten Tests. PCR-3, welche 45 von den 50 positiven Proben als richtig positiv detektiert hatte, wies die schlechteste Sensitivität auf (90%). PCR-2 erkannte 47 und PCR-4 49 der positiven Proben richtig, was eine Sensitivität von 94% (PCR-2) bzw. 98% (PCR-4) bedeutet. PCR-1 konnte alle 50 positiven Proben richtigerweise als positiv identifizieren, zeigte also mit 100% die höchstmögliche Sensitivität. Da die Proben aber zuvor am ISCIII mit einem sehr ähnlichen Protokoll wie jenes, das in PCR-1 verwendet wird, positiv getestet worden waren, war dieses Ergebnis zu erwarten (98). Auf Grund dessen wurde PCR-1 bei der Sensitivitätsanalyse nicht mit den anderen Methoden verglichen, sondern als Goldstandard und Referenzmethode für PCR-2, PCR-3 und PCR-4 verwendet. Bei allen anderen Analysen wurden die vier Methoden gleichwertig angesehen und miteinander verglichen. Auf diesen Sachverhalt wurde ebenfalls bereits in der aus diesem Manuskript hervorgegangenen Publikation hingewiesen (99).

Es gab eine Probe, die in PCR-1 amplifiziert wurde, nicht aber in PCR-4. Dies ist bemerkenswert, da das LOD in PCR-4 deutlich niedriger war, als in PCR-1 (siehe Tabelle 2). Eine der möglichen Gründe hierfür könnte eine eventuell vorhandene niedrigere Anzahl an Sat-DNA-Kopien in dieser Probe sein, wodurch eine Amplifikation mit PCR-4, deren Primer an die Sat-DNA andocken, nicht möglich war. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Sat-DNA-Kopien sehr stark vom *T. cruzi*-Stamm abhängig ist (96). Ein weiterer Grund sind potenziell vorhandene Sat-DNA Polymorphismen.

Die Umrechnung der Kopienzahl, welche als Detektionslimit angegeben wurde, in eine absolute Parasitenzahl bzw. in Parasiten/ $\mu$ l ist schwierig, da die Angaben in der Literatur sehr unterschiedlich sind. Außerdem variieren die Angaben zur DNA-Masse pro Parasit ebenfalls stark und werden mit 0,12 bis 0,33 pg pro Zelle angegeben (96, 100-104). Auf Grund dessen wurde auf eine Umrechnung verzichtet.

#### 5.4.2 Spezifität Teil 1

Es zeigte sich in keiner der vier untersuchten Methoden eine Amplifikation bei nicht infiziertem Blut. Können also Störfaktoren, wie in Spezifität Teil 2 beschrieben, ausgeschlossen werden, ist eine falsch-positive Diagnose der Chagas-Erkrankung bei gesunden Individuen mit den verwendeten Methoden höchst unwahrscheinlich.

### 5.4.3 Spezifität Teil 2 (Kreuzreaktivität)

#### 5.4.3.1 *Trypanosoma rangeli*

Bei der Untersuchung des *T. rangeli*-Kulturmaterials konnten bei allen vier PCR-Methoden *T. cruzi*-ähnliche Amplifikationen festgestellt werden. Es wurde nicht infiziertes humanes EDTA-Blut mit einer hohen Zahl an *T. rangeli*-Parasiten versetzt, sodass eine Konzentration von  $10^6$  Parasiten/ml Blut resultierte. Aus folgenden Gründen wurde eine solch hohe Parasitenkonzentration gewählt: Es ist bekannt, dass die Kopienzahl des 195 bp langen Short Tandem Repeat der Sat-DNA in *T. rangeli* geringer ist als in *T. cruzi* (105). Zudem konnte von Ramirez et al. gezeigt werden, dass 10 fg/ $\mu$ l *T. rangeli*-DNA von einer Real-Time PCR, welche kDNA als Target benützt, amplifiziert werden. Bei einer Real-Time PCR, welche Sat-DNA als Target benützt, waren mindestens 10 pg/ $\mu$ l *T. rangeli*-DNA notwendig, um eine Amplifikation zu erzielen (106). Der durchschnittliche DNA-Gehalt einer einzigen Parasitenzelle beträgt zwischen 100 und 300 fg (96, 100-104). Für die Berechnung nahmen wir an, dass 100 fg DNA genau einem Parasiten entspricht. Die zuvor erwähnten 10 pg/ $\mu$ l *T. rangeli*-DNA entsprechen somit 100 Parasiten/ml ( $10 \text{ pg}/\mu\text{l} = 10.000 \text{ fg}/\mu\text{l} = 100 \text{ Parasiten}/\mu\text{l}$ ). 100 Parasiten/ $\mu$ l entsprechen  $10^5$  Parasiten/ml, was die minimale Konzentration an *T. rangeli*-DNA darstellt, welche in einer Sat-DNA Real-Time PCR amplifiziert wird. Da unser Ziel war, mögliche Positivität einer mit *T. rangeli* infizierten Blutprobe zu zeigen, wurde die um eine Zehnerpotenz höhere Konzentration von  $10^6$  Parasiten/ml Blut gewählt.

Die Länge der *T. rangeli*-Banden in PCR-1 bzw. PCR-2 waren sehr ähnlich bzw. gleich wie die der *T. cruzi*-Banden. Eine ca. 760-bp lange Bande, wie zuvor beschrieben (107, 108), oder eine 300-bp bzw. 450-bp lange Bande, wie ebenfalls zuvor dokumentiert (109), konnte in PCR-1 nach der Amplifikation der kDNA Minicircles von *T. rangeli* nicht beobachtet werden. Ein Grund hierfür könnte der verwendete *T. rangeli*-Stamm sein. Die kDNA Minicircles von *T. rangeli* sind sehr heterogen aufgebaut und besitzen, je nach Stamm, entweder eine, zwei oder vier konservierte Regionen, an die die in PCR-1 verwendeten Primer binden können (110, 111). So zum Beispiel haben ca. die Hälfte der 1,7-kb langen Minicircles des *T. rangeli* El Tocuyo-Stammes eine, die meisten anderen des Stammes zwei konservierte Regionen. Demgegenüber besitzen die meisten der 1,6-kb langen Minicircles des *T. rangeli* San Agustín-Stammes zwei, manche jedoch vier konservierte Regionen (112). Dementsprechend unterschiedlich kann auch die Länge des Amplifikats ausfallen. Sturm et al. beobachteten bei Verwendung sehr ähnlicher Primer wie in PCR-1 keine Amplifikation von *T. rangeli* (53). Jedoch konnte in der Arbeit von Gilber et al. eine Amplifikation von *T. rangeli*, *L. braziliensis* und *L. amazonensis* bei Verwendung einer der PCR-2 ähnlichen Methode gezeigt werden (113).

Bei den beiden Real-Time PCRs ist es mit den angewandten Methoden nicht möglich, die Länge der Amplifikate zu bestimmen. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die amplifizierte *T. rangeli*-DNA-Sequenz sehr ähnlich bzw. gleich wie die der untersuchten *T. cruzi*-Stämme ist, da die hochspezifische Sonde cruzi3 an die Amplifikate gebunden und die Fluoreszenz den Threshold schon nach wenigen Zyklen überschritten hat.

Da es *T. cruzi*-ähnliche Amplifikationen bei Verwendung von *T. rangeli*-DNA als Template in allen vier zu vergleichenden Methoden gegeben hat, ist die Spezifität aller getesteten PCRs eingeschränkt. Da eine Infektion mit dem apathogenen *T. rangeli* für den Betroffenen keine Konsequenzen zu bedeuten hat, eine Parasitämie mit *T. cruzi* jedoch möglicherweise schwerwiegende Folgen für die/den Betroffene/n und gegebenenfalls die Angehörigen mit sich bringt, muss dies bei der Diagnostik stets bedacht werden. Es sollte somit bei Personen mit Verdacht auf Chagas-Erkrankung immer abgeklärt werden, ob die/der Patient/in aus einem Gebiet kommt, in dem sowohl *T. rangeli*, als auch *T. cruzi* endemisch sind, bzw. sich dort aufgehalten hat und somit die Chance einer Koinfektion mit *T. cruzi* und *T. rangeli* bzw. einer reinen *T. rangeli*-Infektion besteht. Weiters darf nicht vergessen werden, die klinische Symptomatik und individuelle Anamnese der potenziell infizierten Person in die Diagnosefindung miteinzubeziehen.

#### 5.4.3.2 *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* und *Leishmania major*

Bei PCR-1 zeigten sich keine *T. cruzi*-spezifischen Banden (siehe 4.4.2.1). Bei PCR-2 kam es jedoch zu schwachen, *T. cruzi*-unspezifischen Amplifikationen bei verschiedenen *Leishmania*-Arten, weshalb die Spezifität dieser Methode stark eingeschränkt ist (siehe 4.4.2.2). Bei den Real-Time Methoden PCR-3 und PCR-4 wurde keine Fluoreszenz, d.h. keine Amplifikation, nachgewiesen. Dies lässt darauf schließen, dass zwischen den verwendeten Primern und den hier genannten untersuchten *Trypanosomatida* in PCR-1, PCR-3 und PCR-4 keine Kreuzreaktivität besteht und die Spezifität somit nicht verschlechtert.

#### 5.4.4 **Intraassay, Interassay I, Interassay II**

Die Intra- und Interassay-Präzision zeigten vergleichbare Bandendicken bzw. Cq-Werte (sh. Tabelle 2 bzw. Mittelwerte und Standardabweichungen unter Punkt 4.2) weshalb die Wiederholbarkeit der Ergebnisse einer Probe in verschiedenen Ansätzen zu einem Zeitpunkt (Intraassay) bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Interassay I und II) gezeigt werden konnte.

#### 5.4.5 Matrixeffekt

Auch der Matrixeffekt lieferte die zu erwartenden Ergebnisse, wodurch das Vorhandensein von Kontaminationen bzw. Inhibitionsfaktoren, welche ein falsch-positives bzw. falsch-negatives Ergebnis zur Folge hätten, ausgeschlossen werden konnten.

#### 5.5 Vergleich der getesteten Methoden mit anderen publizierten Methoden [siehe auch (99)]

Es wurden bisher zahlreiche Studien zur molekularbiologischen Diagnostik der Chagas-Erkrankung publiziert (80, 92, 98, 113, 114). Speziell die Publikation von Schijman *et al.* hat viel zum genaueren Verständnis der verschiedenen Diagnostikmethoden beigetragen (91). Einige der „Best Performing Methods“ (LbD3, LbF1, LbQ) aus dieser Veröffentlichung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit an die Bedingungen im Labor des Tropeninstituts München angepasst und ebenda reevaluiert.

PCR-1 des vorliegenden Manuskripts ist der Methode LbQ aus der Arbeit Schijmans *et al.* sehr ähnlich, wobei PCR-2 an das Protokoll LbD3 und PCR-3 an LbF1 angelehnt ist. Die von Schijman *et al.* berichtete hohe Sensitivität (83,3-94,4%) und Spezifität (85-95%) dieser Methoden konnte bestätigt werden (siehe 4. Ergebnisse). Auch in der Arbeit von Gilber *et al.* wird von einer hohen Sensitivität (76,4% bei Patienten mit kardialer Beteiligung) und Spezifität (100%) für eine konventionelle PCR-Methode berichtet, welche ähnliche Primer wie PCR-2 verwendet (113).

Dem gegenüber steht die Veröffentlichung von Duarte *et al.*, welche eine niedrige Sensitivität (51% und 22%) bei hoher Spezifität (100% and 100%) bei ähnlichen Methoden wie PCR-1 und PCR-2 zeigt (115). Die möglichen Gründe hierfür sind vielfältig. Da die Patientinnen und Patienten primär anhand von klinischen und epidemiologischen Merkmalen in die Studie eingeschlossen wurden, kann es beispielsweise durch Fehlinterpretation der Symptome zu einer Stichprobenverzerrung gekommen sein. Des Weiteren könnte die Verwendung des buffy coats bzw. unterschiedlicher Reagenzien, die Anwesenheit inhibierender Faktoren in der PCR oder die Durchführung einer vereinfachten Extraktionsmethode für die niedrige Sensitivität verantwortlich sein. Piron *et al.* berichtet nach Durchführung einer der PCR-3-ähnlichen Real-Time PCR seropositiver Patientinnen und Patienten von einer Sensitivität von 41% und einer Spezifität von 100% (92).

Es sei an dieser Stelle erneut darauf hingewiesen, dass sämtliche Proben, welche im vorliegenden Manuskript untersucht wurden, bereits vorab serologisch und molekularbiologisch (mittels PCR) positiv getestet wurden. Es ist anzunehmen, dass die hier beschriebene teils deutlich höhere Sensitivität als in anderen Untersuchungen, bei denen die Studienpopulation nur anhand einer zuvor durchgeführten positiven Serologie oder Chagas-typischer Symptomatik ausgewählt wurde, darauf zurückzuführen ist. Die Sensitivität der PCR-Methoden der oben angeführten Arbeiten ist somit nur sehr einge-

schränkt mit der Sensitivität der Methoden PCR-1, PCR-2, PCR-3 und PCR-4 der vorliegenden Untersuchung zu vergleichen.

In der Veröffentlichung von Cummings et al., in der ähnliche Primer wie in PCR-1 und PCR-2 verwendet werden, jedoch eine SYBR Green-basierte quantitative Real-Time PCR durchgeführt wurde, wird ein geringeres LOD mit den Primern erzielt, welche auf die Sat-DNA abzielen, als bei jenen, welche die kDNA als Target benutzen (80). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Die konventionellen Methoden PCR-1 und PCR-2 zeigen ähnliche LOD-Werte (400 Targetkopien/Reaktion). Bei den Real-Time Methoden PCR-3 und PCR-4, welche beide die Sat-DNA als Target benutzen, konnten deutlich niedrigere LOD-Werte gezeigt werden (40 Targetkopien/Reaktion bei PCR-3 und 10 Targetkopien/Reaktion bei PCR-4). Schijman et al. berichtet von einem geringeren LOD – dementsprechend einer höheren analytischen Sensitivität – bei den kDNA PCRs im Vergleich zu Sat-DNA PCRs, wenn *T. cruzi* I amplifiziert wird. Bei der Amplifikation von *T. cruzi* IV wurden ähnliche LOD-Werte bei kDNA und Sat-DNA PCRs beobachtet (91). Für jene Analyse wurden verschiedene Verdünnungsstufen von purifizierter *T. cruzi* DNA in sterilem Wasser verwendet, welches ein vergleichbares Vorgehen wie in der vorliegenden Arbeit darstellt. Trotzdem konnten die Ergebnisse von Schijman et al. nicht bestätigt werden. Die LOD-Werte in den Real-Time Methoden PCR-3 und PCR-4, beides Sat-DNA PCRs, waren niedriger als bei der kDNA PCR.

## 5.6 Kosten

Die konventionellen Methoden PCR-1 und PCR-2 sind deutlich günstiger als Methoden PCR-3 und PCR-4. Während der Preis für die Methoden PCR-1 und PCR-2 unter einem Euro pro Test liegt, beträgt er für PCR-3 rund zwei, für PCR-4 rund acht Euro pro Test. Des Weiteren muss bedacht werden, dass das Labor für die Durchführung von PCR-3 und PCR-4 eine moderne und teure Ausstattung mit einem Real-Time Thermocycler und der entsprechenden Software benötigt. Dies sollte speziell von Laboratorien, welche über ein geringes Budget verfügen und Real-Time PCRs nur selten durchführen, nicht außer Acht gelassen werden.

## 5.7 Benutzerfreundlichkeit

Hands-on- und Hands-off-Zeiten bei PCR-1 und PCR-2 sind verglichen mit PCR-3 und PCR-4 höher. Da es sich bei ersteren beiden um konventionelle Methoden handelt, ist dies zu erwarten. Die Zeit für die gesamte PCR am Thermocycler beträgt bei PCR-1 und PCR-2 jeweils ca. 2:45 h, bei PCR-3 und PCR-4 ca. 1:40h. Hinzu kommt bei PCR-1 und PCR-2 die Zeit für die Vorbereitung eines Agarosegels (inklusive Trocknen) und die Dauer der Elektrophorese. Bei der Real-Time PCR können die Ergebnisse direkt nach der Amplifikation analysiert werden. Insgesamt nehmen also PCR-3 und PCR-4

deutlich weniger Zeit in Anspruch als PCR-1 und PCR-2. Zudem muss bei PCR-3 und PCR-4 weniger oft pipettiert werden, was die Kontaminationsgefahr verringert. Ebenfalls erwähnt sei, dass bei PCR-4 sämtliche für die PCR notwendigen Reagenzien in dem kommerziellen Kit geliefert werden, was für den Endbenutzer angenehm ist, Zeit spart und die Verträglichkeit der einzelnen Reagenzien untereinander garantiert.

## 5.8 Weitere Erkenntnisse

Es konnte gezeigt werden, dass die Intensität der Bande unter UV-Licht (bei konventionellen) und der Cq-Wert (bei Real-Time Methoden) von dem Alter der Probe abhängt. Es sind Schwankungen in der Bandenintensität bzw. den Cq-Werten auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an Parasiten im Blut der Betroffenen zum Zeitpunkt der Probengewinnung und damit einhergehenden stärkeren bzw. schwächeren Amplifikation zu erwarten. Jedoch betragen die Mediane der „+“-Symbole bei Proben aus dem Jahr 2013 3,00 (PCR-1) bzw. 2,00 (PCR-2), für Proben aus dem Jahr 2011 2,00 (PCR-1) bzw. 2,00 (PCR-2) und 2,00 (PCR-1) bzw. 1,00 (PCR-2) für Proben aus dem Jahr 2010 (vgl. Tabelle 3). Die Unterschiede waren statistisch signifikant ( $p < 0,5$ ) für 2011 im Vergleich zu 2013. Dies lässt darauf schließen, dass bei längerer Lagerung der Proben die Bandenintensität unter UV-Licht im Agarosegel in TAE abnimmt. Bei kürzerer Lagerung jedoch bleibt die Intensität hoch. Die Mediane der Cq-Werte für die Proben aus dem Jahr 2013 waren 30,45 (PCR-3) bzw. 28,26 (PCR-4), 34,44 (PCR-3) bzw. 33,13 (PCR-4) für Proben aus dem Jahr 2011 und 34,17 (PCR-3) bzw. 32,37 (PCR-4) für Proben aus dem Jahr 2010. Die Unterschiede waren ebenfalls statistisch signifikant für 2011 im Vergleich zu 2013. Auch diese Daten lassen darauf schließen, dass bei längerer Lagerung der Proben der Cq-Wert bei Durchführung der beiden Real-Time PCRs abnimmt. Dies bedeutet, dass bei längerer Lagerung mehr Amplifikationszyklen nötig sind, bis die gemessene Fluoreszenz den Threshold-Wert überschreitet und somit von der Software als „positiv“ erkannt wird. Diese objektiven Daten bestätigen die Erkenntnis aus PCR-1 und PCR-2, bei denen die Anzahl an „+“-Symbolen von der auswertenden Person subjektiv vergeben wurde. Dies bestätigt die Annahme, dass DNA in der Mischung aus Patientenblut mit Guanidin-EDTA mit der Zeit degeneriert und somit weniger leicht nachzuweisen ist. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass ohne Vorbehandlung der Proben mit Guanidin-EDTA die DNA bedeutend schneller degenerieren würde.

## 5.9 Zusammenfassung

Insgesamt war PCR-1 die beste der getesteten Methoden. Obwohl sie in der Sensitivitätsanalyse auf Grund des zuvor mit einer ähnlichen Methode bereits positiv getesteten Probenmaterials nur eingeschränkt beurteilt werden konnte und deshalb als Goldstandard für PCR-2, PCR-3 und PCR-4 verwendet wurde, konnte PCR-1 in den anderen durchgeführten Untersuchungen durchwegs überzeugen. Zudem ist PCR-1 die einzige der untersuchten Methoden, bei der das Target kDNA ist, was im Falle

der Untersuchung von Parasitenstämmen mit einer hohen Anzahl an Minicircles von Vorteil sein kann. Das Detektionslimit war jedoch in den Real-Time Methoden niedriger als in den konventionellen, was auf eine höhere Sensitivität bei ersteren schließen lässt. PCR-4 erzielte hierbei das beste Ergebnis.

Alle getesteten Methoden amplifizierten Teile des Genoms von *T. rangeli* in *T. cruzi*-ähnlichem Muster, was eine verminderte Spezifität bedeutet. Nicht infizierte Blutproben von gesunden Individuen wurden jedoch bei keiner der Methoden amplifiziert.

Die Kosten sind bei den konventionellen geringer als bei den Real-Time Methoden. PCR-4 ist ein kommerziell erhältliches, CE-zertifiziertes Kit, welches bereits sämtliche Reagenzien enthält. Dadurch ist es die teuerste, gleichzeitig aber auch die benutzerfreundlichste und schnellste Methode. Das beste Preis-Leistungsverhältnis wies unseres Erachtens jedoch PCR-1 auf, trotz der leicht erniedrigten Benutzerfreundlichkeit und erhöhten benötigten Dauer der Durchführung.

PCR-4 bietet den weiteren Vorteil, dass die Firma DiaPro genormte Standards anbietet, wodurch mit dieser Methode die Parasitenanzahl im Blut der Betroffenen quantifiziert werden kann. Es ist davon auszugehen, dass die Parasitenquantifizierung bei Chagas-Erkrankten in der Zukunft stark an Bedeutung gewinnen wird.

## **5.10 Schlussfolgerung**

Nach Berücksichtigung aller zuvor genannten Informationen empfehlen wir folgendes Procedere für die molekulare Diagnostik der Chagas-Erkrankung (99): Durchführung sowohl der konventionellen Methode PCR-1, als auch der Real-Time Methode PCR-4. Dadurch werden beide in der molekularen *T. cruzi*-Diagnostik gängigen Targets, kDNA und Sat-DNA, amplifiziert. Ist einer der beiden Tests positiv, sollte die Person als PCR-positiv betrachtet werden. Eine mögliche Erklärung für ein abweichendes Ergebnis (z.B. PCR-1 positiv, PCR-4 negativ) ist eine Infektion mit einer *T. cruzi*-DTU, welche eine niedrige Anzahl an Sat-DNA-Sequenzen aufweist, weshalb eine Detektion durch PCR-4 nicht möglich ist. Sequenz-Polymorphismen auf Grund von Unterschieden in den DTUs dürfen nicht außer Acht gelassen werden.

PCR-4 bietet die Möglichkeit, die Parasitenzahl im Blut der/des Patienten/in zu quantifizieren. Hierfür können entweder standardisierte Templates, welche von der Firma DiaPro zur Verfügung gestellt werden, oder eine selbst hergestellte und generierte Standardkurve zur Anwendung kommen. Die Quantifizierung der Parasiten stellt einen immer wichtiger werdenden Aspekt in der Diagnostik der

Chagas-Erkrankung dar (92, 116) und sollte während und nach der Therapie zur Kontrolle deren Wirksamkeit durchgeführt werden.

Die Empfehlungen zur Entnahmemenge sollten eingehalten werden: Da die Parasitämie im chronischen Stadium oft sehr niedrig ist, wird empfohlen, Erwachsenen min. 10 ml und Kindern min. 5 ml Blut für die Analyse abzunehmen (55, 117, 118). Des Weiteren wird empfohlen, die Blutabnahme bei Patientinnen und Patienten im chronischen Erkrankungsstadium an verschiedenen Tagen mehrmals durchzuführen, da die Parasitämie nicht konstant ist und von verschiedenen Faktoren abhängig ist (z.B. Immunstatus oder Schwangerschaft) (119, 120).

Therapeutische Entscheidungen sollten neben den jüngsten Erkenntnissen in der aktuellen Literatur ebenfalls das Alter, Geschlecht und die klinischen Symptome der potenziell infizierten Person beinhalten und dürfen ausschließlich individuell getroffen werden. Ein negatives PCR-Ergebnis stellt keinen sicheren Ausschluss bei positiver Serologie dar. Hier muss speziell die individuelle Krankengeschichte das weitere Procedere bestimmen. Bei seronegativen Individuen ist nach Ausschluss einer akuten Infektion mit *T. cruzi* und anderer oben genannter Störfaktoren davon auszugehen, dass keine Infektion mit *T. cruzi* bzw. *T. rangeli* vorliegt.

Das soeben genannte Procedere für die molekulare Diagnostik der Amerikanischen Trypanosomiasis wurde von mir am Tropeninstitut München etabliert. Die Detektion von *T. cruzi* mittels PCR wird nun an einem Routinelabor in Deutschland angeboten. Abschließend kann das Projekt somit als Erfolg gewertet werden.

## **6 Ausblick**

### **6.1 Die deutschlandweite „EL CiD“-Studie**

Im Rahmen des von der Charité Berlin und der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg initiierten deutschen Chagas-Projektes, welches im Mai 2014 gestartet ist, soll die Prävalenz der Chagas-Erkrankung in Deutschland untersucht und ein Behandlungskonzept für Betroffene entwickelt werden. Auf Grund dessen wurde die sogenannte „El CiD-Studie“ (Erkennung und Lenkung von Chagas-Patienten in Deutschland) gestartet. Ziel ist es, Aufklärungsarbeit in der Öffentlichkeit zu betreiben, sowie Ärztinnen und Ärzten und sonstiges medizinisches Fachpersonal über die Erkrankung zu informieren und diese zu schulen. Hierfür stehen fachkundige, auf Tropenmedizin spezialisierte Ärztinnen und Ärzte an den beteiligten Institutionen (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Berlin, Abteilung für Tropenmedizin der Missionsärztlichen Klinik Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universitätsklinik Würzburg, Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung. Als Studienlabor fungiert infolge der Etablierung einer PCR zur Diagnostik der Chagas-Erkrankung, welche im vorliegenden Manuskript beschrieben wird, das Tropeninstitut München.

Website des deutschen Chagas-Projektes: [www.chagas.info](http://www.chagas.info)

## 7 Glossar

*anti-T. cruzi-AK (anti-T. cruzi-Antikörper)*: vom menschlichen Körper gebildete Antikörper (Immunglobuline), welche spezifisch gegen *T. cruzi* (Antigen) gerichtet sind

*Cq- bzw. Ct-Wert (Quantification cycle value bzw. Cycle threshold value)*: Numerischer Wert, welcher angibt, nach wie vielen Zyklen einer Real-Time PCR die Fluoreszenz des Amplifikats den Threshold-Wert überschreitet. Je niedriger der Cq- bzw. Ct-Wert, desto früher wurde das Amplifikat als positiv detektiert. Bleibt der Wert 0, konnte keine DNA in der Probe amplifiziert werden.

*Inhibitionsfaktoren*: Inhibitionsfaktoren sind Bestandteile in einer PCR, durch welche die Reaktion inhibiert wird, das heißt nicht regelrecht ablaufen kann. Oft handelt es sich um Substanzen, welche inhibierend auf die Taq-Polymerase wirken (121).

*Kinetoplast DNA (kDNA)*: Alle Kinetoplastida (Kinetoplastea) besitzen ein einzigartiges Netzwerk an mitochondrialer DNA, der sogenannten kDNA. Das kDNA Netzwerk besteht aus DNA-Ringen, welche aus 5.000-10.000 Minicircles und 25-50 Maxicircles bestehen. Je nach Spezies sind die Minicircles zwischen 0,5 und 10 Kilobasen (kb) lang, die Maxicircles zwischen 25 und 50 kb. Sämtliche Mini- und Maxicircles sind miteinander verknüpft, wodurch die charakteristische „Kettenpanzer“-Struktur entsteht (122).

*Kontakthemmung*: Die Zellteilung wird durch den allseitigen Kontakt mit anderen Zellen natürlich gehemmt, d.h. Zellen können nur bis zu einer gewissen Dichte heranwachsen (123).

*Konfluenz*: maximale Dichte der Anordnung von Zellen in einer Kultur auf ihrer Oberfläche (als Einfachschicht=Monolayer) (123)

*Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*: Im Zuge einer PCR werden gezielt gewisse Abschnitte aus dem Genom des untersuchten Erregers amplifiziert, d.h. vervielfältigt, und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht bzw. durch Fluoreszenz von einem Computer detektiert. Es gibt verschiedene Arten von PCRs. In der vorliegenden Arbeit wurden die konventionelle und die Real-Time PCR angewandt. Bei der konventionellen PCR wird ein Mastermix aus Puffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primern, Taq-Polymerase und Wasser vorbereitet, zu dem im Anschluss eine kleine Menge der extrahierten DNA des Erregers zugegeben wird, sofern sich solche in der untersuchten Probe befindet (sog. „*Template*“). Anschließend werden verschiedene Temperaturschritte zur Denaturierung der Proben, Annealing (Anlagerung) der Primer und Elongation durch die Taq-Polymerase durchlaufen. Im Anschluss werden diese sogenannten Amplifikate mit Blaupuffer gemischt und in ein Agarose-Gel in TAE mit *GelRed*®

pipettiert. Durch die Anlage einer Spannung werden die verschieden langen Amplifikate in dem Agarosegel unterschiedlich weit vom Minus- zum Pluspol transportiert (Elektrophorese). Abschließend können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Befindet sich keine DNA des Erregers in der Blutprobe, findet auch keine Amplifikation statt und es ist kein Signal unter UV-Licht sichtbar. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Real-Time PCR-Methoden wird zu den oben genannten Bestandteilen des Mastermixes zusätzlich eine sogenannte Sonde pipettiert, welche an die Target-Region bindet und bei Amplifikation fluoresziert, was durch den Thermocycler registriert und mittels Software digital aufgezeichnet wird. Im Zuge der PCR-Reaktion werden ebenfalls verschiedene Temperaturschritte durchlaufen. Jedoch erfolgt die Aufzeichnung der Fluoreszenz im Falle einer Amplifikation in Echtzeit („Real-Time“) nach jedem Zyklus, das Ergebnis kann direkt nach der Beendigung des Laufes analysiert werden. Die Schritte der Elektrophorese bzw. des Sichtbarmachens unter UV-Licht fallen hier weg.

*Relative fluorescence unit (RFU)*: Einheit, in der die Fluoreszenz bei der Real-Time PCR gemessen wird.

*Satelliten-DNA (Sat-DNA)*: hochrepetitive DNA-Sequenzen, die sich in einem DNA- bzw. RNA-Strang oft direkt hintereinander wiederholen (124)

*Serologie*: Die Lehre von Antigen-Antikörper-Reaktionen. Das Vorhandensein von Erregern im Blut von Patientinnen und Patienten kann indirekt durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern, welche der Körper gegen die Erreger bildet, erfolgen. Hierzu gehören verschiedene Verfahren wie der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, Hämagglutinationstest oder der *Indirekte Immunofluoreszenztest (IFT)* (125).

*Short Tandem Repeats (Syn. Mikrosatelliten)*: Teil der Sat-DNA; Basensequenzen, die kurze repetitive Elemente erhalten, die von spezifischen Sequenzen flankiert sind (124)

*Standard Operating Procedure (SOP)*: konkrete Handlungsempfehlung zur Prozessoptimierung klinischer Abläufe (126)

*Splitting (=Passage, Subkultivierung, Trypsinierung)*: Vor Erreichen der absoluten Konfluenz wird das Kulturmaterial verdünnt bzw. ein Teil davon in ein anderes Kulturgefäß transferiert, um die durch Kontakthemmung eintretende Verlangsamung der Zellteilungsrate zu verhindern (123)

*Target*: Als Target einer PCR wird jene Region bzw. jener Abschnitt im Genom (des Erregers) verstanden, an welche/n die Primer binden und welche/r im Anschluss amplifiziert wird.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kaplinsky EJ. Miocardiopatía chagásica: una cardiopatía importada. *Publicación Médica de Cardiología* [Internet]. 2011; 28. Available from: [http://cardiologia.publicacionmedica.com/noticia/tribuna\\_kaplinsky](http://cardiologia.publicacionmedica.com/noticia/tribuna_kaplinsky).
2. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
3. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med*. 2004;4(6):623-47.
4. Clayton J. The promise of *T. cruzi* genomics. *Nature*. 2010;465(7301):S16-7.
5. Who, how, what and where? *Nature*. 2010;465(7301):S8-9.
6. Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol*. 2013;4:186.
7. Walochnik J, Aspöck H. Raubwanzen, *Trypanosoma cruzi* und Morbus Chagas – die Geißel Südamerikas. In: Aspöck H, editor. *Krank durch Arthropoden - Denisa* 30:2010. p. 655-72.
8. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31(5-6):472-81.
9. Clayton J. Chagas disease 101. *Nature*. 2010;465(7301):S4-5.
10. Weinke T, Burchard G-D. Amerikanische Trypanosomiasis oder Chagas-Krankheit. In: Löscher T, Burchard G-D, editors. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 4 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010. p. 630-38.
11. Alarcon de Noya B, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*. 2010;201(9):1308-15.
12. Klein N, Hurwitz I, Durvasula R. Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries. *Epidemiology Research International*. 2012;2012:1-13.
13. Lent H, Pedro W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;163.
14. Galvão C, Carcavallo R, Rocha DDS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 2003;202:1-36.
15. Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275-91.

16. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002;905:i-vi, 1-109, back cover.
17. Chagas C. Nova Tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159-218.
18. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(7):2034-9.
19. Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010;465(7301):S6-7.
20. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) [World Health Organ Fact Sheet]. 2014 [26 Oct 2016]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
21. WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90(6):33-44.
22. Pinto Dias JC. Human chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. J Trop Med. 2013;2013:789758.
23. Steverding D. The history of Chagas disease. Parasites & vectors. 2014;7:317.
24. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 2010;115(1-2):14-21.
25. Sack A. La crisis en España, el golpe que acelera un regreso sin gloria. La Nación. 2009 22 February.
26. Navarro M, Navaza B, Guionnet A, Lopez-Velez R. Chagas disease in Spain: need for further public health measures. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12):e1962.
27. Frank M, Hegenscheid B, Janitschke K, Weinke T. Prevalence and epidemiological significance of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin American immigrants in Berlin, Germany. Infection. 1997;25(6):355-8.
28. Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. Clin Res Cardiol. 2014;103(1):1-10.
29. Navarro M, Berens-Riha N, Hohnerlein S, Seiringer P, von Saldern C, Garcia S, et al. Cross-sectional, descriptive study of Chagas disease among citizens of Bolivian origin living in Munich, Germany. BMJ Open. 2017;7(1):e013960.
30. Kirchhoff LV. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) [15 Jun 2017]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview#a0104>.

31. Parada H, Carrasco HA, Anez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol.* 1997;60(1):49-54.
32. Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS, Mott KE. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med.* 1978;298(11):604-6.
33. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl 1:113-22.
34. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1:152-8.
35. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003;60(1):96-107.
36. Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):592-630.
37. Koeberle F. *Cardiopathia parasymphaticopriva*. *Munch Med Wochenschr.* 1959;101:1308-10.
38. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109-23.
39. Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1:167-80.
40. Adad SJ, Cancado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.* 2001;438(3):254-8.
41. Koeberle F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. *Gut.* 1963;4:399-405.
42. Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(3):252-60.
43. Perez-Molina JA, Rodriguez-Guardado A, Soriano A, Pinazo MJ, Carrilero B, Garcia-Rodriguez M, et al. Guidelines on the treatment of chronic coinfection by *Trypanosoma cruzi* and HIV outside endemic areas. *HIV Clin Trials.* 2011;12(6):287-98.
44. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasc AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiases. *Lancet.* 2003;362(9394):1469-80.
45. Foster CS, Vitale AT. *Diagnosis & Treatment of Uveitis*: Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited; 2013.
46. Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(4):e1136.

47. Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ*. 2003;326(7404):1444-8.
48. Rocha A, Almeida HdO, Esper FE, Moraes DMd, Santos EPd, Teixeira VdPA. Associação entre megaesôfago e carcinoma de esôfago. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1983;16:94-7.
49. Brandalise NA, Andreollo NA, Leonardi LS, Callejas Neto F. Carcinoma associado a megaesôfago chagásico. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*.12(6):196-9.
50. Garcia SB, Aranha AL, Garcia FR, Basile FV, Pinto AP, de Oliveira EC, et al. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(2):91-3.
51. Saldana A, Samudio F, Miranda A, Herrera LM, Saavedra SP, Caceres L, et al. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):729-31.
52. Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(5):775-9.
53. Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33(3):205-14.
54. Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(7):1477-82.
55. Flores-Chávez M, Fuentes Id, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(Supl.3):29-37.
56. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1983;18(2):327-30.
57. Lang W. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 3 ed. Löscher T, editor. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2000.
58. Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol*. 1962;48:100.
59. Perez-Molina JA, Norman F, Lopez-Velez R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Curr Infect Dis Rep*. 2012;14(3):263-74.
60. Santos AHd, Silva IGd, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995;28:367-73.
61. Jercic MI, Mercado R, Villarroel R. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3824-6.

62. Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, et al. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(10):e1250.
63. Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop*. 2012;121(2):55-70.
64. Reyes PA, Vallejo M. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005(4):Cd004102.
65. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.
66. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Jr., Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2007;298(18):2171-81.
67. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):724-34.
68. Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Moreno S, Fernandez-Gonzalez MC, Zamora J, Lopez-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(6):1139-47.
69. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Jr., Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-306.
70. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7(2):157-63.
71. Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006;25(8):471-9.
72. Pinazo MJ, Munoz J, Posada E, Lopez-Chejade P, Gallego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4896-9.
73. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Trypanosoma cruzi* : vírus da imunodeficiência humana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:392-415.
74. Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2010;51(10):e69-75.
75. Fundación Mundo Sano. La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. 2007.

76. Salvatella R, Irabedra P, Sanchez D, Castellanos LG, Espinal M. South-south cooperation for Chagas disease. *Lancet*. 2013;382(9890):395-6.
77. Pan American Health Organization. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). 2016. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2382&Itemid=3921&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2382&Itemid=3921&lang=en).
78. Pan American Health Organization. Strategy and plan of action for Chagas disease prevention, control and care. 2010. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/166565>.
79. Marcon GE, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley Jda S, de Almeida EA, Guariento ME, et al. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43(1):39-43.
80. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129(1):53-9.
81. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
82. Beissner M, Symank D, Phillips RO, Amoako YA, Awua-Boateng NY, Sarfo FS, et al. Detection of viable *Mycobacterium ulcerans* in clinical samples by a novel combined 16S rRNA reverse transcriptase/IS2404 real-time qPCR assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1756.
83. Grisard EC, Teixeira SM, de Almeida LG, Stoco PH, Gerber AL, Talavera-Lopez C, et al. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome announcements*. 2014;2(1).
84. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;48(2):211-21.
85. Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88(1):171-2.
86. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51(6):771-7.
87. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(5):574-82.
88. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2000.

89. Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;42(2):175-87.
90. Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;124(3):419-23.
91. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(1):e931.
92. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Lopez-Chejade P, Puig L, Verges M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007;103(3):195-200.
93. Ramirez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol.* 2009;47(12):3945-51.
94. Degrave W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988;27(1):63-70.
95. Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(11):3356-60.
96. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e419.
97. Martins C, Baptista CS, Ienne S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160(1):60-4.
98. Norman FF, Perez-Ayala A, Perez-Molina JA, Flores-Chavez M, Canavate C, Lopez-Velez R. Lack of association between blood-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and cardiac involvement in a non-endemic area. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011;105(6):425-30.
99. Seiringer P, Pritsch M, Flores-Chavez M, Marchisio E, Helfrich K, Mengele C, et al. Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;88(3):225-32.
100. Santos MR, Cano MI, Schijman A, Lorenzi H, Vazquez M, Levin MJ, et al. The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(6):821-8.
101. Kooy RF, Ashall F, Van der Ploeg M, Overdulve JP. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;36(1):73-6.

102. McDaniel JP, Dvorak JA. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;57(2):213-22.
103. Thompson CT, Dvorak JA. Quantitation of total DNA per cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry. *Anal Biochem*. 1989;177(2):353-7.
104. Lanar DE, Levy LS, Manning JE. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1981;3(5):327-41.
105. Breniere SF, Bosseno MF, Barnabe C, Urdaneta-Morales S, Tibayrenc M. Copy number differences in the 195 bp repeated satellite DNA from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: potential use for epidemiologic surveys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88(1):163-5.
106. Ramirez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velazquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*. 2015;17(5):605-15.
107. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*. 1999;72(2):203-12.
108. de Sousa MA, da Silva Fonseca T, Dos Santos BN, Dos Santos Pereira SM, Carvalhal C, Hasslocher Moreno AM. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). *Parasitol Res*. 2008;103(3):697-703.
109. Pavia PX, Vallejo GA, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(1):23-30.
110. Marquez DS, Ramirez LE, Moreno J, Pedrosa AL, Lages-Silva E. *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. *Exp Parasitol*. 2007;117(1):35-42.
111. Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;67(2):245-53.
112. Recinos RF, Kirchoff LV, Donelson JE. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;63(1):59-67.
113. Gilber SR, Alban SM, Gobor L, Bescrovaine Jde O, Myiazaki MI, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):310-5.
114. Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol*. 1995;81(4):462-71.

115. Duarte LF, Florez O, Rincon G, Gonzalez CI. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colomb Med (Cali)*. 2014;45(2):61-6.
116. Melo MF, Moreira OC, Tenorio P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Junior WO, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasites & vectors*. 2015;8:154.
117. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saude Publica*. 2003;37:107-15.
118. Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(2):129-32.
119. Sartori AM, Neto JE, Nunes EV, Braz LM, Caiaffa-Filho HH, Oliveira Oda C, Jr., et al. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*. 2002;186(6):872-5.
120. Siriano Lda R, Luquetti AO, Avelar JB, Marra NL, de Castro AM. Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(4):569-74.
121. Hanke J, Solinas-Toldo S, Hoheisel J. Genomanalyse und Gendiagnostik. In: Ganten D, Ruckpaul K, editors. *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p. 51-91.
122. Vargas-Parada L. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Nature Education*. 2010;3(9):63.
123. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
124. Graw J. *Genetik*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2010.
125. Hof H, Dörries R. *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
126. *Standard Operating Procedures (SOP)*. Pschyrembel Online: Walter de Gruyter GmbH; 2017.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin PD Dr. med. Nicole Berens-Riha und meinem Betreuer PD Dr. med. Michael Pritsch, die das Projekt ermöglichten, den Forschungsaufenthalt in Madrid organisierten, in sämtlichen Belangen ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten und mich stets unterstützt und bestärkt haben. Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Thomas Löscher, mittlerweile emeritierter Institutsleiter der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Universität München und seinem Nachfolger Prof. Dr. Michael Hölscher, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Realisierung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Gisela Bretzel, Laborleiterin am Tropeninstitut München, für die Möglichkeit, die Experimente an ihrem Institut durchzuführen. Zu speziellem Dank bin ich sämtlichen LabormitarbeiterInnen des Tropeninstituts München verpflichtet; allen voran Carolin Mengele und Kerstin Helfrich, die mir die Gegebenheiten am Labor vertraut gemacht haben und mir zu jeder Zeit mit helfender Hand und wertvollen Tipps zur Seite standen.

Die Finanzierung dieses Projekts erfolgte durch das Tropeninstitut München und das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung, wofür ich mich recht herzlich bedanke.

Nicht unerwähnt soll das Team der Abteilung für Parasitologie am Instituto de Salud Carlos III in Majadahonda, einem Vorort von Madrid, in Spanien bleiben. In kurzer Zeit und täglichen Überstunden bis spät nachts hat mir Dr. María Flores-Chavez die gängigen Methoden zur Chagas-Diagnostik beigebracht und ließ mich an ihrem immensen Fachwissen zur Diagnostik der Amerikanischen Trypanosomiasis teilhaben. Die Informationen dieser weltweit anerkannten Spezialistin auf dem Gebiet der Chagas-Diagnostik sollten sich während der Durchführung der Experimente und der Auswertung der Daten als unglaublich wertvoll und unverzichtbar herausstellen. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Die Gespräche mit zahlreichen an der Chagas-Erkrankung leidenden Menschen und deren Ärztinnen und Ärzte im Endemiegebiet in Bolivien hat mein Fachwissen über die Erkrankung grundsätzlich verändert. Ihnen allen gebührt zwar ein anonymer, aber besonderer Dank. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Prim. Dr. Bernhard Spechtenhauser bedanken, der einen beträchtlichen Anteil zur Ermöglichung dieser Begegnungen in Südamerika beigetragen hat.

Mein letzter und wohl bedeutendster Dank gebührt meiner Partnerin, meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden für deren immerwährende und uneingeschränkte Unterstützung.

## 10 Eidesstattliche Versicherung

### Eidesstattliche Versicherung

Seiringer, Peter Michael

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Etablierung eines Algorithmus für die molekulare Diagnostik der Amerikanischen Trypanosomiasis in Routinelaboratorien nach Vergleich von zwei konventionellen und zwei Real-Time PCR-Methoden**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 31.07.2018

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

