

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Innere Medizin VII, Tropenmedizin
(Schwerpunkt: Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin,
Humanparasitologie)

**Etablierung einer Multiplex-qPCR zur Detektion einer
Deletion des *pfhrp2*-Gens in *Plasmodium falciparum***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Trauner, Franziska Leonie

2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter: Juniorprofessor Dr. Matthias Willmann

Tag der Disputation: 08.10.2019

Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mir alles zutrauten wovon ich träumte und mich immerzu unterstützten. Ich danke euch.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Malaria allgemein	1
1.2	Diagnostik	1
1.3	Das <i>pfhrp2</i> -Gen	5
1.4	Konventionelle PCR und qPCR	6
1.5	Deletionen des <i>pfhrp2</i> -Gens	8
1.6	Zielsetzung und Fragestellung	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Laborgeräte	11
2.1.2	Reagenzien und Chemikalien	11
2.1.3	Kulturmedium	12
2.1.4	Kits zur DNA-Extraktion	12
2.1.5	Oligonukleotide	12
2.1.6	Zellkulturen	12
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.8	Software	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Parasitenkultur	13
2.2.2	Synchronisation der Parasiten	15
2.2.3	DNA-Extraktion	15
2.2.4	<i>P. falciparum</i> DNA-Standard	16
2.2.5	Sequenzen der Primer und Sonden	16
2.2.6	qPCR	18
2.2.7	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Primer und Sonden	37
3.1.1	Spezifität der <i>pfhrp2</i> - und <i>pfhrp3</i> -Primer	39
3.1.2	Spezifität der <i>pfhrp2</i> - und <i>pfhrp3</i> -Sonden	40
3.2	Singleplexreaktionen	42
3.2.1	Etablierung der Singleplexreaktionen im Rotorgene-Gerät	42
3.2.2	Etablierung der Singleplexreaktionen im LightCycler-Gerät	43
3.2.3	Standardkurven	45

3.3	Multiplexreaktionen.....	49
3.3.1	Duplexreaktion mit <i>pfhrp2</i> und <i>pfhrp3</i>	49
3.3.2	Triplexreaktion mit <i>pfhrp2</i> , <i>pfhrp3</i> und <i>pf β-tubulin</i> oder <i>pf cytochrom b</i>	51
3.3.3	4plex-Reaktion	53
4	Diskussion	71
4.1	Ergebnisse der Arbeit	71
4.2	Grenzen des Nachweises von <i>pfhrp2</i> -Deletionen	74
4.3	Fazit.....	76
4.4	Ausblick	76
5	Zusammenfassung.....	78
6	Literaturverzeichnis	80
7	Erklärung zum Eigenanteil	89
8	Anhang.....	91
8.1	Einzelergebnisse der Standarderstellung für Singleplexreaktionen für <i>pfhrp2</i> , <i>pfhrp3</i> , <i>pf β-tubulin</i> und <i>pf cytochrom b</i>	91
8.2	Ergebnisse der Standarderstellung für 4plex-Reaktionen für <i>pfhrp2</i> , <i>pfhrp3</i> , <i>pf β-tubulin</i> und <i>pf cytochrom b</i>	94

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATCC	American Type Culture Collection
BHQ	black hole quencher
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDC	United States Centers for Disease Control and Prevention
Cp/ Cq	quantification cycle
DNA	deoxyribonucleic acid
E	Effektivität
EQ	eclipse quencher
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FAM	6-Carboxyfluorescein
FIND	Foundation for Innovative New Diagnostics
Fwd	Forward-Primer
G	Guanin
HARP	Histidin-Alanin-reiches Protein
HEX	Hexachloro-fluorescein
HPLC	high performance liquid chromatography
IAC	internal amplification control
iRBC	infected red blood cells
IRC	inter-run calibrator
LNA	locked nucleic acid
LOD	limit of detection
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MGB	minor groove binder
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
P/ml	Parasiten pro Milliliter
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pf	Plasmodium falciparum
PfLDH	Plasmodium falciparum-spezifische Lactatdehydrogenase
PfHRP2/ 3	Plasmodium falciparum-spezifisches Histidin-reiches Protein 2/ 3
QN	QuantiNova Multiplex PCR Master Mix
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RDT	rapid diagnostic test
Rev	Reverse-Primer
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamine
RPMI Medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomal ribonucleic acid

SF	SensiFAST Probe No-ROX Mix
SM	SensiMix II Probe Kit
SD	standard deviation
T	Thymin
TF	TaqMan Multiplex Master Mix von Thermo Fisher
uRBC	uninfected red blood cells
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Malaria allgemein

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die durch Protozoen hervorgerufen wird. Die humane Malaria kann durch die folgenden fünf bisher bekannten Plasmodienarten verursacht werden: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium knowlesi*. Die durch *P. falciparum* verursachte Malaria tropica ist dabei die gefürchtetste, da es ohne Therapie häufig zu einem schweren Verlauf bis hin zum Tod kommen kann. In Afrika sind 99% der tödlich verlaufenden Malariafälle durch *P. falciparum* verursacht (WHO, 2017b).

Für 2016 wurde die Zahl der Malariainfektionen im WHO World Malaria Report 2017 auf 216 Millionen geschätzt; 445.000 davon verliefen tödlich. 90% der weltweiten Malariafälle und der tödlichen Malariaverläufe sind dabei in der WHO Region Afrika lokalisiert. Gefährdet für einen schweren Verlauf sind insbesondere Kleinkinder und Schwangere. Eine Studie aus 18 Subsahara-Ländern schätzt, dass 2016 39% der Kinder mit Fieber keine medizinische Versorgung erhielten (WHO, 2017b).

Entscheidend für die Malariaeradikation sind neben der Vektorkontrolle die frühzeitige medikamentöse Therapie, ein effizienter Impfstoff sowie eine zuverlässige Diagnostik.

1.2 Diagnostik

Zur Routinediagnostik werden primär Lichtmikroskopie und Schnelltests, sogenannte Rapid Diagnostic Tests (RDTs), verwendet. Sie haben den Vorteil, dass keine Laborausstattung benötigt wird und sie schnell Ergebnisse liefern. Damit kann eine schnelle Einleitung der Therapie, bzw. die Suche nach anderen Krankheitsursachen ermöglicht werden. Goldstandard ist die lichtmikroskopische Beurteilung eines mit Giemsalösung gefärbten Blutausstrichs (Warhurst and Williams, 1996). Unterschieden werden ein „dünnere“ und „dicker“ Blutausstrich („dicker Tropfen“).

Auch eine Diagnose mit konventioneller PCR oder quantitativer PCR (qPCR) ist möglich, spielt aber in der Routinediagnostik aufgrund des hohen Zeitaufwands keine Rolle. Auch die benötigte Laborinfrastruktur und der Kostenfaktor disqualifiziert die PCR zur Routinediagnostik in den meisten Endemiegebieten. Genutzt werden diese Methoden deshalb vor allem im wissenschaftlichen Kontext. Ihre Stärke ist die hohe Sensitivität und die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes (Kamau et al., 2011, Hermsen et al., 2001). Dies ermöglicht zum Beispiel bei Prävalenzerhebungen von Infektionen in Endemiegebieten auch die Detektion von submikroskopischen Parasitämien (Okell et al., 2009). Eine genaue Artbestimmung ist ebenfalls möglich (Veron et al., 2009, Perandin et al., 2004, Smythe et al., 1990, Farnert et al., 2001, Viriyakosol et al., 1995). Für die Diagnostik mit konventioneller PCR gibt es sehr viele veröffentlichte Primersequenzen, die zum Großteil die 18S rDNA als Zielsequenz haben. Zur *P. falciparum* Diagnostik mittels qPCR sind ebenfalls bereits mehrere Protokolle etabliert. Als Zielgene sind die 18S rDNA, *P. falciparum aquaglyceroporin* und *P. falciparum cytochrom b* beschrieben (Farrugia et al., 2011, Kamau et al., 2011, Rougemont et al., 2004, Lee et al., 2002, Padley et al., 2008, Veron et al., 2009, Wurtz et al., 2013).

Bei RDTs werden immunochromatographisch Plasmodien-spezifische Antigene (Proteine) im Blut nachgewiesen. Es gibt aktuell mehr als 80 Tests unterschiedlicher Hersteller zur Detektion von hauptsächlich zwei unterschiedlichen Antigenen, das Histidin-reiche Protein 2 (PfHRP2), das nur von *P. falciparum* exprimiert wird, und die Laktatdehydrogenase. Tests zur Detektion von PfHRP2 werden deutlich häufiger angewandt, da in Studien gezeigt wurde, dass die Tests sensitiver (Abba et al., 2011) und hitzestabiler sind (Chiodini et al., 2007). Was zum Teil auch an PfHRP2 selbst liegt, das sehr stabil ist, in großen Mengen von *P. falciparum* exprimiert wird und lange im Blut nachweisbar ist. Die Laktatdehydrogenase (LDH) wird von allen humanpathogenen Plasmodienarten exprimiert, mit Spezies-spezifischen Unterschieden, und durch die Gewinnung und Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper in den entsprechenden RDTs, lassen sich die Arten unterscheiden (Abba et al., 2011). Ein Nachteil der RDTs mit PfHRP2 ist es,

dass das Protein, auch wenn im Blut keine Parasiten mehr sind, noch mehrere Wochen nachweisbar bleibt (Mayxay et al., 2001, Uguen et al., 1995, Kyabayinze et al., 2008). Dies kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. LDH dagegen wird schneller aus dem Blut eliminiert. Allerdings sind LDH-basierte RDTs viel weniger sensitiv als PfHRP2-basierte RDTs (Li et al., 2017, Brown et al., 2004). Die WHO in Zusammenarbeit mit FIND testet regelmäßig die Performance der RDTs und veröffentlicht eine Liste an empfohlenen Produkten. Bislang gibt es keine verlässliche Alternativen zu PfHRP2-basierten RDTs (WHO, 2017a).

In PfHRP2-RDTs reagiert durch die hohe Ähnlichkeit der Proteine auch ein weiteres Histidin-reiches Protein mit den Antikörpern: PfHRP3. Dadurch konnte bei D10, einem Laborstamm von *P. falciparum*, der PfHRP2 nicht exprimiert, bei einer Parasitämie von mehr als 1000 Parasiten/ μ l ein positiver RDT beobachtet werden (Baker et al., 2005).

Eine unkomplizierte Malaria kann sich schnell zu einer schweren Verlaufsform weiter entwickeln. Deshalb gilt als Kernprinzip schnelle Diagnostik und prompte, effektive Therapie innerhalb 24-48h nach Einsetzen der ersten Symptome (WHO, 2015). Seit 2010 fordert die WHO bei allen Fällen mit Verdacht auf Malaria eine parasitologische Diagnostik per Mikroskop oder RDT, bevor Patienten mit Malariamedikamenten behandelt werden. Hintergrund ist, dass in Malaria-endemischen Ländern, also oft armen Ländern, fiebernde Patienten sehr häufig auf Verdacht hin mit Malariamedikamenten behandelt wurden. Der verbreitete und ggf. unnötige Einsatz beschleunigt die Resistenzentwicklung der Parasiten einerseits und andererseits erhält der Patient keine adäquate Therapie, wenn andere Ursache zu Grunde liegen (z.B. bakterielle Infektionen, etc.). Eine Behandlung auf Verdacht soll nur durchgeführt werden, wenn die Diagnostik innerhalb von 2h nach Eintreffen des Patienten in einem „point of care“ nicht möglich ist (WHO, 2010). Die WHO berichtet in ihrem World Malaria Report von 2016 durch Auswertung von Daten der nationalen Malariakontrollprogramme von einem Anstieg des Anteils der bei Malariaverdacht getesteten Fälle. Insbesondere in der WHO Region Afrika stieg

der Anteil von 40% in 2010 auf 76% in 2015. Bei 74% wurde die Diagnostik mit RDTs durchgeführt (WHO, 2016b).

In den letzten Jahren wurden vor allem in Afrika die RDTs immer weiter verbreitet. 2016 wurden insgesamt 312 Millionen RDTs ausgeliefert. Davon 296 Millionen in die WHO Region Afrika (WHO, 2017b).

Deshalb sollen im Folgenden die RDTs der Diagnose per Lichtmikroskopie kurz gegenübergestellt sowie Vor- und Nachteile betrachtet werden. Für die mikroskopische Diagnose sind gut geschultes Personal, ein geeignetes Mikroskop mit verlässlicher Stromversorgung und entsprechende Reagenzien für die Färbung nötig. Insbesondere trainiertes und erfahrenes Personal, das zuverlässig im Blutaussstrich Malariaparasiten von Artefakten unterscheiden kann, ist häufig nicht vorhanden. Der Umgang mit RDTs kann dagegen leicht erlernt werden und es wird außer dem gelieferten Set aus Teststreifen und Pufferlösung kein weiteres Material oder Laborausstattung benötigt. Auch in der Schnelligkeit bis Erhalt des Ergebnisses sind die RDTs der Mikroskopie überlegen. Somit wird vor allem in entlegenen Regionen und Orten, in denen Malariadiagnostik nur selten angewandt wird eine verlässlichere Diagnostik ermöglicht. Allerdings muss dabei auch bedacht werden, dass RDTs im Gegensatz zur Mikroskopie keine Aussage über die Höhe der Parasitämie machen können. Die in RDTs als Antigen genutzten Proteine werden nur verzögert eliminiert (Mayxay et al., 2001). Dadurch kann das Therapieansprechen im Gegensatz zur Mikroskopie in RDTs nicht beurteilt werden. Außerdem können nicht alle RDTs zwischen unterschiedlichen Spezies unterscheiden. Die Sensitivität der RDTs nimmt bei niedrigen Parasitämien deutlich ab (WHO, 2017a). Um von der WHO empfohlen zu werden müssen RDTs ein Detektionslimit von mindestens 200.000 Parasiten/ml haben. Die Sensitivität der Mikroskopie hängt stark von den Mikroskopisten ab (Kilian et al., 2000). Unter Feldbedingungen erreichen erfahrene Wissenschaftler ein Detektionslimit von 50.000-100.000 Parasiten/ml Blut (Wongsrichanalai et al., 2007).

1.3 Das *pfhrp2*-Gen

Bei den meisten RDTs wird PfHRP2 zur Detektion einer Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen. Es ist spezifisch für *P. falciparum*, da die anderen Plasmodienarten kein *pfhrp2* Gen haben. *Pfhrp2* ist als einfache Kopie (single copy gene) subtelomerisch auf Chromosom 8 lokalisiert (Scherf and Mattei, 1992, Wellems and Howard, 1986) und ist 1063bp lang (entsprechend dem Referenzgenom von *P. falciparum* Stamm 3D7). Es setzt sich aus 2 durch ein Intron getrennte Exons zusammen, wobei Exon 2 die Aminosäuresequenz des PfHRP2-Proteins codiert. Dieses Protein wird in allen erythrozytären Entwicklungsstadien von *P. falciparum* exprimiert (Kemp et al., 1987), in das Zytosol des infizierten Erythrozyten exportiert (Howard et al., 1986) und wird durch Ruptur der Erythrozyten ins Blut des Malariapatienten freigesetzt. (Parra et al., 1991). Die Funktion von PfHRP2 in *P. falciparum* ist nicht endgültig geklärt. Mashima et al. (2002) beobachteten, dass PfHRP2 in einem Komplex mit Ferri-Protoporphyrin IX (FePPIX) die Autooxidation von Ascorbat hemmt. Auch Beteiligung an der Kristallisierung von Hämozoïn (Sullivan et al., 1996), Hemmung von Antithrombin (Ndonwi et al., 2011) und die Störung der Blut-Hirn-Schranke (Pal et al., 2016) wird beschrieben. Das Fehlen von PfHRP2 scheint keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit des Parasiten zu haben und ist insoweit nicht essentiell für *P. falciparum*, sodass auch eine Infektion mit PfHRP2-negativen Parasiten zu einer symptomatischen Infektion und einer Übertragung der Parasiten führt (Rock et al., 1987, Gamboa et al., 2010, Kemp et al., 1987).

Das Gen besteht aus zahlreichen Alanin- und Histidin-reichen Wiederholungssequenzen und ist sehr variabel in seiner Basenfolge und Länge (Deme et al., 2014, Li et al., 2015, Kumar et al., 2012, Baker et al., 2010, Baker et al., 2005, Bharti et al., 2016). Der Längenunterschied kann insbesondere auf die Anzahl der Wiederholungssequenzen zurückgeführt werden (Baker et al., 2005). Trotz dieser starken Variationen konnte bei einer Untersuchung von Baker et al. (2010) kein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen Genstruktur und Sensitivität der RDTs bei 200 Parasiten/ μ l erkannt werden.

P. falciparum exprimiert noch zwei weitere Histidin-reiche Proteine: PfHRP1/ knob-assoziiertes PfHRP und PfHRP3/ small HARP. Im Vergleich der Gensequenz des Parasitenstamms 3D7 stimmen die Basen des *pfhrp3*-Gens zu 72,4% mit dem des *pfhrp2*-Gens überein. Es wird angenommen, dass sich diese beiden aus dem gleichen Vorläufergen entwickelten (Wellems and Howard, 1986).

1.4 Konventionelle PCR und qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. In dieser Arbeit wird die quantitative PCR (qPCR, auch: Real-Time PCR) als Methode verwendet. Deshalb werden im Folgenden die entscheidenden Vor- und Nachteile dieser Methode gegenüber der konventionellen PCR (kurz: PCR) dargelegt.

Bei der PCR wird am Ende der Amplifikationszyklen das Produkt zum visuellen Nachweis mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff gemischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Angetrieben durch elektrische Spannung bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode und werden entsprechend ihrer Länge (Anzahl der Basen) durch die Poren im Agraosegel aufgetrennt. Die Länge ist der einzige Parameter um Amplifikate voneinander zu unterscheiden. Die Auswertung erfolgt rein visuell. Im Gegensatz dazu wird bei der qPCR mit einer DNA-spezifischen Sonde jedes Amplifikat während seiner Zunahme mit Farbstoff sichtbar gemacht. Die Fluoreszenzintensität nimmt mit zunehmender Amplifikatmenge zu. Die Fluoreszenzintensität wird von Photomultipliern während der Amplifikation detektiert. Daraus lässt sich der Cq-Wert (quantification cycle) berechnen. Dies ermöglicht eine quantitative und objektive Auswertung der Experimente und anschließende statistische Berechnungen (Heid et al., 1996). Da bei der PCR im Gegensatz zur qPCR zur Auswertung eine Weiterverarbeitung der Amplifikate nötig ist, sind mehrere Arbeitsschritte mit einhergehender Laborausstattung nötig.

Die DNA-Amplifikation verläuft in drei Phasen. In der ersten Phase kommt es zu einer Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus (bei einer angenommenen

Effektivität von 100%). Dies entspricht einer exponentiellen Zunahme. In der zweiten linearen Phase sind die Substrate der Reaktion langsam aufgebraucht und die Effektivität der Amplifikation nimmt dadurch ab. In der dritten Phase sind keine Substrate verblieben und es kommt zu keiner weiteren Amplifikation. Diese wird Plateauphase genannt. In der konventionellen PCR wird das analysierte Produkt aus dieser Phase gewonnen (Endpunktmessung). In der qPCR wird die exponentielle Phase zur Analyse herangezogen. Das ist möglich, da die Fluoreszenzintensität kontinuierlich während des Verlaufs erfasst wird. Werden Replikate der gleichen Probe untersucht zeigt sich, dass sie gleiche C_q-Werte, aber unterschiedliche DNA-Mengen in der Plateauphase erreichen. Das liegt an der individuellen Kinetik der Reaktionen nachdem die Substrate nicht mehr im Überfluss vorliegen. Die DNA-Menge am Ende der Amplifikation wird darüber hinaus noch davon beeinflusst, dass es mit der Zeit zum Abbau von DNA kommt. In der qPCR wird die Zunahme der DNA-Menge davon unabhängig gemessen. Ein Abbau beeinflusst das Ergebnis nicht. Das Ergebnis der qPCR korreliert also stärker mit der Ausgangs-DNA-Menge, als die DNA-Menge, die in der konventionellen PCR analysiert wird (Mackay, 2007). Zur Quantifizierung des Ausgangsmaterials können beide Methoden herangezogen werden. Beide vergleichen das Signal des Amplifikats mit dem einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentration. Die Mengenbestimmung der PCR geschieht anhand des Vergleichs der Signalintensität und Ausdehnung der Bande der Probe und der des Standards. Für die Quantifizierung in der qPCR wird die Regressionsgerade, die den Zusammenhang der C_q-Werte der Verdünnungsreihe mit deren logarithmisch aufgetragenen DNA-Ausgangsmenge beschreibt bestimmt. Die DNA-Ausgangsmenge der Probe kann dann aus deren C_q-Wert errechnet werden. In Auflösung und Reproduzierbarkeit ist die qPCR damit der konventionellen PCR deutlich überlegen (Bustin, 2000). Außerdem ermöglicht die qPCR eine automatisierte, schnelle und parallele Bearbeitung vieler Proben (Heid et al., 1996). Ein weiterer Vorteil der qPCR ist, dass mehrere Zielsequenzen in eine Reaktion integriert werden können. Solche Multiplexreaktionen sparen Probenmaterial und ermöglichen es eine interne Kontrolle mit einzuschließen (Bustin, 2000,

Wittwer et al., 2001, Edwards and Gibbs, 1994). Für die konventionelle PCR sprechen die geringeren Kosten für Geräte und Reagenzien, allerdings ist sie allgemein nicht so sensitiv wie eine qPCR.

1.5 Deletionen des *pfhrp2*-Gens

Gamboa et al. berichteten 2010 erstmals von *P. falciparum* Stämmen in Peru, die durch PfHRP2-basierte RDTs nicht nachgewiesen werden konnten, weil sie eine Deletion des *pfhrp2*-Gens hatten (Gamboa et al., 2010). Eine nachfolgende, retrospektive Studie konnte zeigen, dass es in der Loreto-region in Peru zu einem Anstieg des Anteils an Parasiten mit *pfhrp2*-Gendeletionen kam. Die Proben von 1998-2001 zeigten Deletionen in 21% der untersuchten Parasiten, die Proben von 2003-2005 zeigten dagegen bereits 41% (Akinyi et al., 2013).

Mittlerweile wurden *P. falciparum* Stämme mit *pfhrp2*-Gendeletionen in allen Malariaregionen weltweit nachgewiesen. In Südamerika ist die Verbreitung mit bis zu 50% besonders hoch. (Menegon et al., 2017, Houze et al., 2011, Kumar et al., 2012, Koita et al., 2012, Kozycki et al., 2017, Parr et al., 2017, Amoah et al., 2016, Bharti et al., 2016, Li et al., 2015, Atroosh et al., 2015, Deme et al., 2014, Wurtz et al., 2013, Fontecha et al., 2018, Plucinski et al., 2018) Der Nachweis in den entsprechenden Studien erfolgte immer mittels PCR auf den *pfhrp2*-Locus. Wurde kein optisches Signal im Agarosegel visuell detektiert, wird von einer *pfhrp2*-Deletion ausgegangen. Zusätzlich wird in den Studien auch die Parasitämie kontrolliert. Weitere Kontroll-PCRs sollen externe Faktoren (z.B. Inhibitoren in den DNA-Proben) als Ursache für eine fehlende Amplifikation ausschließen. Durch die Gendeletion wird PfHRP2 nicht exprimiert und es kann auch bei bestehender *P. falciparum* Infektion zu einem negativen Ergebnis im RDT kommen. Teilweise kann es durch PfHRP3 trotzdem zu einer schwach positiven Bande im RDT kommen (Baker et al., 2005). Der Effekt von PfHRP3 ist allerdings nicht systematisch untersucht. Die WHO rät die geographische Verteilung der Deletionen zu untersuchen, um so gegebenenfalls andere RDTs zu entwickeln und einzusetzen (WHO, 2016a).

In *in vitro* gehaltenen Laborstämmen wurden bereits früher Deletionen von Genabschnitten, die *pfhrp2* enthalten beschrieben (Kemp et al., 1987, Pologe and Ravetch, 1988, Scherf and Mattei, 1992).

Auch unabhängig von *pfhrp2*-Deletionen kann es in RDTs zu variablen Ergebnissen kommen (Abba et al., 2011) und auch viele andere Faktoren können zu falsch negativen Ergebnissen führen. Über die in den RDTs verbauten monoklonalen Antikörper gibt es nicht viele Informationen. Es ist nicht klar welche Klone verwendet wurden und welche Epitope diese erkennen, bzw. ob und inwiefern sie sich in der Epitoperkennung unterscheiden. Außerdem haben die Herstellungsqualität, die Lagerbedingungen des Testsets (Chiodini et al., 2007), mangelhafte Ausführung und die Interpretation des Testergebnisses durch den Nutzer (Rennie et al., 2007, Harvey et al., 2008) einen großen Einfluss auf das Ergebnis. Auch eine Veränderung auf Parasitenseite kann ursächlich sein. Ein verändertes Zielprotein, z.B. durch mutationsbedingte Veränderung der Aminosäuresequenz, vor allem der für die Antikörper genutzten Epitope oder eine Nullmutation kann Ursache eines falsch-negativen RDTs sein. Darüber hinaus können sowohl sehr geringe, als auch hohe Parasitämien, bzw. Antigenmengen im Blut zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Luchavez et al., 2011).

Für LDH ist keine Deletion im *P. falciparum*-Genom bekannt und da es sich um ein essentielles Enzym des Parasitenstoffwechsels handelt auch sehr unwahrscheinlich (Turgut-Balik et al., 2004).

Die Zuverlässigkeit von RDTs in Regionen mit *pfhrp2*-Deletionen ist deutlich erniedrigt. Die Folgen von falsch negativer Diagnostik von *P. falciparum* Infektionen kann durch ausbleibende Behandlung schwerwiegende Folgen haben. In vielen Endemiegebieten in Afrika gibt es kaum gut erhobene Daten über den *pfhrp2*-Status der dortigen Parasitenpopulation.

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

In vielen Regionen weltweit wurden bereits *P. falciparum* Stämme gefunden, die PfHRP2 nicht exprimieren, da sie das entsprechende Gen nicht mehr im

Genom tragen. Das kann zu einem falsch-negativen Ergebnis des PfHRP2-basierten RDTs führen. Im schlimmsten Fall bleibt dann eine notwendige Malariatherapie aus und der Patient kann daran versterben. Unbehandelt können sich diese Parasiten ggf. vermehrt ausbreiten. Bislang werden in entsprechenden epidemiologischen Studien *pfhrp2*-Gendeletionen mittels PCR indirekt nachgewiesen – wird keine Amplifikation detektiert wird dies einer Gendeletion gleichgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals eine qPCR zur Detektion von *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Deletionen etabliert werden. Die qPCR ist in vielen Fällen sensitiver als eine PCR, liefert objektive und quantifizierbare Ergebnisse und ermöglicht den effizienten Durchsatz vieler Proben, wie sie bei epidemiologischen Studien notwendig werden. Zudem können mehrere Parameter parallel in einer einzigen Probe gemessen werden.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer Multiplex-qPCR zur simultanen Detektion von vier unterschiedlichen Genen. Neben *pfhrp2* und *pfhrp3*, die wichtig für die RDT-Diagnostik sind, soll *pf β-tublin* und *pf cytochrom b* detektiert werden. *Pf β-tublin* ist wie *pfhrp2* und *pfhrp3* ein “single copy gene” und dient hier entsprechend als Kontrollgen für die Amplifizierbarkeit. *Pf cytochrom b* dient dem Nachweis und der Quantifizierung einer *P. falciparum* Infektion. Zunächst wurde für jedes einzelne Gen das qPCR-Protokoll entwickelt und dann schrittweise zur Multiplex-qPCR kombiniert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Assayparameter validiert, die Spezifität für das jeweilige Gen sowie das entsprechende Detektionslimit bestimmt.

Das entwickelte Multiplex-qPCR-Protokoll soll über die Arbeit hinaus anschließend zum Screening von klinischen Isolaten aus Gabun eingesetzt werden. Hier wird zu Zeit eine epidemiologische Studie durchgeführt, mit dem Ziel die Prävalenz der *pfhrp2* und *pfhrp3* Deletionen in Gabun zu bestimmen (Kreidenweiss et al., 2019).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

Funktion	Artikel	Hersteller
Zellzählung	BD FACSCanto II Flow Cytometer	BD Biosciences
qPCR-Geräte	LightCycler 480 II	Roche
	Rotor-Gene 3000	Corbett Research
Pipettierroboter	QIAgility	Qiagen
automatische DNA- Extraktion	QIASymphony SP instrument	Qiagen
Parasiten- synchronisation	MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich	R0883
Albumax II	Thermo Fisher	11021-037
L-Glutamin	Thermo Fisher	25030-024
Hepes-Puffer	Sigma-Aldrich	H0887
Gentamycin	Thermo Fisher	15750-045
Sorbitol	Applichem	A4992,1000
Giemsa	Merck	1092041000
Methanol	AnalaR Normapur	20847
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	H1399
TaqMan Multiplex Master Mix	Thermo Fisher Scientific	4461881
SensiMix II Probe Kit	Bioline GmbH	BIO-83005
SensiFAST Probe No-ROX Mix	Bioline GmbH	BIO-86005

QuantiNova Multiplex PCR Master Mix	Qiagen	208452
Wasser HiPerSolv CHROMANORM für die HPLC	VWR	23595.328

2.1.3 Kulturmedium

Tabelle 3: Zusammensetzung Zellkulturmedium „Complete Medium“

Bezeichnung	Zusammensetzung
Complete Medium	500 ml RPMI-1640 Medium, 50 ml Albumax II Lösung, 12 ml HEPES-Puffer, 6 ml L-Glutamin (200mM), 500 µl Gentamycin (50 mg/ml)

2.1.4 Kits zur DNA-Extraktion

Tabelle 4: Verwendete Kits zur DNA-Extraktion

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen	51104
QIASymphony DSP DNA midi kit	Qiagen	937255

2.1.5 Oligonukleotide

Alle Primer und Sonden mit Ausnahme der Sonde für das Gen *pf cytochrom b* (Sigma Aldrich, St. Louis (USA)), wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg synthetisiert. Sequenzen und Modifikationen (s. 2.4.5).

2.1.6 Zellkulturen

Die verwendeten *P. falciparum* Laborstämme 3D7, Dd2 und HB3 wurden ursprünglich von Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (ATCC, USA) bezogen.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
LD Columns	Miltenyi Biotec GmbH	130-042-901
LightCycler 480 Multiwell Plates 384, white	Roche	04729749001
Tubes 0,2ml (VE1000) für Rotor-Gene	LTF-Labortechnik GmbH & Co.KG	Art. 102.0150
50µl Conductive Filtered Tips for QIAgility	Qiagen	990512

2.1.8 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Artikel	Anbieter
MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets)	https://www.megasoftware.net (Kumar et al., 2016)
Geneious 11.0.3.	Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand, https://www.geneious.com (Kearse et al., 2012)
LightCycler 480 Software 1.5.1	Roche
Rotor-Gene Software	Corbett Research

2.2 Methoden

2.2.1 Parasitenkultur

Die DNA von Laborstämmen von *P. falciparum* wurden als Positivkontrollen in den Experimenten eingesetzt. Hierzu wurden die erythrozytären Stadien *in vitro* kultiviert. Als Laborstämme wurden 3D7, HB3 und Dd2 verwendet. Zur Übersicht der Genotypen siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: *P. falciparum* Stämme 3D7, Dd2 und HB3 (+ = Gen vorhanden; - = Gendeletion)

<i>P. falciparum</i> -Stamm	<i>pf cytochrom b</i>	<i>pf β-tubulin</i>	<i>pfhrp2</i>	<i>pfhrp3</i>
3D7	+	+	+	+
Dd2	+	+	-	+
HB3	+	+	+	-

Die Parasiten wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurden die Parasiten in 0^+ -Erythrozytenkonzentrat bei einem Hämatokrit von 2,5% und „Complete Medium“ (Zusammensetzung s. 2.1.3) kultiviert. Das Gesamtvolumen der Kultur betrug 20 ml. Kultiviert wurden die Parasiten im Brutschrank bei 37°C, 5% O₂ und CO₂. Das Medium wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht. Die Parasitämie wurde standardmäßig lichtmikroskopisch bestimmt. Dafür wurde nach Abnahme von ca. 15 ml Medium ein dünner Ausstrich aus einem Tropfen des Bodensatzes auf einem Objektträger angefertigt. Nach der Trocknung erfolgte die Fixierung für 10 sec in 100% Methanol. Nach erneutem Trocknen erfolgte die Färbung in 5%-iger frischer Giemsalösung für 15-20 min. Nach dem Abspülen der Lösung mit destilliertem Wasser wurde der getrocknete Objektträger bei 100-facher Vergrößerung mit Immersionsöl untersucht. Pro Ausstrich wurden mindestens 1000 Erythrozyten ausgezählt. Aus dem Anteil der parasiteninfizierten Erythrozyten an der Gesamterthrozytenzahl ergibt sich die Parasitämie in Prozent. Durch Verdünnung mit nicht infizierten Erythrozyten sollte die Parasitämie bei 1-2% gehalten werden. Zur Erstellung des *P. falciparum*-DNA-Standards wurde die Parasitämie durch Bestimmung des Mittelwerts aus der lichtmikroskopisch ermittelten Parasitämie (2000 Erythrozyten durch erfahrene MTA ausgezählt) und der Durchflusszytometrie berechnet. Hierfür wurden die infizierten Erythrozyten mit Hoechst 33342 angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und färbt deshalb nur infizierte Erythrozyten an. Diese enthalten im Gegensatz zu nichtinfizierten kernlosen Erythrozyten DNA.

2.2.2 Synchronisation der Parasiten

Im erythrozytären Zyklus des Parasiten befinden sich diese in verschiedenen Stadien (Ringstadium (unreifer Trophozoit), Trophozitenstadium (reifer Trophozoit), Schizontenstadium). Durch eine Sorbitolbehandlung oder eine magnetische Separation können die Parasiten synchronisiert werden, d.h. in der Kultur befinden sich alle Parasiten im (ungefähr) gleichen Stadium. Hierzu wurden die Parasiten entweder mit Sorbitol oder durch magnetische Separation (MACS) synchronisiert. Die Sorbitolbehandlung erfolgte mit 5%-Sorbitol (in H₂O, steril filtriert) für 5 min und zwei Waschschritten mit Parasitenmedium und Zentrifugation (400xg, 5 min). Anschließend wurden die Parasiten wieder in Kultur genommen. Für die magnetische Separation wurden LD Säulen verwendet und der Durchfluss (enthält v.a. Ringe) wurde wieder in entsprechend 2.2.1 in Kultur genommen. Die Synchronisation wurde im Abstand von zwei Tagen wiederholt, bis über 95% der Parasiten im Ringstadium vorlagen.

2.2.3 DNA-Extraktion

Zur Etablierung, sowie für Positiv- und Negativkontrollen wurde die DNA mit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit manuell extrahiert.

Hierzu wurden 50 µl des Kulturpellets der Parasitenkultur (besteht aus *P. falciparum* infizierten (iRBC) und nicht-infizierten Erythrozyten (uRBC), sowie einem geringen Rest Parasitenmedium) mit 150 µl PBS verdünnt und zur DNA-Extraktion entsprechend des Protokolls eingesetzt. Die Waschschrritte wurden intensiviert (550µl Waschpuffer, zweimal waschen). Die DNA wurde mit 100 µl Elutionspuffer eluiert. Zur Herstellung des *P. falciparum* DNA Standards (s. 2.2.4) erfolgte die DNA Extraktion mit einem Robotersystem (QIASymphony SP instrument) unter Benutzung des QIASymphony DSP DNA midi kits (Kreidenweiss et al., 2019).

2.2.4 *P. falciparum* DNA-Standard

Zur Evaluierung des Singleplex- und etablierten 4plex qPCR Assays wurde aus *P. falciparum* Kulturen (3D7) eine Parasitenverdünnungsreihe erstellt (Kreidenweiss et al., 2019). Zunächst wurde die Kultur synchronisiert (s. 2.2.2). Parasiten im Ringstadium (95%) wurden zur Herstellung des Standards entsprechend der *Standard Operating Procedures* des Instituts für Tropenmedizin, UKT Tübingen (Lalremruata, 2016) eingesetzt. Hierzu wurde die Parasitenkultur mit Vollblut in einem bestimmten Verhältnis verdünnt und dann zur DNA-Extraktion eingesetzt.

Das Kulturpellet (enthält infizierte (iRBC) und nicht-infizierte Erythrozyten (uRBC)) wurde mit Kulturmedium auf die Ausgangskonzentration von 6×10^7 Parasiten/ml verdünnt. Dabei wurde von 6×10^7 Parasiten/ml und $2,04 \times 10^7$ Parasiten/ml ausgehend jeweils eine 1:10-Verdünnungsreihe gemacht. 150 μ l jeder Verdünnungsstufe wurde dann mit 1,35 ml humanem, naivem mit EDTA antikoaguliertem Vollblut aufgefüllt.

Die Extraktion der DNA erfolgte maschinell mit QIASymphony und wurde in 100 μ l Elutionspuffer eluiert. Die extrahierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.5 Sequenzen der Primer und Sonden

Insgesamt wurden sowohl in der Single- als auch in der Multiplexreaktion vier Gene mittels qPCR analysiert: *pfhrp2*, *pfhrp3*, *pf β -tubulin*, und *pf cytochrom b*. *Pf β -tubulin* ist, wie *pfhrp2* und *pfhrp3* ein „single copy gene“ und hat in der Multiplexreaktion die Funktion einer internen Kontrolle für die Amplifikationsleistung eines „single copy genes“. Hiermit sollen falsch negative *pfhrp2*- und/ oder *pfhrp3*-Ergebnisse aufgrund einer zu geringen Ausgangsmenge oder durch Inhibition ausgeschlossen werden. Die Sequenzen von *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Primer und -Sonden wurden selbst entwickelt. Die Sequenzen für *pf β -tubulin*, und *pf cytochrom b* wurden aus Publikationen übernommen (Farrugia et al., 2011, Price et al., 2004).

Die gewählten Sonden sind Hybridisierungssonden mit einem „dual label“. Bei dieser Technik wird an das eine Ende der Sonde ein Reporterfarbstoff und an

das andere ein „quencher“ gebunden. Dieser unterdrückt bei räumlicher Nähe das Signal des angeregten Reporterfarbstoffs. Zu Beginn der Reaktion kann folglich kein Fluoreszenzsignal gemessen werden. Wird im Rahmen der Elongation durch die Exonukleasefunktion der DNA-Polymerase die Sonde hydrolysiert, entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und die Unterdrückung der Reporterfluoreszenz fällt weg. Damit steigt die messbare Fluoreszenz mit jeder Amplifikation. Voraussetzung für die Unterdrückung der Fluoreszenz durch den „quencher“ ist ein sich überlappendes Wellenlängenspektrum von Reporterfarbstoff und „quencher“. Hier werden „Black Hole Quencher“ (BHQ) und „Eclipse Quencher“ (EQ) verwendet. Beide sind nicht-fluoreszierende Farbstoffe (Dark Quencher) und führen deshalb zu einer geringen Hintergrundfluoreszenz in den Detektionskanälen. Sie unterscheiden sich in ihrem Absorptionsbereich.

Die *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Sonden wurden mit dem Ziel eine höhere Spezifität zu erreichen modifiziert. Die Sonden für *pfhrp2* und *pfhrp3* sind an ihrem 3'-Ende an ein „minor groove binder“ (MGB)-Molekül gebunden, das sich in die kleine Furche (minor groove) der DNA einlagert. Dies stabilisiert die Bindung. Dadurch haben 3'-MGB-Sonden eine erhöhte Schmelztemperatur. Dies ermöglicht die Wahl von im Vergleich zu unmodifizierten kürzeren Sonden (Kutyavin et al., 2000, Lukhtanov et al., 1995).

Die Sonde für *pf cytochrom b* enthält „locked nucleic acids“ (LNA). Dabei handelt es sich um ein Nukleinsäureanalogon, das eine 2'-O - 4'-C - Methylenbrücke enthält und dadurch eine starre bityklische Konfiguration bildet. Durch diese Modifikation kommt es zu einer höheren Bindungsaffinität und Spezifität. Die Schmelztemperatur der gebildeten Sonden-DNA-Duplex ist dadurch erhöht (Singh et al., 1998).

Tabelle 8: Primer und Sonden von *pfhrp2* und *pfhrp3* (Kreidenweiss et al., 2019), *pf β-tubulin* (Price et al., 2004) und *pf cytochrom b*; Fwd =Forward-/ Vorwärts-Primer, Rev =Reverse-/ Rückwärts-Primer, MGBEQ= minor groove binder Eclipse Quencher, BHQ2 =Black Hole Quencher 2, + = nachfolgende Base ist „locked nucleic acid base“

Gen	Oligo	Sequenz 5'-3'	Modifikation		Amplikonlänge
			5'-Ende	3'-Ende	
<i>pfhrp2</i>	Fwd	AGGACTTAATTTA AATAAGAGATTA			78 bp
	Rev	GCTACATGATGA GCATGA			
	Sonde	TACACGAAACTC AAGCACA	HEX	MGBEQ	
<i>pfhrp3</i>	Fwd	AGGACTTAATTC AAATAAGAGATT A			79 bp
	Rev	AGCTACATGATG TGCATGA			
	Sonde	GAAAGTCAAGCA CATGCAG	FAM	MGBEQ	
<i>pf β-tublin</i>	Fwd	TGATGTGCGCAA GTGATCC			79 bp
	Rev	TCCTTTGTGGAC ATTCTTCCTC			
	Sonde	TAGCACATGCCG TTAAATATCTTCC ATGTCT	Cyanine 5	BHQ2	
<i>pf cytochrom b</i>	Fwd	TACTAACTTGTTA TCCTCTATTCCA GTAGC			240 bp
	Rev	CCTTTAACATCAA GACTTAATAGATT TGGA			
	Sonde	G+TGC+TAC+CAT +GTA+AAT+GTAA	ROX	BHQ2	

2.2.6 qPCR

Das Protokoll für die qPCR wurde schrittweise etabliert. Zunächst als Singleplex-Protokoll, dann als Multiplex. Zu Beginn wurde das Rotor-Gene 3000-qPCR Gerät und dann der LightCycler 480 II verwendet. Als

Positivkontrollen wurde die DNA der *P. falciparum* Laborstämme (3D7, Dd2 und HB3) eingesetzt – entweder direkt aus der Kultur oder versetzt mit Vollblut. Wasser, Medium und Vollblut wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

2.2.6.1 qPCR mit Rotor-Gene 3000

Die Experimente am Rotor-Gene 3000 wurden in einzelnen 200 µl Rörchen auf einem 36-well Rotor durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die folgenden voreingestellten Filterkanäle wurden gewählt.

Tabelle 9: Wellenlängenbereich der Filterkanäle im Rotor-Gene 3000

Reporterfarbsoff	Exzitation/ Emission
FAM	495-520 nm
HEX	520-548 nm
Cy5	649-670 nm
ROX	575-602 nm

Die Errechnung der Cq-Werte erfolgte über die Herstellersoftware. Dabei wurde die Funktion „automatic threshold“ verwendet. Der Cq-Wert ist als Zyklus in dem die gemessene Fluoreszenz erstmals den Grenzwert (threshold) übersteigt definiert. Die Optionen „Dynamic Tube“ und „Slope Correct“ wurden zur Normierung bezüglich der Hintergrundfluoreszenz ausgewählt. Ein Cq-Wert >40 wird als negativ gewertet (Bustin et al., 2009).

2.2.6.2 qPCR mit LightCycler 480 II

Die Experimente wurden auf einer weißen LightCycler 480 Multiwell Plate 384 durchgeführt. Das Reaktionsvolumen war 10 µl oder 20 µl.

Tabelle 10: Wellenlängenbereiche der Filterkanäle im LightCycler 480 II

Reporterfarbstoff	Exzitation/ Emission
FAM	465-510 nm
HEX	533-580 nm
Cy5	618-660 nm
ROX	533-610 nm

Da sich die Emissionsspektren der in der Multiplex-qPCR verwendeten Reporterfarbstoffe überlappen, wird bei bestimmten Wellenlängen teilweise auch die Emission eines anderen Farbstoffs gemessen. Damit kann die Fluoreszenzkurve des eigentlich für diesen Kanal vorgesehenen Farbstoffs verfälscht werden. Um dies für die Auswertung zu korrigieren wurde für die Multiplex-qPCR eine Farbkompensationsmessung durchgeführt. Dafür wurden Singleplexreaktionen aller vier Primer-Sonden-Kombinationen mit einer Positivkontrolle (3D7-DNA) sowie ein fünfter Ansatz mit Wasser statt mit einem Primer-Sondenset mit Thermo FisherTaqMan Multiplex Master Mix angesetzt. Das gleiche wurde auch mit dem SensiMix II Probe Kit durchgeführt. Jede Kombination wurde fünfmal ausgeführt. Für jeden der Ansätze wird ein dominanter Detektionsbereich bestimmt.

Am Ende des Standardreaktionsprogramms (Aktivierung der Polymerase 95°C für 20 sec, 40 Zyklen: Denaturierung bei 95°C für 3 sec und Hybridisierung und Elongation für 30 sec), wenn die Farbstoffe ihr Plateau erreicht haben, erfolgt das Farbkompensationsprogramm. Dabei handelt es sich um einen von 40°C mit 2,5°C/s bis 65°C aufsteigenden Temperaturgradienten. Während des Temperaturanstiegs wird pro ansteigendem °C die Fluoreszenz gemessen. Aus diesen Daten erstellt die LightCycler 480 Software 1.5.1 eine Farbkompensationsdatei, die zur Analyse aller Messungen mit der gleichen Farbstoffkombination bei gleichem Mastermix herangezogen werden kann.

Zur Bestimmung des C_q-Wertes wurde die „Absolute Quantification/ 2nd Derivate Maximum“-Methode genutzt. Der C_q-Wert ist als der Zyklus mit Maximum in der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve definiert (s. Abb.1).

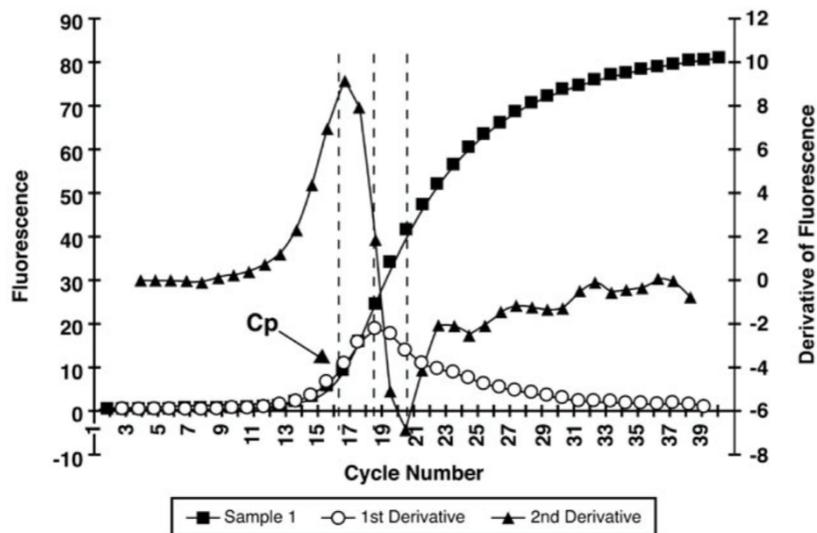


Abbildung 1: 2nd Derivate Methode ($C_p=C_q$)(Luu-The et al., 2005)

2.2.6.3 Singleplexreaktionen

Bei allen verwendeten Singleplexreaktionen wurde das vom Hersteller empfohlene Standardprotokoll des SensiMix II Probe Kits verwendet. Die Reaktionen wurden entweder mit einem Gesamtvolumen von 10 μl oder 20 μl durchgeführt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für eine Singleplexreaktion

Reaktionskomponenten	Ziel-konzentration	Gesamt-volumen 10 μl für 1 Reaktion [μl]	Gesamt-volumen 20 μl für 1 Reaktion [μl]
2x SensiMix II Probe Kit	1x	5	10
10 μM Forward Primer	400 nM	0,4	0,8
10 μM Reverse Primer	400 nM	0,4	0,8
10 μM Sonde	100 nM	0,1	0,2
Probe		3	3
HPLC-Wasser		1,1	5,2

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die Singleplexreaktion mit SensiMix II Probe Kit

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	60 sec	

2.2.6.4 Multiplexreaktionen

Zur Etablierung wurde nach Erprobung der Singleplexreaktionen die qPCR um weitere Gene erweitert. Dafür wurden die folgenden Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen benutzt.

A. Duplexreaktion für *pfhrp2* und *pfhrp3*

Die Duplexreaktion wurde mit dem SensiMix II Probe Kit Mastermix und dem Mastermix von Thermo Fisher nach den folgenden Protokollen getestet.

Tabelle 13: Duplexreaktionsansatz mit SensiMix II Probe Kit

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μ l]
2x SensiMix II Probe Kit	1x	10
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> Ausgangskonzentration: 20 μ M	Forward- und Reverseprimer je: 500 nM	Forward- und Reverseprimer je: 0,5
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> Ausgangskonzentration: 10 μ M	100 nM	je Sonde: 0,2
HPLC-Wasser		4,6
Probe		3
		Gesamtvolumen: 20

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die Duplex-qPCR mit SensiMix II Probe Kit

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	90 sec	

Tabelle 15: Duplexreaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix - Variable: Sondenkonzentration (Herstellerempfehlung 100 nM).

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μ l]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2-pfhrp3</i> Ausgangskonzentration: 20 μ M	Forward- und Reverseprimer je: 400 nM	Forward- und Reverseprimer je: 0,2
Sonde für <i>pfhrp2-pfhrp3</i> Ausgangskonzentration: 5-10-15 μM	50-100-150 nM	je Sonde: 0,1
HPLC-Wasser		1
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die Duplex-qPCR mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	30 sec	

Tabelle 17: Duplexreaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix - Variable: Hybridisierungs- und Elongationsdauer

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μ l]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> Ausgangskonzentration: 20 μ M	Forward- und Reverseprimer je: 400 nM	Forward- und Reverseprimer je: 0,2
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> Ausgangskonzentration: 5 μ M	50 nM	je Sonde: 0,1
HPLC-Wasser		1
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für die Duplex-qPCR mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix - Variable: Hybridisierungs- und Elongationsdauer (Herstellerempfehlung: 30 sec)

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	30-40-50-60-80 sec	

B. Triplexreaktion für *pfhrp2*, *pfhrp3* und *pf β -tubulin* oder *pf cytochrom b*

Die Erweiterung der *pfhrp2*-/*pfhrp3*-Duplexreaktion zur Triplexreaktion wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt. Dabei wurde entweder das *pf β -tubulin*- oder das *pf cytochrom b*- Primer-Sondenset eingesetzt.

Tabelle 19: Triplexreaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μl]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> oder <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μM	Forward- und Reverseprimer je: 400 nM	Forward- und Reverseprimer je:0,2
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> oder <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 10 μM	50 nM	je Sonde: 0,1
HPLC-Wasser		0,5
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen für die Triplex-qPCR mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	80 sec	

C. 4plex-Reaktion

Die erste Erprobung der 4plex-qPCR erfolgte mit SensiMix II Probe Kit am Rotor-Gene 3000.

Tabelle 21: 4plex-Reaktionsansatz mit SensiMix II Probe Kit

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μl]
2x SensiMix II Probe Kit	1x	5
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μM	Forward- und Reverseprimer: je 500 nM	Forward- und Reverseprimer: je 0,5
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 10 μM	100 nM	je Sonde: 0,2
HPLC-Wasser		2,2
Probe		3
		Gesamtvolumen: 20

Tabelle 22: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit SensiMix II Probe Kit

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	45 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	45 sec	

2.2.6.5 Optimierung der 4plex-Reaktion

Die Optimierung der 4plex-qPCR erfolgte am LightCycler 480 II. In den folgenden Optimierungsschritten wurde jeweils mit dem als beste Version ausgewählten Parameter fortgefahren. Die restlichen Parameter blieben konstant.

I. Variable: Mastermix

Verglichen wurden vier verschiedene Mastermixe unterschiedlicher Hersteller: QuantiNova Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific), SensiMix II Probe Kit und SensiFAST Probe No-ROX Mix (Bioline GmbH).

Das Reaktionsgesamtvolumen war 20 µl. Als Probe wurden 3 µl der Positivkontrolle (3D7-DNA) eingesetzt. Um Vergleichbarkeit zu erreichen wurde bei allen die DNA aus dem gleichen Aliquot entnommen. Als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Reaktionen wurden nach den folgenden Reaktionsansätzen manuell pipettiert.

Tabelle 23: 4plex-Reaktionsansatz mit QuantiNova Multiplex PCR Master Mix

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [µl]
4x QuantiNova Multiplex PCR Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 µM	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,4
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 10 µM	250 nM	je Sonde: 0,5
HPLC-Wasser		6,8
Probe		3
		Gesamtvolumen: 20

Tabelle 24: 4plex-Reaktionsansatz mit SensiMix II Probe Kit, SensiFAST Probe No-ROX Mix und Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μl]
2x SensiMix II Probe Kit/ SensiFAST Probe No-ROX Mix/ Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	10
Primer für <i>pfhrp2 -pfhrp3 -pf β-tubulin -pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μM	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,4
Sonde für <i>pfhrp2 -pfhrp3 -pf β-tubulin -pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 10 μM	100 nM	je: 0,2
HPLC-Wasser		3
Probe		3
		Gesamtvolumen: 20

Gemäß den Herstellerangaben wurden die Reaktionen nach den folgenden Reaktionsbedingungen ausgeführt.

Tabelle 25: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit QuantiNova Multiplex PCR Master Mix

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	5 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	30 sec	

Tabelle 26: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit SensiFAST Probe No-ROX Mix

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	4 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	60 sec	

Tabelle 27: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit SensiMix II Probe Kit

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	90 sec	

Tabelle 28: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	30 sec	

II. Variable: Reaktionsvolumen

Bei Verwendung des gleichen DNA-Materials wurde unter Beibehaltung der Endkonzentrationen die Reaktionsvolumina 10 µl und 20 µl innerhalb eines Durchlaufs verglichen.

Tabelle 29: 4plex-Reaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix.
Gesamtvolumen 10 μ l und 20 μ l

Reaktionskomponenten	End- konzentration	Volumen für eine Reaktion [μ l]	Volumen für eine Reaktion [μ l]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5	10
Primer für <i>pfhrp2</i> <i>-pfhrp3 -pf β-tubulin</i> <i>-pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μ M	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,2	je Primer 0,4
Sonde für <i>pfhrp2</i> <i>-pfhrp3 -pf β-tubulin</i> <i>-pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 10 μ M	100 nM	je: 0,1	je: 0,2
HPLC-Wasser		-	3
Probe		3	3
		Gesamt- volumen: 10	Gesamt- volumen: 20

III. Variable: Sondenkonzentration

In 10 μ l Reaktionsvolumen wurde die Endkonzentration der Sonden durch veränderte Ausgangskonzentrationen bei gleichen Volumen variiert. Im Vergleich: alle Sonden in 50 nM oder 100 nM.

Tabelle 30: 4plex-Reaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix.
Sondenkonzentration 50 nM und 100 nM

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μl]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μM	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,2
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 5-10 μM	50-10 nM	je: 0,1
HPLC-Wasser		-
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

IV. Variable: *pf β -tubulin*-Sondenkonzentration

Bei 60°C im Hybridisierungs- und Elongationsschritt wurden 50-100-150 nM Konzentrationen für die *pf β -tubulin*-Sonde verglichen. Die Konzentration der anderen Sonden war konstant.

Dies wurde bei verschiedenen Hybridisierungs- und Elongationsdauern und Elongationstemperaturen verglichen. Im Ergebnisteil dargestellt ist ein Versuch bei 60°C und 120 sec.

Tabelle 31: 4plex-Reaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix.
Konzentration der Sonde für *pf β-tubulin* 50-100-150 nM

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μl]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2 -pfhrp3</i> <i>-pf β-tubulin -pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μM	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,2
Sonde für <i>pfhrp2 -pfhrp3</i> <i>-pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 5 μM	50 nM	je: 0,1
Sonde für <i>pf β-tubulin</i> Ausgangskonzentration: 5-10-15 μM	50-100-150 nM	je: 0,1
HPLC-Wasser		-
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

V. Variable: Hybridisierungs- und Elongationsdauer

Es wurden Durchgänge mit einer variierenden Dauer des Hybridisierungs- und Elongationsschritts verglichen. Die Anzahl der Zyklen, die Aktivierungs- und der Denaturierungsschritt blieben unverändert.

Tabelle 32: 4plex-Reaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix für den Vergleich unterschiedlicher Zeiten des Hybridisierungs- und Elongationsschritts.

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μl]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf β-tubulin</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 20 μM	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,2
Sonde für <i>pfhrp2</i> - <i>pfhrp3</i> - <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 5 μM	50 nM	je: 0,1
Sonde für <i>pf β-tubulin</i> Ausgangskonzentration: 10 μM	100 nM	je: 0,1
HPLC-Wasser		-
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

Tabelle 33: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix bei unterschiedlichen Hybridisierungs- und Elongationsdauern

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	80-90-120- 150-180- 210-240 sec	

VI. Variable: Hybridisierungs- und Elongationstemperatur

Es wurden unterschiedliche Temperaturen für den Hybridisierungs- und Elongationsschritt gewählt. Reaktionsansatz entspricht der vorausgehenden Versuchsreihe.

Tabelle 34: Reaktionsbedingungen für die 4plex-qPCR mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix bei unterschiedlichen Hybridisierungs- und Elongationstemperaturen

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	56-58-60-61-62°C	150 sec	

VII. Limitierung der Primer von *pf cytochrom b*

In der Literatur wird beschrieben, dass bei einer Multiplex-qPCR von Genen mit einer unterschiedlicher Kopienzahl, eine Reduktion der Konzentration der Primer des Gens, mit mehr Kopien, zu einer effektiveren Amplifikation führen kann. Deshalb wurde im folgenden Experiment die Konzentration der Primer für *pf cytochrom b* herabgesetzt. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden innerhalb des gleichen Durchlaufs verglichen. Die Konzentration für Forward- und Reverseprimer war jeweils gleich. Die anderen Parameter blieben konstant.

Tabelle 35: 4plex-Reaktionsansatz mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix für den Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen der Primer für *pf cytochrom b*

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für eine Reaktion [μ l]
2x Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
Primer für <i>pfhrp2 -pfhrp3 -pf β-tubulin</i> Ausgangskonzentration: 20 μ M	Forward- und Reverseprimer je 400 nM	Forward- und Reverseprimer je 0,2
Primer für <i>pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 4-6-8-10-12-14-20 μM	Forward und Reverse Primer je: 80-120-160-200-240-280-400 nM	je Primer 0,2
Sonde für <i>pfhrp2 -pfhrp3 -pf cytochrom b</i> Ausgangskonzentration: 5 μ M	50 nM	je: 0,1
Sonde für <i>pf β-tubulin</i> Ausgangskonzentration: 10 μ M	100 nM	je: 0,1
HPLC-Wasser		-
Probe		3
		Gesamtvolumen: 10

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Intraassay-Variation (Wiederholbarkeit) der Multiplex-qPCR wurde durch 10 Replikate innerhalb eines Experiments untersucht. Ausgedrückt wird sie durch die Standardabweichung der Cq-Werte der 10 Replikate.

Als „linear dynamic range“ wird das Konzentrationsspektrum bezeichnet, über welches sich die gegen die jeweiligen Cq-Werte logarithmisch aufgetragene Parasitämie, linear verhält. Aus den Cq-Mittelwerten dieses Bereichs wurde die Gleichung der linearen Regression bestimmt. R^2 ist ein Maß zur Beschreibung der Stärke des linearen Zusammenhangs. Aus der Steigung der Geradengleichung berechnet sich die Effektivität E ($E=10^{(-1/\text{Steigung})}-1$). Das

theoretische Maximum 1,00 (100%) entspricht einer Verdopplung der Amplifikonzahl pro Zyklus (Bustin et al., 2009).

3 Ergebnisse

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben mit dem LightCycler 480 II durchgeführt.

Tabelle 36: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzkanäle zur Detektion der Gene, sowie die entsprechend positiven Parasitenkontrollstämme

Fluoreszenzkanal	Gen	Parasitenstamm
HEX	<i>pfhrp2</i>	3D7, HB3
FAM	<i>pfhrp3</i>	3D7, Dd2
Cy5	<i>pf β-tubulin</i>	3D7, Dd2 HB3
ROX	<i>pf cytochrom b</i>	3D7, Dd2 HB3

3.1 Primer und Sonden

Die Primer und Sonden für *pfhrp2* und *pfhrp3* wurden beruhend auf der Referenzgensequenz des *P. falciparum* Laborstamms 3D7 neu konzipiert. Dabei wurde mit Hilfe von BLAST die 3D7-Sequenz mit veröffentlichten *pfhrp2* und *pfhrp3* Gensequenzen von Isolaten aus unterschiedlichen Ländern auf Variabilität der Basen verglichen (Kreidenweiss et al., 2019). Ziel war es eine konservierte Sequenz innerhalb *pfhrp2* und *pfhrp3* zu finden, um das Risiko zu verringern, dass einzelne *P. falciparum* Stämme aus unterschiedlichen geographischen Regionen nicht detektiert werden. Gleichzeitig sollten sich die Basen aber auch zwischen *pfhrp2* und *pfhrp3* unterscheiden. Die Gegenüberstellung der Gensequenzen erfolgte mit der Software MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

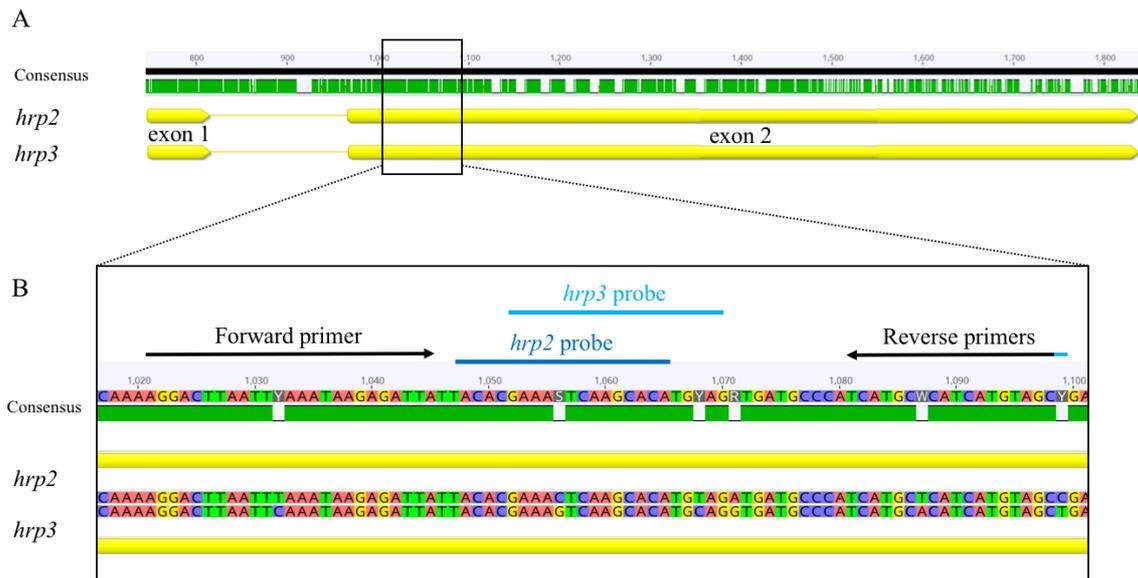


Abbildung 2: Bindungsstellen der *hrp2/ pfhrp2*- und *hrp3/ pfhrp3*-Primer und -Sonden, bzw. A. Sequenzalignment von *P. falciparum* 3D7 *pfhrp2*- und *pfhrp3*-DNA-Sequenzen B. Übereinstimmung (consensus) der Basensequenzen von *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Exon 2 (5'-Region) und Bindungsstellen der Primer und Sonden (probes). [...] Die grauen Boxen innerhalb der grünen Übereinstimmungssequenz stellen die sich unterscheidenden Nukleotide dar. (Kreidenweiss et al., 2019, Abbildungsbeschreibung übersetzt aus dem Englischen)

Die Sequenzen sowohl von *pfhrp2* als auch von *pfhrp3* haben eine Exon1 – Intron – Exon2 -Struktur. Für beide Gene liegt die zu detektierende Zielregion am 5'-Ende von Exon 2. Die Sequenzen der Zielregionen in *pfhrp2* und *pfhrp3* stimmen zu 92,3% überein. Deshalb war es schwierig spezifische Primer- und Sondensequenzen auszuwählen. Die Primer und Sonden stimmen zu einem Großteil mit dem jeweils anderen Gen überein (siehe Tabelle 37). Die entsprechende Spezifität wurde durch die Wahl der MGB-Sondentechnologie erzielt.

Tabelle 37: Fehlpaarungen der *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Oligonukleotide

Oligonukleotide	Anzahl Nukleotide	Anzahl der Fehlpaarungen	
		<i>pfhrp2</i> -Gen	<i>pfhrp3</i> -Gen
<i>pfhrp2</i> -Forwardprimer	25		1
<i>pfhrp2</i> -Reverseprimer	18		1
<i>pfhrp2</i> -Sonde	19		1
<i>pfhrp3</i> -Forwardprimer	25	1	
<i>pfhrp3</i> -Reverseprimer	19	2	
<i>pfhrp3</i> -Sonde	19	2	

3.1.1 Spezifität der *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Primer

Da Oligonukleotide auch an nicht hundertprozentig komplementäre Basensequenzen binden (Stadhouders et al., 2010, Cha et al., 1992, Christopherson et al., 1997, Kwok et al., 1990), wurden die *pfhrp2*- und die *pfhrp3*-Primer hinsichtlich einer Kreuzamplifikation im Singleplex-qPCR-Ansatz untersucht.

Da in Dd2 nur das *pfhrp3*-Gen und in HB3 nur das *pfhrp2*-Gen vorhanden ist kann die Amplifikation für beide Gene unabhängig durch beide Primersets untersucht und verglichen werden. Siehe Tabelle 38, A-D zur Übersicht der Reaktionsansätze – Ansatz A und B für die *pfhrp2*-Primer und Ansatz B und C für die *pfhrp3*-Primer. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

Tabelle 38: Übersicht der Reaktionsansätze zur Untersuchung der Primerspezifität. x =ist in Reaktionsansatz enthalten, - =im Reaktionsansatz nicht enthalten

Nr.	Stamm	Gen	<i>pfhrp2</i> -Primer	<i>pfhrp2</i> -Sonde	<i>pfhrp3</i> -Primer	<i>pfhrp3</i> -Sonde	Bemerkung
A	Dd2	<i>pfhrp3</i>	-	-	x	x	Positivkontrolle
B	Dd2	<i>pfhrp3</i>	x	-	-	x	Primerspezifität
C	HB3	<i>pfhrp2</i>	x	x	-	-	Positivkontrolle
D	HB3	<i>pfhrp2</i>	-	x	x	-	Primerspezifität

Es konnte sowohl eine Kreuzamplifikation des *pfhrp3*-Gens (Dd2 Parasiten) durch *pfhrp2*-Primer (s. Tabelle 38: A und B, Abb. 3) als auch des *pfhrp2*-Gens (HB3 Parasiten) durch *pfhrp3*-Primer (s. Tabelle 38: C und D siehe Abb. 4) detektiert werden. Allerdings war die jeweilige Kreuzamplifikation deutlich weniger effektiv als die entsprechende Positivkontrolle. Der Cq-Wert für die *pfhrp3*-Amplifikation (Dd2) durch *pfhrp2*-Primer war um 9,3 Zyklen verzögert im Vergleich zur Positivkontrolle und die Amplifikation von *pfhrp2* (HB3) durch *pfhrp3*-Primer war um 5,7 Zyklen verzögert im Vergleich zur *pfhrp2*-Primer-Positivkontrolle.

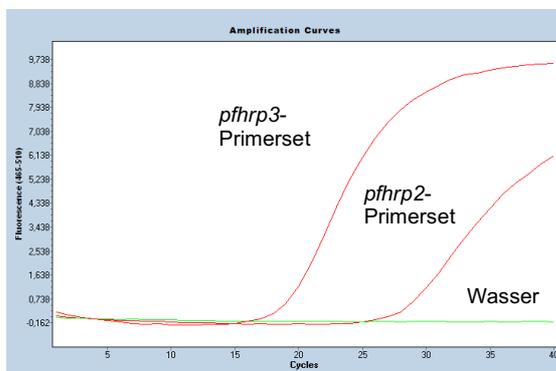


Abbildung 3: FAM-Kanal: Singleplex-qPCR -Dd2 mit *pfhrp3*-Sonde und *pfhrp2*-, bzw. *pfhrp3*-Primerset

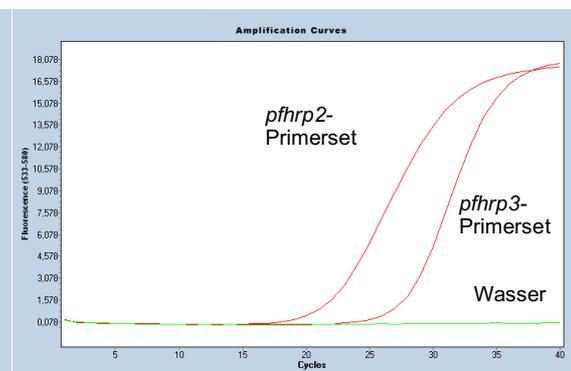


Abbildung 4: HEX-Kanal: Singleplex-qPCR -HB3 mit *pfhrp2*-Sonde und *pfhrp2*-, bzw. *pfhrp3*-Primerset

3.1.2 Spezifität der *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Sonden

Zusätzlich wurde die Spezifität der *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Sonden untersucht. Analog zur Untersuchung der Spezifität der Primer, wurden die Sonden in Singleplexansätzen getestet. Siehe Tabelle 39, A bis D – Ansatz A und B für die *pfhrp2*-Sonde und Ansatz C und D für die *pfhrp3*-Sonde.

Tabelle 39: Übersicht der Reaktionsansätze zur Untersuchung der Sondenspezifität. x =ist in Reaktionsansatz enthalten, - =im Reaktionsansatz nicht enthalten

Nr.	Stamm	Gen	<i>pfhrp2</i> -Primer	<i>pfhrp2</i> -Sonde	<i>pfhrp3</i> -Primer	<i>pfhrp3</i> -Sonde	Bemerkung
A	HB3	<i>pfhrp2</i>	-	x	x	-	Positivkontrolle
B	Dd2	<i>pfhrp3</i>	-	x	x	-	Sondenspezifität
C	Dd2	<i>pfhrp3</i>	x	-	-	x	Positivkontrolle
D	HB3	<i>pfhrp2</i>	x	-	-	x	Sondenspezifität

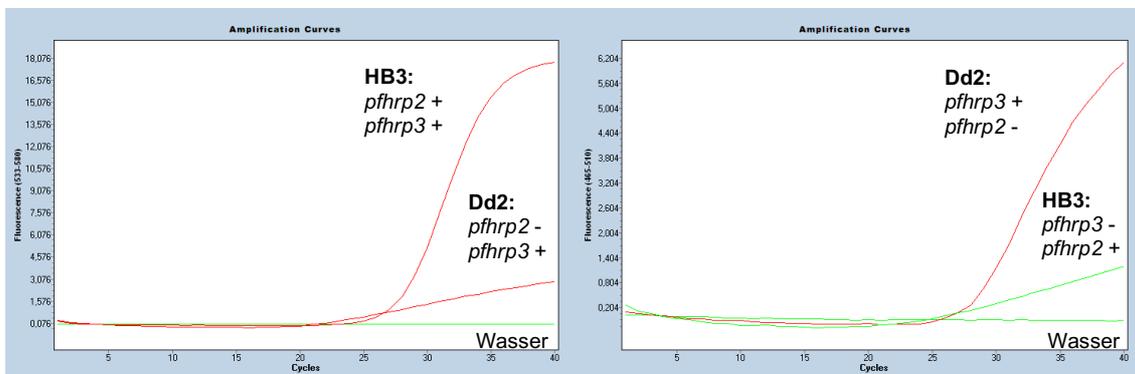


Abbildung 5: Kreuzdetektion von *pfhrp3* mit der *pfhrp2*-Sonde (HEX-Kanal) in der Singleplexreaktion. Positivkontrolle: HB3. Probe: Dd2. Negativkontrolle: H₂O.

Abbildung 6: Kreuzdetektion von *pfhrp2* mit der *pfhrp3*-Sonde (FAM-Kanal) in der Singleplexreaktion. Positivkontrolle: Dd2. Probe: HB3. Negativkontrolle: H₂O.

Abbildung 5 zeigt eine minimale Kreuzreaktion der *pfhrp2*-Sonde mit dem *pfhrp3*-Gen (Dd2). Die Positivkontrolle HB3 wurde wie zu erwarten vollständig amplifiziert. Umgekehrt wird das *pfhrp2*-Gen (HB3) minimal durch die *pfhrp3*-Sonde detektiert. Die Positivkontrolle Dd2 wurde wie zu erwarten vollständig amplifiziert (s. Abb. 6).

Ergänzend wurden die Kreuzreaktionen auch im Rotorgene-Gerät untersucht. Im Gegensatz zum LightCycler wurde hier keine Kreuzreaktion sowohl der *pfhrp2*-Sonde mit dem *pfhrp3*-Gen (s. Abb. 7), als auch der *pfhrp3*-Sonde mit dem *pfhrp2*-Gen detektiert (s. Abb. 8). Es wurden jeweils die zu den Sonden gehörigen Primer benutzt.

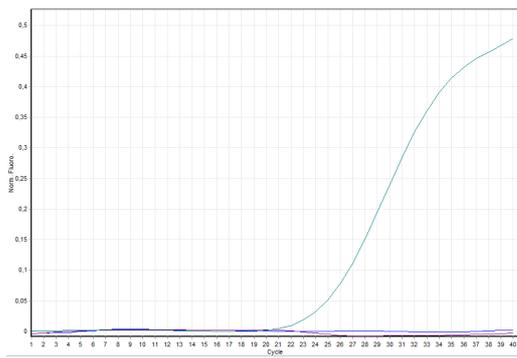


Abbildung 7: Kreuzdetektion von *pfhrp3* mit der *pfhrp2*-Sonde (HEX-Kanal) in der Singleplexreaktion. Positivkontrolle: HB3 (grün). Probe: Dd2 (violett). Negativkontrolle: H₂O (blau).

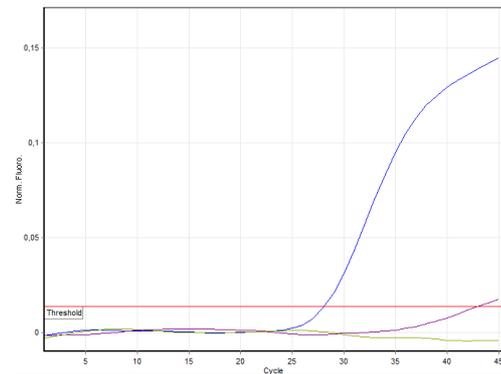


Abbildung 8: Kreuzdetektion von *pfhrp2* mit der *pfhrp3*-Sonde (FAM-Kanal) in der Singleplexreaktion. Positivkontrolle Dd2 (blau). Probe: HB3 (violett) Negativkontrolle H₂O (grün).

3.2 Singleplexreaktionen

3.2.1 Etablierung der Singleplexreaktionen im Rotorgene-Gerät

Das Rotorgene-Gerät ist ein älteres Modell einer qPCR-Maschine. Die ersten Etablierungsschritte der Singleplexansätze wurden erfolgreich an diesem Gerät durchgeführt. Die folgenden Grafiken zeigen beispielhaft den Kurvenverlauf einer Positivkontrolle (hier aus 3D7-Parasitenkultur) und einer Negativkontrolle (H₂O) einer Singleplexreaktion für die Gene: *pfhrp2* (Abb. 9), *pfhrp3* (Abb. 10), *pf β-tubulin* (Abb.11) und *pf cytochrom b* (Abb. 12).

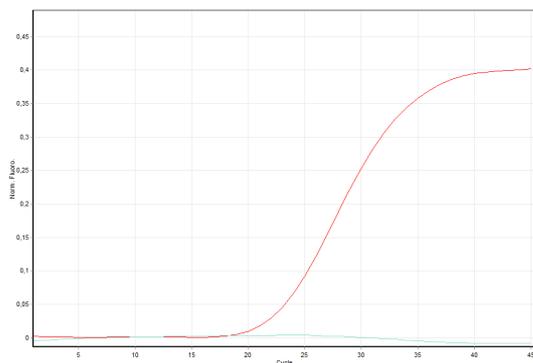


Abbildung 9: HEX-Kanal: Singleplex-qPCR mit *pfhrp2*-Primer-Sondenset. Positivkontrolle (rot): 3D7. Negativkontrolle H₂O (türkis).

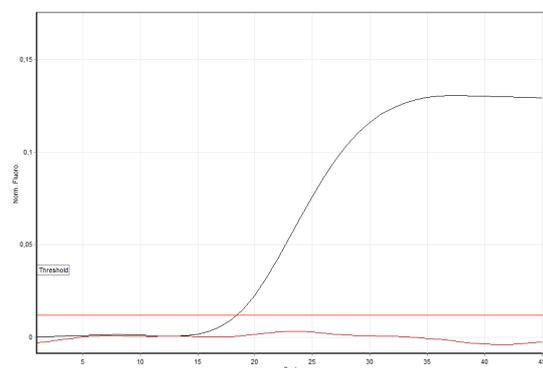


Abbildung 10: FAM-Kanal: Singleplex-qPCR mit *pfhrp3*-Primer-Sondenset. Positivkontrolle 3D7 (schwarz). Negativkontrolle H₂O (braun)

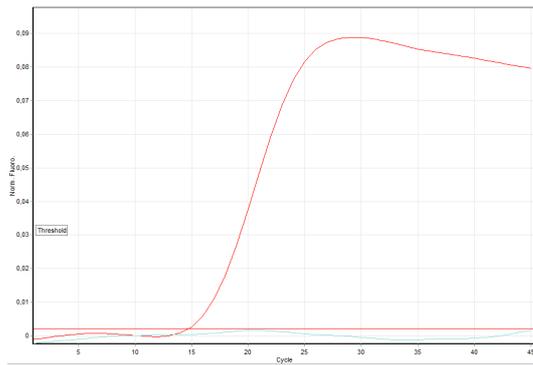


Abbildung 11: Cy5-Kanal: Singleplex-qPCR mit *pf* β -tubulin-Primer-Sondenset. Positivkontrolle 3D7 (rot). Negativkontrolle H₂O (türkis).

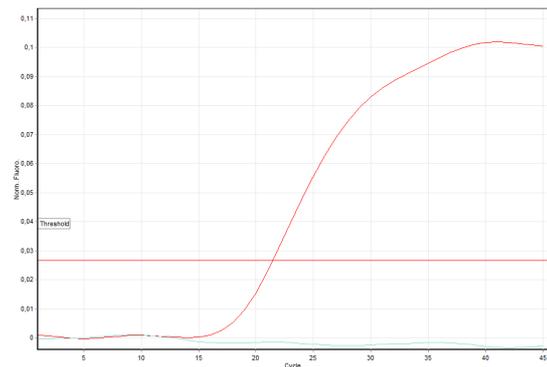


Abbildung 12: ROX-Kanal: Singleplex-qPCR mit *pf* *cytochrom b*-Primer-Sondenset. Positivkontrolle 3D7 (rot). Negativkontrolle H₂O (türkis).

3.2.2 Etablierung der Singleplexreaktionen im LightCycler-Gerät

Ausgehend von erarbeiteten Parametern aus den Rotorgene-Experimenten wurden die Singleplexansätze im Lightcycler getestet. Alle Singleplexansätze wurden immer auch in den drei anderen Fluoreszenzkanälen gemessen, um sicher zu gehen, dass die entsprechenden Fluorophore nach Farbkompensation keine falsch positiven Signale in den anderen Fluoreszenzkanälen verursachen. DNA von 3D7 gemischt mit Vollblut diente als Positivkontrolle, Kulturmedium, Vollblut und Wasser als Negativkontrolle. Alle Singleplexreaktionen funktionierten sehr gut für alle vier Gene, d.h. die Fluoreszenzintensitäten zeigten immer einen sigmoidalen Verlauf (s. Tabellen 40 und 41).

Tabelle 40: Fluoreszenzkurven der Singleplexreaktionen für *pfhrp2* und *pfhrp3* in den Detektionskanälen HEX, FAM, Cy5 und ROX unter Verwendung der Farbkompensation. Positivkontrolle 3D7. Negativkontrolle H₂O. Rot = positiv, grün = negativ

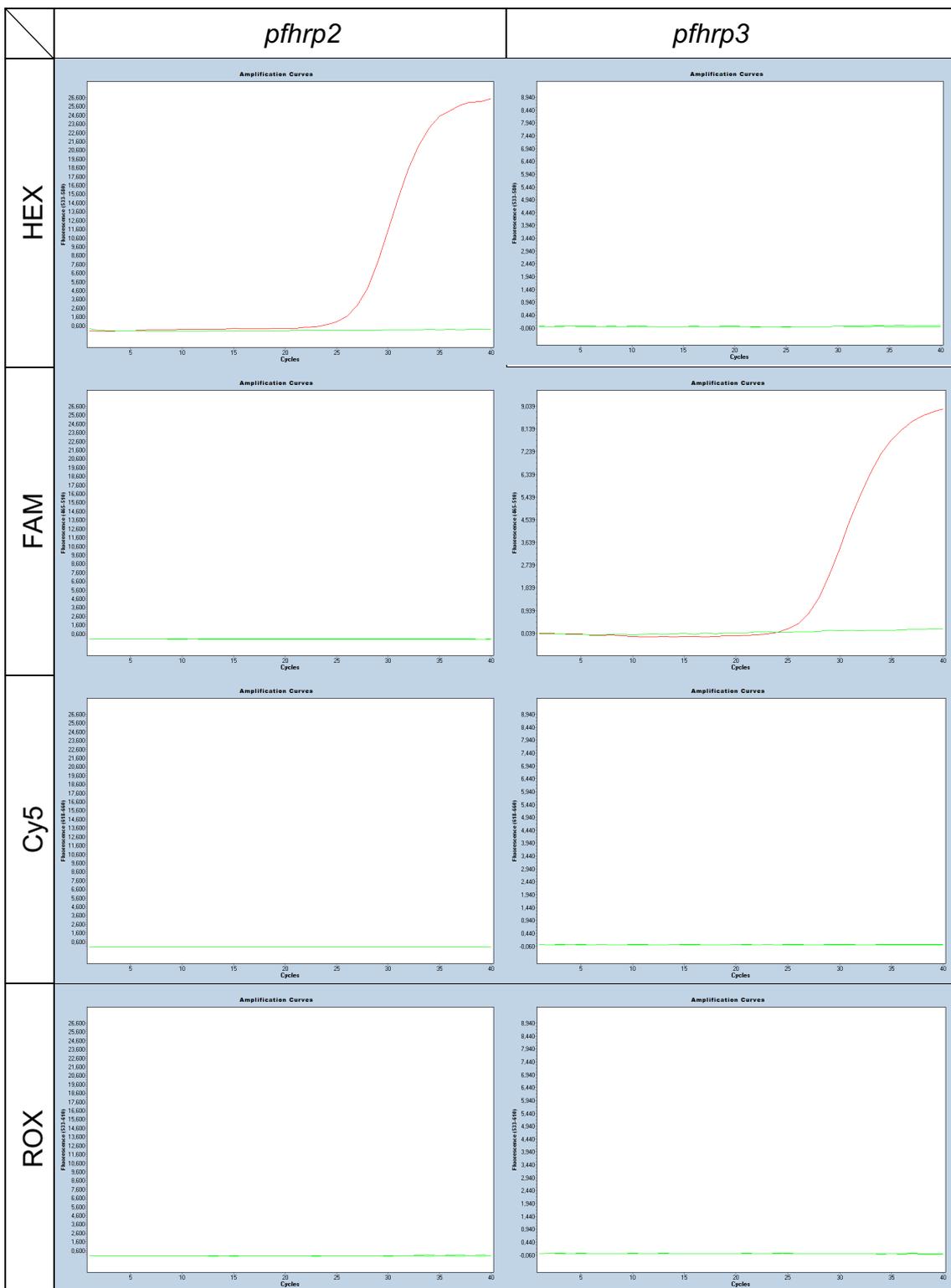
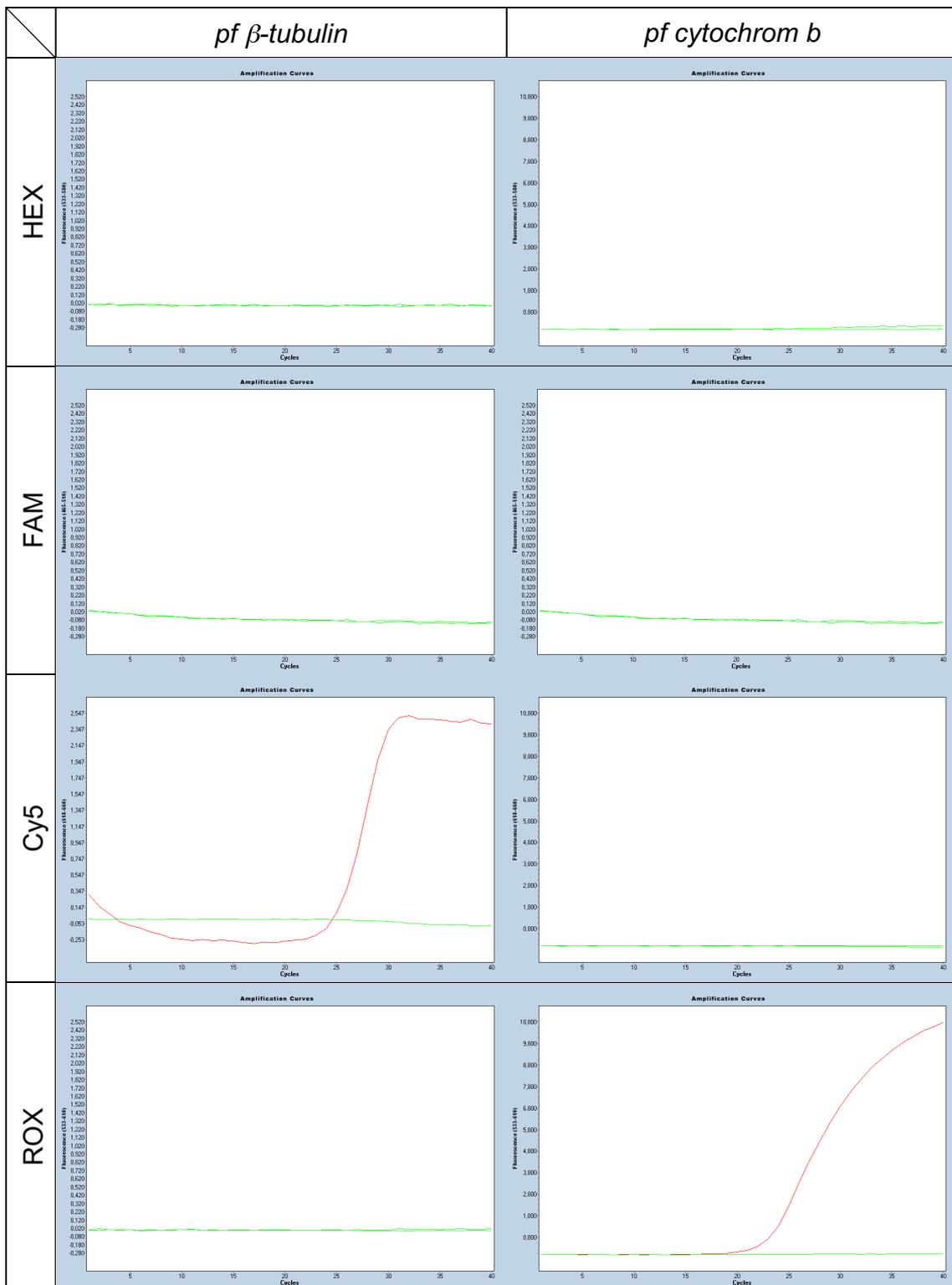


Tabelle 41: Fluoreszenzkurven der Singleplexreaktionen für *pf β-tubulin* und *pf cytochrom b* in den Detektionskanälen HEX, FAM, Cy5 und ROX unter Verwendung der Farbkompensation. Positivkontrolle 3D7. Negativkontrolle H₂O. Rot = positiv, grün = negativ



3.2.3 Standardkurven

Für jedes Singleplexassay wurde eine Standardkurve unter Verwendung von Proben mit unterschiedlicher Parasitämien verwendet. Hierzu wurden 3D7-Parasiten seriell mit Vollblut verdünnt und die DNA extrahiert. Aus den Messwerten der qPCR lässt sich für jedes Gen eine Standardkurve erstellen, den linearen Detektionsbereich der qPCR bestimmen und die Effizienz des qPCR Protokolls berechnen. Alle qPCRs für alle Gene zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen zunehmender Ausgangsparasitämie und dem Cq-Wert (s. Abb. 13-16). Insgesamt sind alle Assays hochsensitiv und können eine Parasitämie bis zu 60 Parasiten/ml im Fall von *pf cytochrom b* und bis zu 204 Parasiten/ml für *pfhrp2*, *pfhrp3* und *pf β-tubulin* detektieren. Die Amplifikationseffizienz liegt für alle Singleplexassays zwischen 90% und 110%, und zeigt somit, dass die Assaybedingungen ideal sind.

pfhrp2

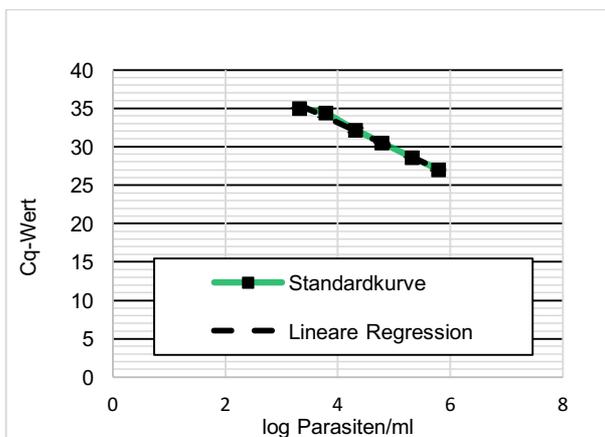


Abbildung 13: Standardkurve der Singleplex-qPCR für *pfhrp2*

Lineare Regression:

$$y = -3,3958x + 46,722$$

$$R^2 = 0,989$$

Effektivität: 0,97

Tabelle 42: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pfhrp2*-Singleplexreaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	27,01	0,10
204000	28,63	0,03
60000	30,50	0,03
20400	32,17	0,31
6000	34,44	0,57
2040	35,00	0,00

Detektionslimit:

204 Parasiten/ml

pfhrp3

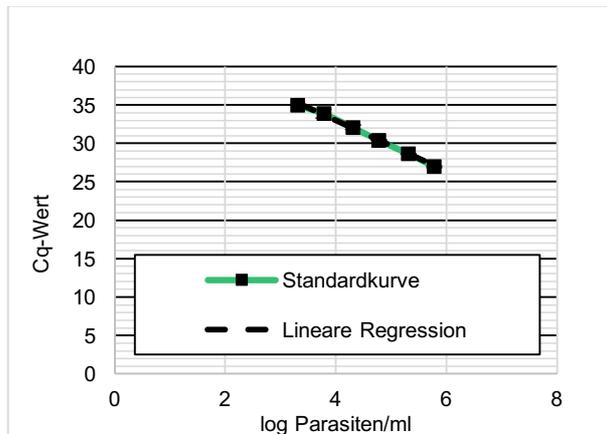


Abbildung 14: Standardkurve der Singleplex-qPCR für *pfhrp3*

Lineare Regression:

$$y = -3,3117x + 46,212$$

$$R^2 = 0,99718$$

Effektivität: 1,00

Tabelle 43: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pfhrp3*-Singleplexreaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	26,96	0,07
204000	28,63	0,04
60000	30,42	0,11
20400	32,09	0,17
6000	33,88	0,42
2040	35,00	0,00

Detektionslimit:

204 Parasiten/ml

pf β-tubulin

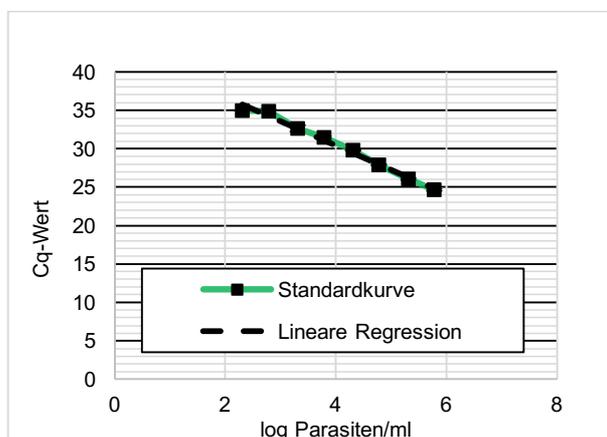


Abbildung 15: Standardkurve der Singleplex-qPCR für *pf β-tubulin*

Lineare Regression:

$$y = -3,1742x + 43,123$$

$$R^2 = 0,98821$$

Effektivität: 1,07

Tabelle 44: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pf β-tubulin*-Singleplexreaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	24,62	0,10
204000	26,04	0,10
60000	27,86	0,09
20400	29,78	0,08
6000	31,49	0,12
2040	32,66	0,40
600	34,85	0,26
204	35,00	0,00

Detektionslimit:

204 Parasiten/ml

pf cytochrom b

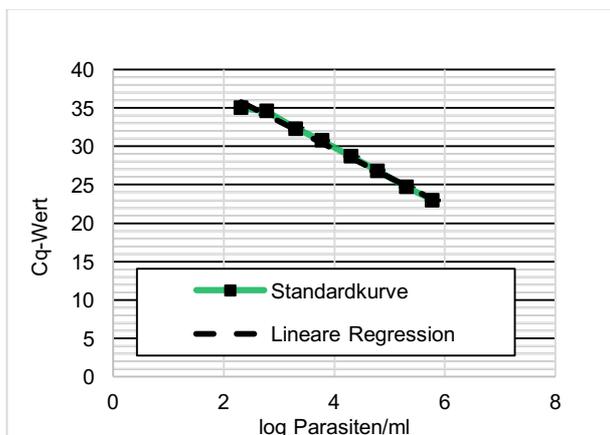


Abbildung 16: Standardkurve der Singleplex-qPCR für *pf cytochrom b*

Lineare Regression:

$$y = -3,6317x + 44,153$$

$$R^2 = 0,99246$$

Effektivität: 0,89

Tabelle 45: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pf cytochrom b*-Singleplexreaktionen

P/ ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	22,97	0,11
204000	24,69	0,04
60000	26,81	0,10
20400	28,67	0,06
6000	30,73	0,07
2040	32,28	0,15
600	34,56	0,45
204	35,00	0,00

Detektionslimit:

60 Parasiten/ml

3.3 Multiplexreaktionen

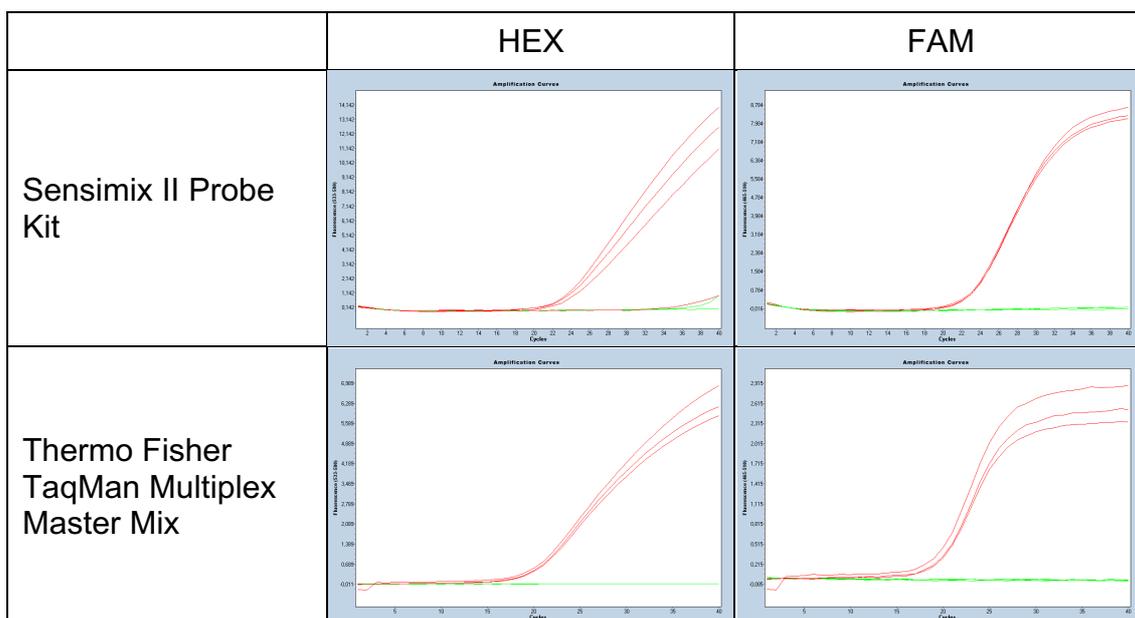
Nach ersten Etablierungsversuchen der Singelplexassays wurden davon ausgehend die qPCRs schrittweise zusammengefügt. Ziel war es alle vier Assays in einer 4plex-qPCR zu kombinieren. Hierfür wurde zunächst DNA, gewonnen aus Parasitenkultur als Positivkontrolle verwendet. Später wurde auch DNA die aus mit Parasiten versetztem Vollblut gewonnen wurde verwendet um "Reallife"-Bedingungen zu simulieren. Als Negativkontrollen wurden Wasser, Kulturmedium und Vollblut benutzt.

3.3.1 Duplexreaktion mit *pfhrp2* und *pfhrp3*

In der Duplex-qPCR für *pfhrp2* und *pfhrp3* wurden zwei verschiedene Mastermixe ausprobiert, die Hybridisierungs- und Elongationsdauer sowie die *pfhrp2*-Sondenkonzentrationen variiert. Der Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix führt zu einer idealen, sigmoidalen Amplifikation sowohl von *pfhrp2* (HEX-Kanal) als auch von *pfhrp3* (FAM-Kanal). Eine Reduzierung der Sondenkonzentrationen von 100 nM auf 50 nM verbessert die Amplifikation. Eine Hybridisierungs- und Elongationsdauer von 80 sec entspricht der besten Reaktionsbedingung.

Zum Vergleich der Mastermixe Sensimix II Probe Kit und Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix wurde das von den Herstellern empfohlene Standardprotokoll verwendet (s. Tabellen 13-16, 46). Die Optimierung wurde mit dem Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix weitergeführt.

Tabelle 46: Duplex-qPCR mit *pfhrp2* und *pfhrp3* – Variable: Mastermix, Positivkontrolle: 3D7, Negativkontrolle: H₂O



Das Standardprotokoll des Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mixes sieht eine Sondenkonzentration von 100 nM vor. Für den Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix wurden unterschiedliche Sondenkonzentrationen verglichen (s. Tabellen 15-16). Es wurden gleiche Konzentrationen für beide Sonden (50-100-150 nM) sowie Kombinationen der unterschiedlichen Sondenkonzentrationen verwendet. Eine Sondenkonzentration von 50 nM für *pfhrp2* und *pfhrp3* führt zu einer optimalen sigmoidalen Amplifikation.

Verglichen wurden unterschiedliche Hybridisierungs- und Elongationsdauern (s. Tabellen 17-18). Das Standardprotokoll des Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix sieht 30 sec vor. Davon ausgehend wurde in 10 sec-Schritten die Dauer auf 90 sec verlängert. Wie in Abbildung 17 und Tabelle 47 gezeigt ist für *pfhrp2* die Amplifikation bei einer Hybridisierungs- und Elongationsdauer von 80 und 90 sec optimal. Für *pfhrp3* ist eine Dauer von 80 sec am besten. Durch die Verlängerung der Hybridisierungs- und Elongationsdauer auf 80 sec kann für *pfhrp2* eine Verringerung des C_q-Werts um 3,4 Zyklen und für *pfhrp3* um 1,8 Zyklen erreicht werden.

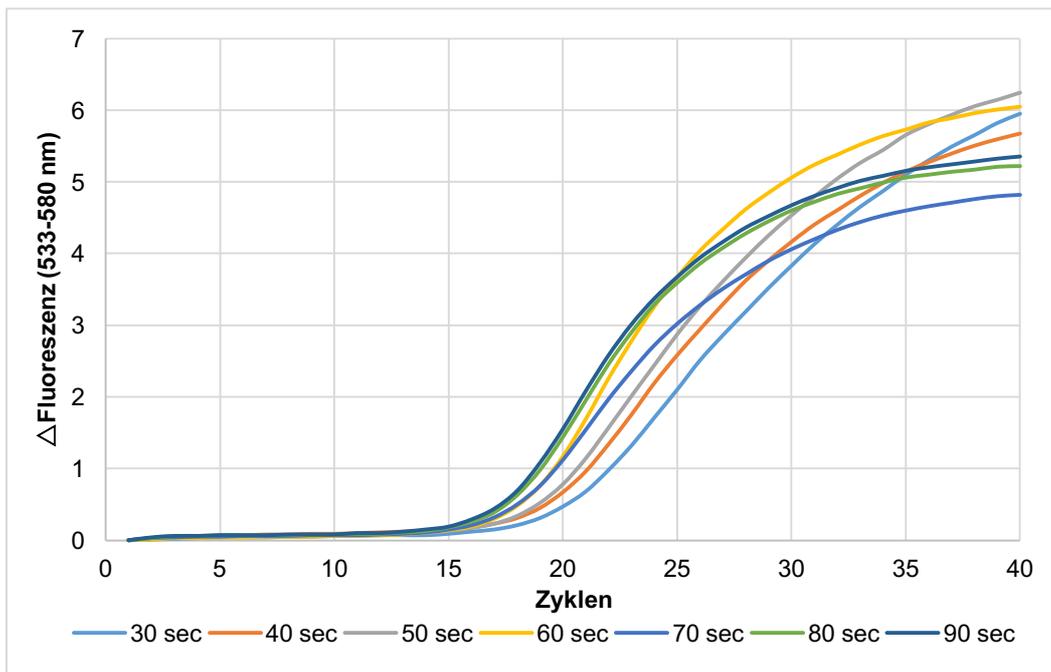


Abbildung 17: Fluoreszenzkurven im HEX-Kanal von Duplexreaktionen mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix bei unterschiedlicher Hybridisierungs- und Elongationsdauer (Δ Fluoreszenz= Fluoreszenz in Zyklus x- Fluoreszenz in Zyklus 1)

Tabelle 47: Cq-Mittelwerte der Duplexreaktionen im HEX- und FAM-Kanal von Durchläufen mit unterschiedlicher Hybridisierungs- und Elongationsdauer

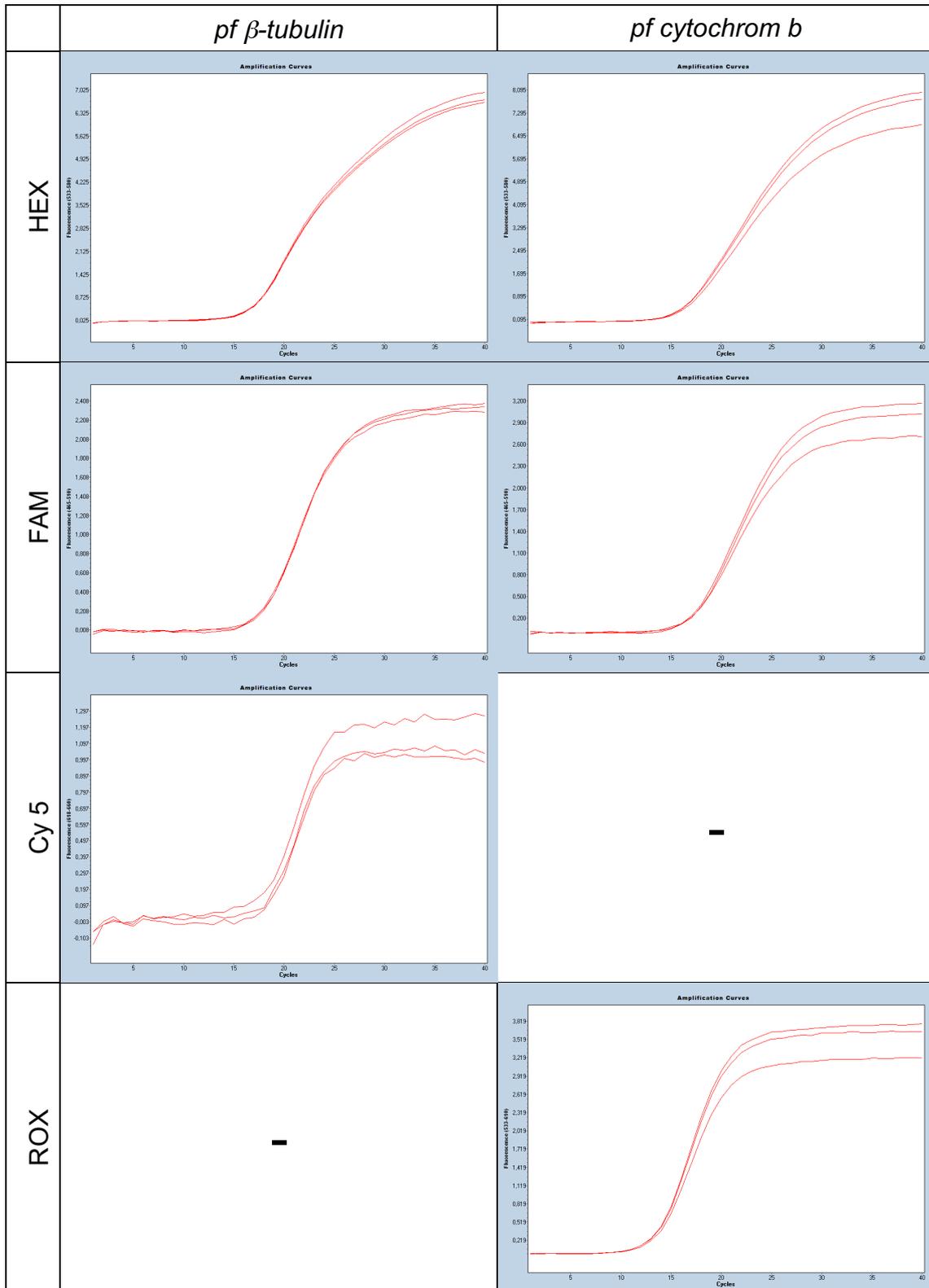
		Hybridisierungs- und Elongationsdauer [sec]						
		30	40	50	60	70	80	90
Cq- Mittelwerte	HEX-Kanal	20,3	19,5	19,0	18,2	17,7	17,5	17,2
	FAM-Kanal	19,5	18,8	18,6	18,5	17,8	17,7	18,1

3.3.2 Triplexreaktion mit *pfhrp2*, *pfhrp3* und *pf β-tubulin* oder *pf cytochrom b*

Die Duplex-Kombination von *pfhrp2* und *pfhrp3* wurde mit *pf β-tubulin* oder *pf cytochrom b* kombiniert. Die Reaktionsbedingungen können den Tabellen 19-20 entnommen werden. Die Hybridisierungs- und Elongationsdauer von 80 sec wurde von der Duplexoptimierung übernommen. Beide Triplexkombinationen zeigen eine optimale, sigmoidale Amplifikation (siehe Tabelle 48).

An diesen Reaktionen wurden keine weiteren Optimierungen durchgeführt.

Tabelle 48: Triplex-qPCR mit *pfhrp2*, *pfhrp3* und *pf β-tubulin* oder *pf cytochrom b*, Positivkontrolle: 3D7



3.3.3 4plex-Reaktion

Für die erste Erprobung der 4plex-qPCR wurde der Rotor-Gene 3000 benutzt. Die Reaktionen wurden mit dem SensiMix II Probe Kit-Protokoll (s. Tabellen 21-22) durchgeführt. Schon die erste Messung ohne weitergehende Optimierungsschritte war erfolgreich. Die Positiv- und Negativkontrollen (3D7, Dd2, HB3) zeigten die erwarteten Ergebnisse - Fluoreszenzanstieg bei Vorhandensein und eine flache Fluoreszenzkurve bei Abwesenheit des Gens. Die Negativkontrollen mit Wasser und Vollblut (nicht gezeigt) waren immer negativ.

Tabelle 49: Beispielhafte Kurvenverläufe im HEX- und FAM-Kanal für die *P. falciparum* Stämme 3D7 (oliv), Dd2 (violett) und HB3 (türkis). Rote Horizontale= Autothreshold

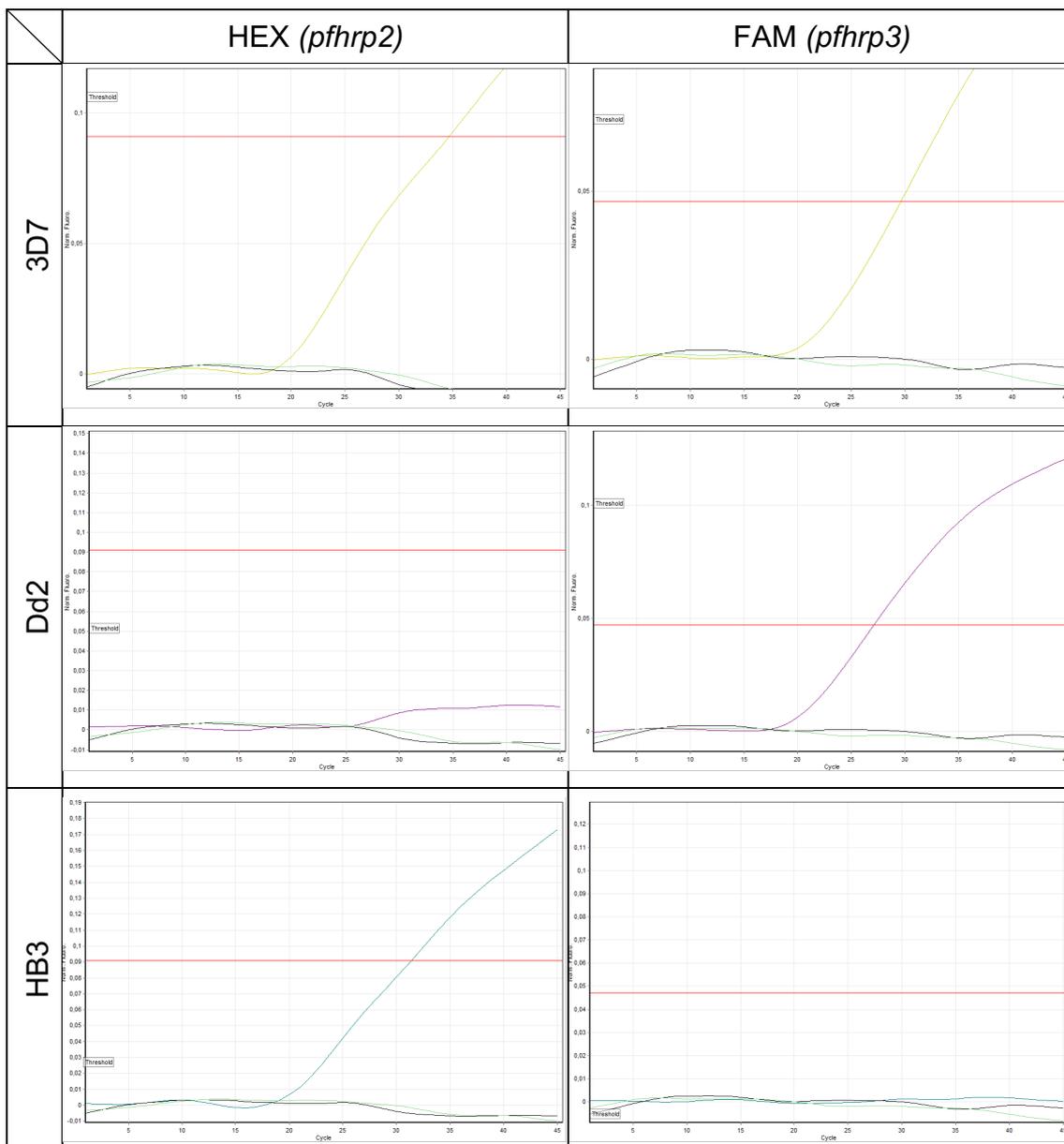
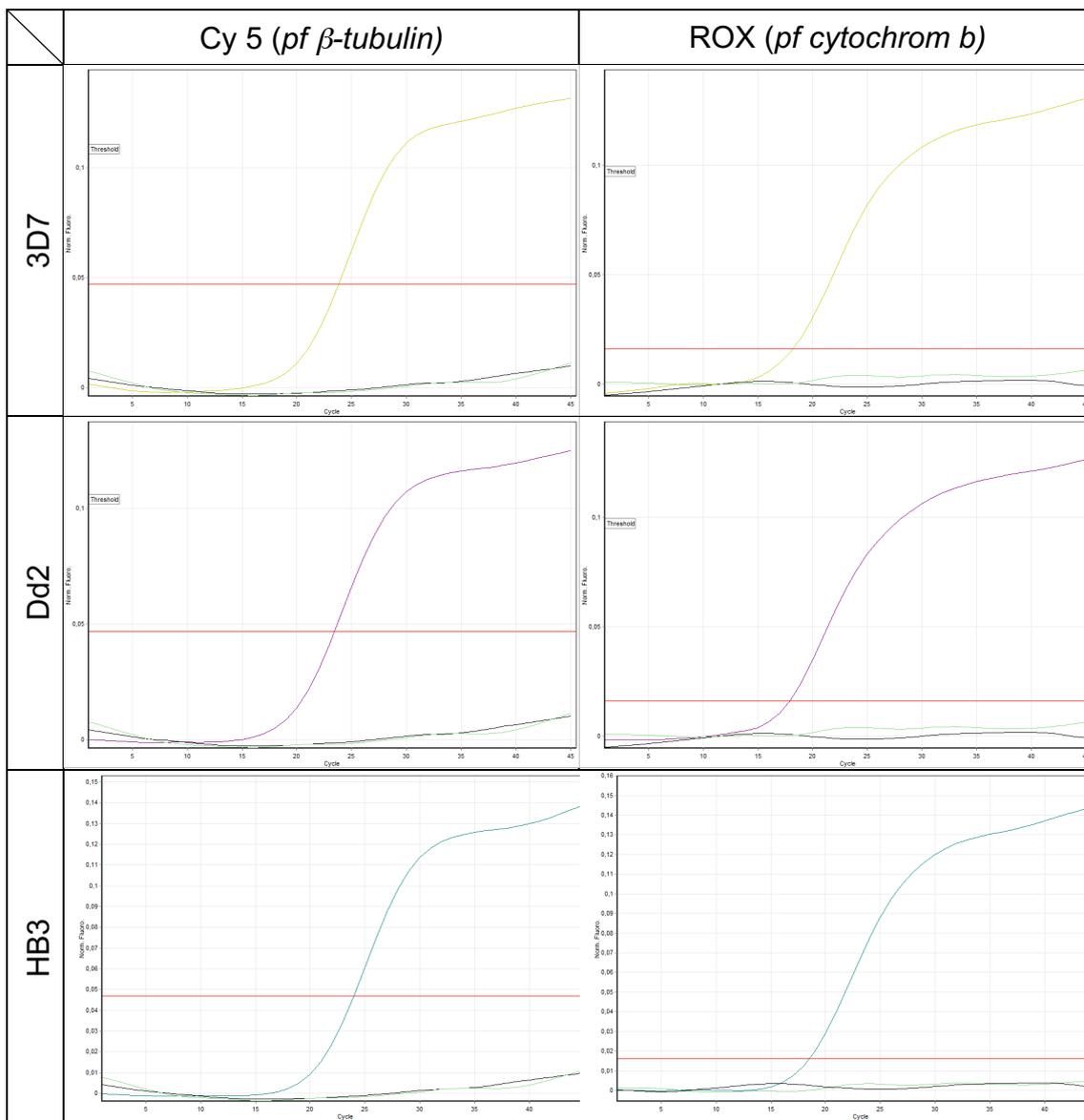


Tabelle 50: Beispielhafte Kurvenverläufe im Cy5- und ROX-Kanal für die *P. falciparum* Stämme 3D7 (oliv), Dd2 (violett) und HB3 (türkis). Rote Horizontale= Autothreshold



3.3.3.1 Optimierung der 4plex-Reaktion

Die Optimierung der Assaybedingungen erfolgte für die Messung im LightCycler 480 II. Sowohl der Mastermix, als auch die Primer- und Sondenkonzentrationen sowie die Bedingungen der qPCR wurden schrittweise etabliert. Als Probenmaterial wurde DNA aus 3D7-Parasitenkultur verwendet. Für alle Optimierungsschritte wurde DNA gleicher Konzentration verwendet. Als Negativkontrolle diente Wasser. Folgende Bewertungskriterien wurden für die einzelnen Optimierungsschritte angewandt:

- Cq-Wert (früher Cq-Wert als Zeichen einer effektiven Amplifikation)
- sigmoidaler Verlauf der Fluoreszenzintensität mit steilem Anstieg und Plateauphase
- Reproduzierbarkeit (Vergleich der Triplikate)

I. Variable: Mastermix

Verglichen wurden vier verschiedene Mastermixe unterschiedlicher Hersteller: QuantiNova Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific), SensiMix II Probe Kit und SensiFAST Probe No-ROX Mix (Bioline GmbH). Die Assays wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (s. Tabellen 23-28). Die Mastermixe beeinflussen zum Teil sehr stark die Spezifität. Der Mastermix von Thermo Fisher zeigt eine sensitive und effiziente Amplifikation für alle vier Gene und wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

Tabelle 51: 4plex-qPCR Vergleich vier unterschiedlicher Mastermixe. Diese Tabelle: SensiMix II Probe Kit (SM) und TaqMan Multiplex Master Mix von Thermo Fisher (TF), Positivkontrolle: 3D7, Negativkontrolle: H₂O

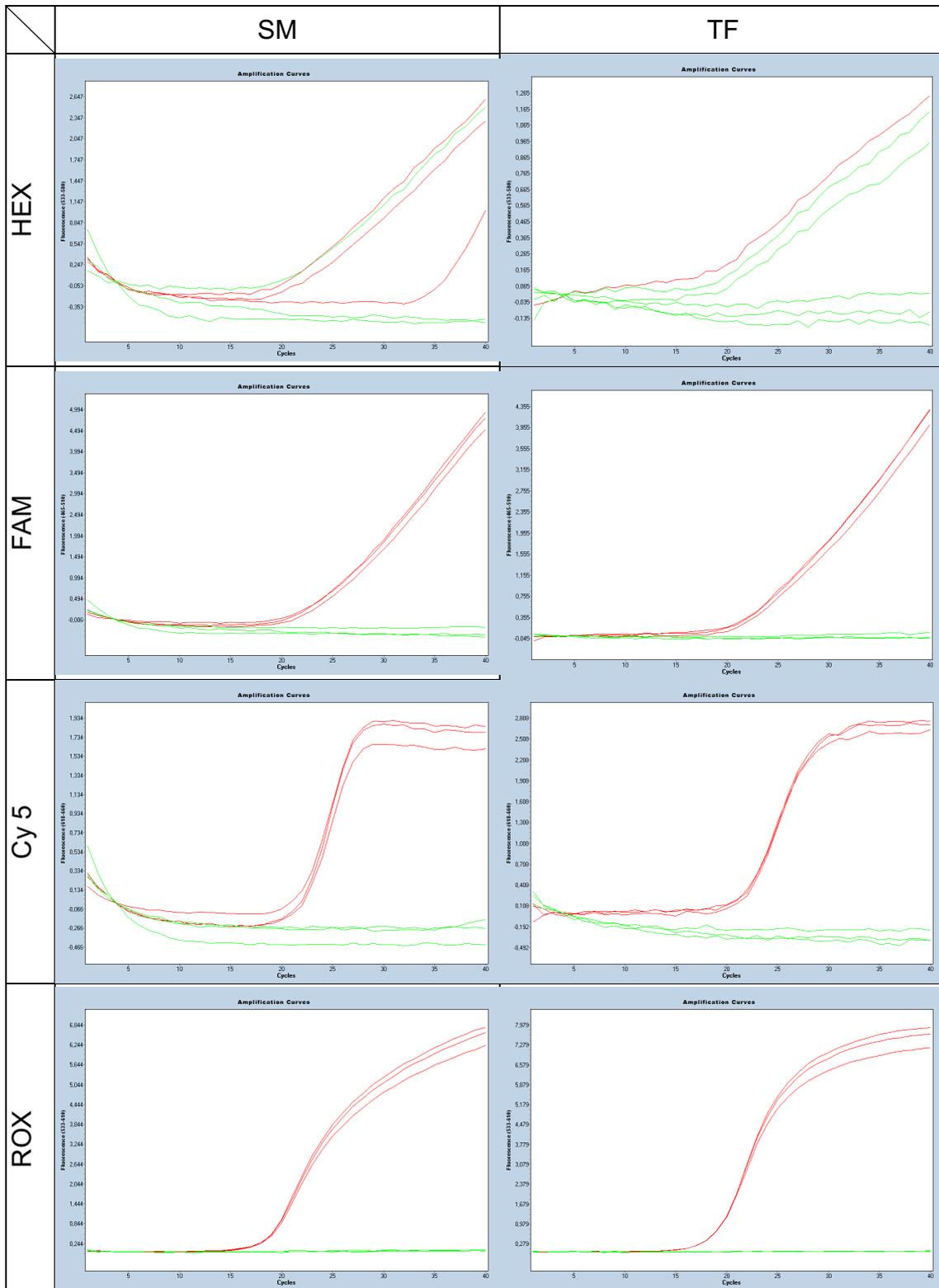
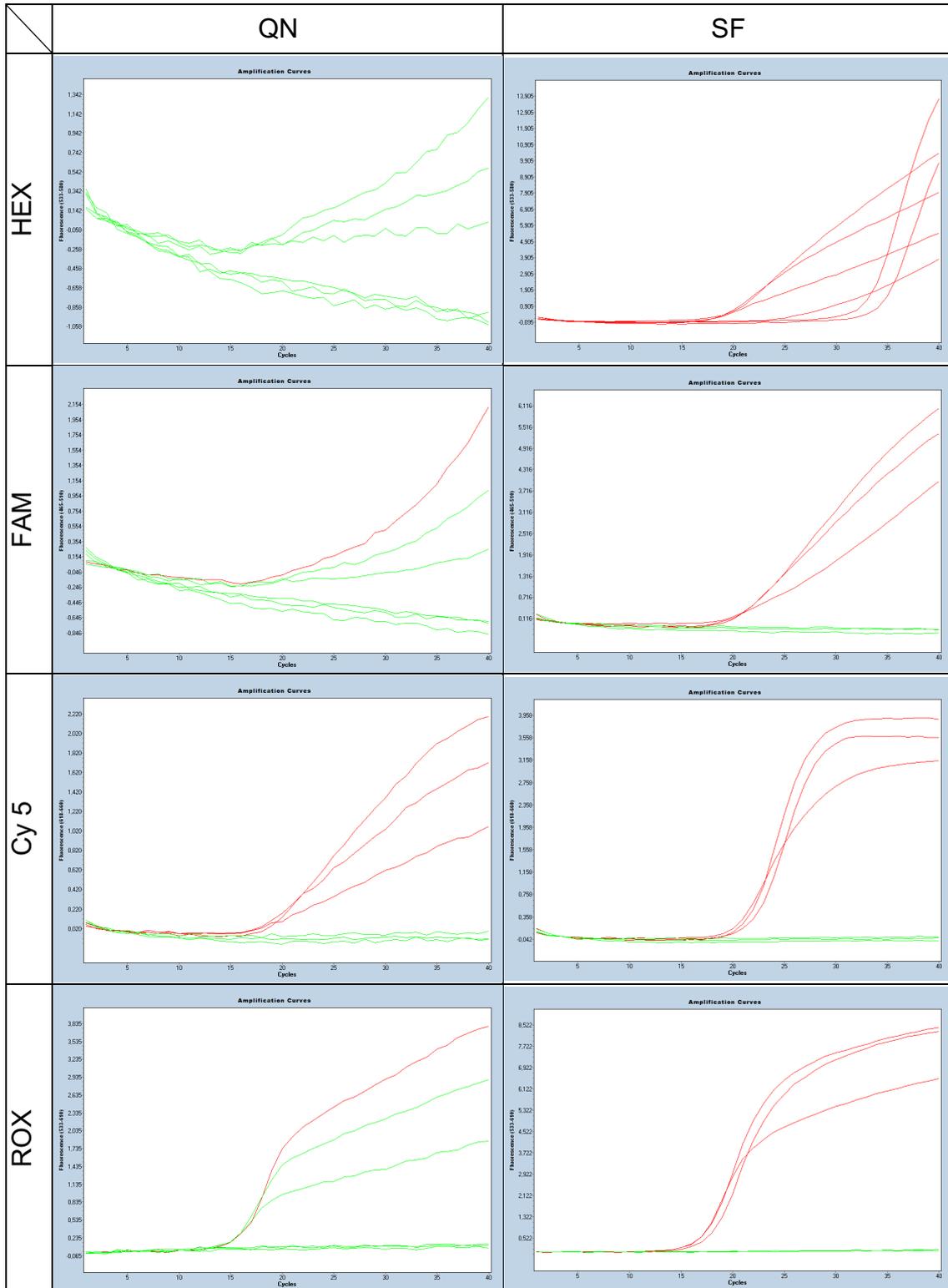


Tabelle 52: 4plex-qPCR Vergleich vier unterschiedlicher Mastermixe. Diese Tabelle: QuantiNova Multiplex PCR Master Mix (QN) und SensiFAST Probe No-ROX Mix (SF), Positivkontrolle: 3D7, Negativkontrolle: H₂O



II. Variable: Reaktionsvolumen

Im LightCycler 480 II können auch geringere Reaktionsvolumen (10 µl anstatt von 20 µl) im Rotor-Gene gemessen werden. Dies spart bei zukünftigen Messungen vieler Proben, wie sie bei epidemiologischen Studien erhoben werden, teure Reagenzien. Es wurde deshalb der Einfluss des Reaktionsvolumens auf die Cq-Werte verglichen. Hierzu wurden qPCR-Reaktionen mit 10 µl und 20 µl bei konstanter Konzentration der Reagenzien und einem gleichbleibenden Probenvolumen im gleichen Lauf gemessen (s. Tabelle 29). In allen vier Kanälen ist beim kleineren Reaktionsvolumen der Cq-Wert kleiner ($Cq\text{-Wert}_{(20\ \mu\text{l})} - Cq\text{-Wert}_{(10\ \mu\text{l})}$: FAM - 0,44, Cy5 - 1,03, ROX - 0,9 Zyklen, HEX: kein Cq-Wert für 20 µl wegen Artefakten berechenbar, aber optisch eindeutig Anstieg bei höherem Cq-Wert). Alle weiteren Versuche wurden daher mit 10 µl Reaktionsvolumen durchgeführt.

III. Variable: Sondenkonzentration

Die Sonden wurden in Konzentrationen von 50 nM und 100 nM verglichen (s. Tabelle 30). Bei einer Konzentration von 100 nM ist die Fluoreszenzintensität in der Plateauphase für alle vier Kanäle höher als im Vergleich zu 50 nM. Allerdings ist der Cq Wert bei 50 nM in allen vier Kanälen ein geringfügig niedrigerer und beeinflusst ansonsten die Amplifikation nicht negativ (s. Tabelle 53). Die Konzentration von 50 nM ist ausreichend und wurde für weitere Versuche verwendet.

Tabelle 53: Mittelwerte der Cq-Werte für 50 nM und 100 nM Sondenkonzentration

	Mittelwert der Cq-Werte			
	HEX	FAM	Cy5	ROX
alle Sonden 50 nM	18,3	20,2	19,8	17,1
alle Sonden 100 nM	18,5	20,3	20,5	17,5

Sonderfall *pf* β -tubulin-qPCR: Der Verlauf der Fluoreszenzintensität der *pf* β -tubulin-qPCR ist in ihrem Verlauf sehr „zittrig“ (siehe Abb. 18). Dies zeigt sich

sowohl in Single-, Du-, Tri-, als auch 4plex-Reaktionen. Es wurden verschiedene Konzentrationen, Temperaturen und Zeiten im Hybridisierungs- und Elongationsschritt und eine neu synthetisierte Sonde getestet (s. Tabelle 31); jedoch ohne Erfolg. Dieses Phänomen scheint nicht die Amplifikation des *pf* β -*tubulin*-Gens zu beeinflussen. Für *pf* β -*tubulin* wurde die Sondenkonzentration auf 100 nM erhöht, da durch die höhere Signalintensität der Detektionsbereich größer wird.

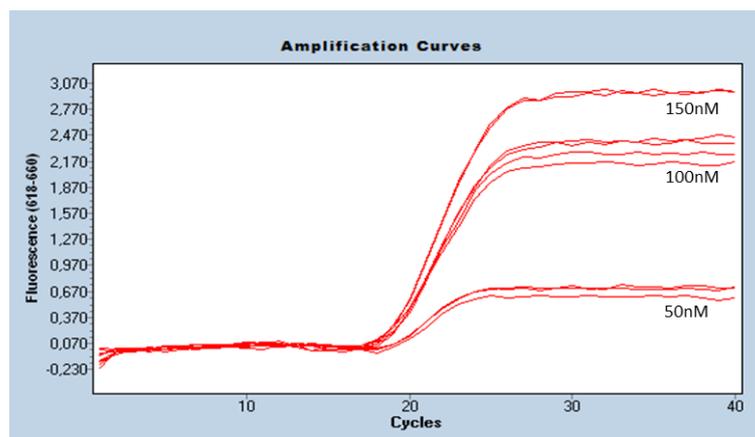


Abbildung 18: Cy5-Kanal: 4plex mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix bei unterschiedlichen Konzentrationen der *pf* β -*tubulin*-Sonde (50 – 100 - 150 nM)

IV. Variable: Hybridisierungs- und Elongationsdauer

Bei einer Hybridisierungs- und Elongationsdauer von 30 sec zeigt sich sowohl in Du- und Tri-, als auch in der 4-plex eine eher linear zunehmende Fluoreszenzintensität im HEX-Kanal. Die Steigung im ersten Teil der Fluoreszenzkurve ist Ausdruck der Effektivität der Reaktion. Wie in Abbildung 19 zu sehen, nimmt die Steigung bei längeren Hybridisierungs- und Elongationsdauern auch für die 4plex-Reaktion zu. Die Kurven für 150, 180, 210 und 240sec verlaufen annähernd gleich steil. Auf die Amplifikation von *pfhrp3*, *pf* β -*tubulin* und *pf cytochrom b* hat die Verlängerung der Hybridisierungs- und Elongationsdauer nur einen geringen Einfluss. Die Fluoreszenzkurven sind unabhängig der Dauer sigmoidal. Die Amplifikation dieser Gene funktioniert bereits bei einer Dauer von 30 sec. Für weitere Assays wurde eine Hybridisierungs- und Elongationsdauer von 150 sec verwendet.

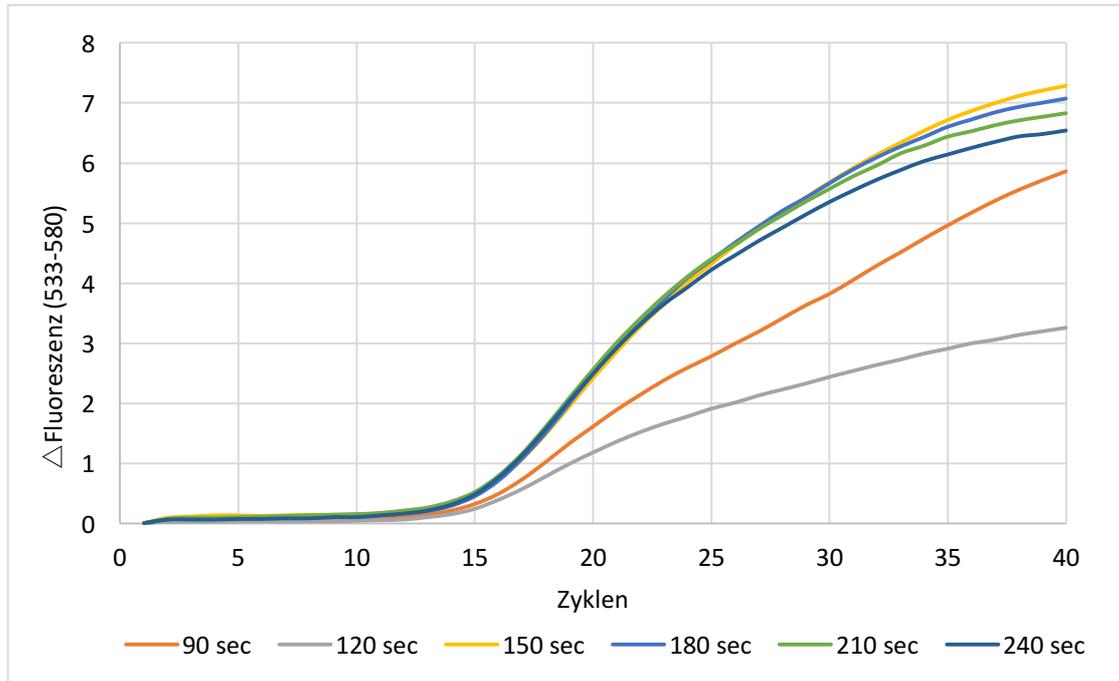


Abbildung 19: Δ Fluoreszenz-Kurven im HEX-Kanal von 4plex-Reaktionen mit Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix bei unterschiedlichen Primer-Hybridisierung und Elongationszeiten (Δ Fluoreszenz= Fluoreszenz in Zyklus x- Fluoreszenz in Zyklus 1)

V. Variable: Hybridisierungs- und Elongationstemperatur

Der Einfluss folgender Temperaturen im Hybridisierungs- und Elongationsschritt auf die C_q Werte wurde untersucht: 56°C, 58°C, 60°C, 61°C und 62°C. Die in Abbildung 20 dargestellten C_q-Werte entsprechen Mittelwerten aus Triplikatmessungen.

Die C_q-Werte sind vor allem für HEX (*pfhrp2*) und FAM (*pfhrp3*) bei niedrigeren Temperaturen (56°C) erhöht. Für alle Kanäle sind die C_q-Werte ab 60°C relativ konstant niedriger. Für die weiteren 4plex-qPCR-Reaktionen wurde 60°C als Hybridisierungs- und Elongationstemperatur verwendet.

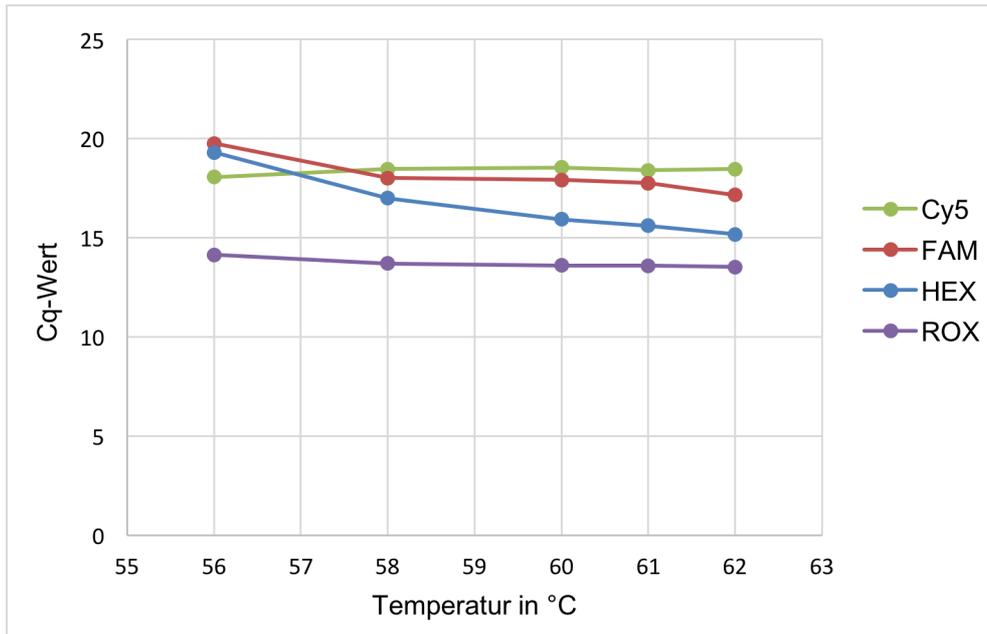


Abbildung 20: Cq-Werte der vier Kanäle bei unterschiedlichen Temperaturen im Hybridisierungs- und Elongationsschritt.

VI. Limitierung der Primer von *pf cytochrom b*

Pfhrp2, *pfhrp3* und *pf β-tubulin* sind „single copy genes“. Von *pf cytochrom b* dagegen liegen als mitochondriales Gen um die 20 Kopien des Gens in einem *P. falciparum* Parasiten vor (Preiser et al., 1996). Eine Limitierung der Primer des Gens mit höherer Kopienzahl, kann die Amplifikation der anderen Gene verbessern. Hierzu wurden alle Parameter der 4plex-qPCR konstant gehalten und nur die *pf cytochrom b*-Primerkonzentration verringert. Untersucht wurden Konzentrationen von 400 nM bis 80 nM. Auf die Cq-Werte in den Detektionskanälen Cy5, HEX und FAM hat die *pf cytochrom b*-Primerkonzentration kaum einen Einfluss (s. Abb. 21). Auf die Messung des *pf cytochrom b*-Gens selbst bewirkt eine geringere Primerkonzentration einen etwas kleineren Cq-Wert. In den folgenden Assays wurden *pf cytochrom b*-Primer in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt.

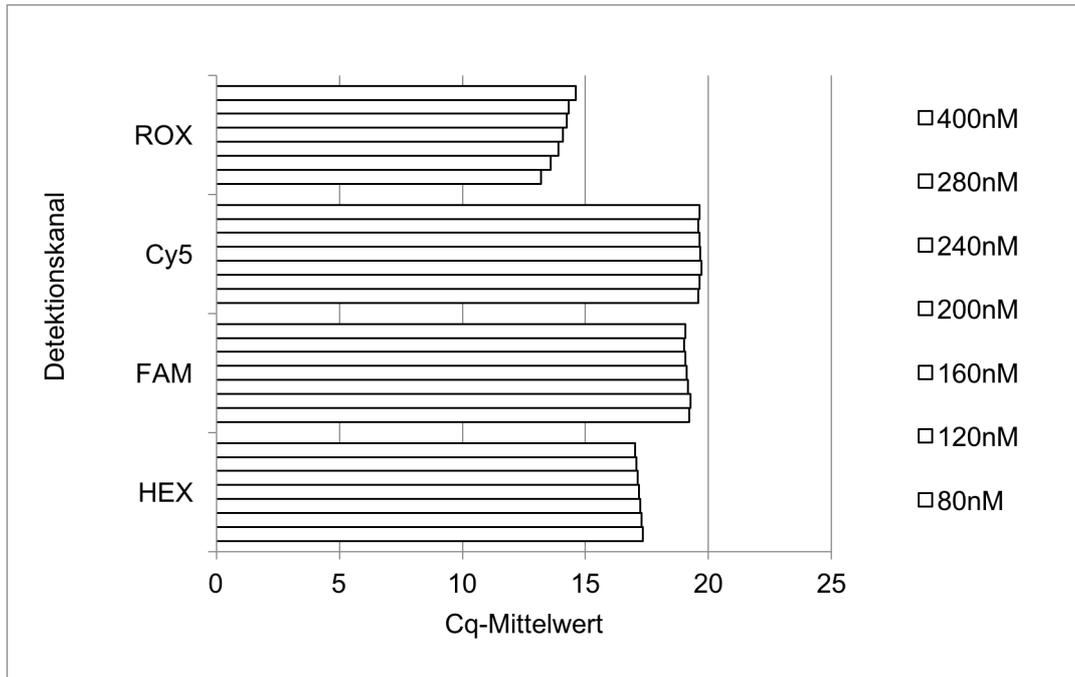


Abbildung 21: Cq-Mittelwerte in den Detektionskanälen mit unterschiedlichen Konzentrationen der *pf cytochrom b*-Primer (Konzentrationen absteigend aufgetragen)

3.3.3.2 Evaluierung der 4plex-qPCR

Das etablierte und optimierte Protokoll der 4plex-qPCR zu Detektion von *pfhrp2*, *pfhrp3*, *pf β-tubulin* und *pf cytochrom b* ist in Tabellen 54 und 55 beschrieben. Dieses Protokoll wurde im Weiteren angewandt.

Tabelle 54: Finaler 4plex-Reaktionsansatz (Kreidenweiss et al., 2019)

Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Volumen für 1 Reaktion [μl]
Thermo Fisher TaqMan Multiplex Master Mix	1x	5
20 μM <i>pfhrp2</i> -Forward- und Reverseprimer	400 nM	je 0,2
20 μM <i>pfhrp3</i> -Forward- und Reverseprimer	400 nM	je 0,2
20 μM <i>pf β-tubulin</i> -Forward- und Reverseprimer	400 nM	je 0,2
5 μM <i>pf cytochrom b</i> Forward- und Reverseprimer	100 nM	je 0,2
5 μM <i>pfhrp2</i> -Sonde	50 nM	0,1
5 μM <i>pfhrp3</i> -Sonde	50 nM	0,1
10 μM <i>pf β-tubulin</i> -Sonde	100 nM	0,1
5 μM <i>pf cytochrom b</i> -Sonde	50 nM	0,1
Probe		3
		Endvolumen: 10 μl

Tabelle 55: Reaktionsbedingungen der finalen 4plex-qPCR (Kreidenweiss et al., 2019)

	Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
Aktivierung	95°C	20 sec	1
Denaturierung	95°C	3 sec	40
Hybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60°C	150 sec	

Mit dem optimierten 4plex-qPCR-Protokoll konnte sehr sensitiv und spezifisch gleichzeitig *pfhrp2*, *pfhrp3*, *pf β -tubulin* und *pf cytochrom b* in einer einzelnen Probe amplifiziert und quantifiziert werden (Kreidenweiss et al., 2019). Die Reaktionen zeigten in jedem Fluoreszenzkanal eine typisch sigmoidal verlaufende Amplifikation. Nachfolgend ist für die *P. falciparum* Stämme 3D7 (*pfhrp2+* und *pfhrp3+*), Dd2 (*pfhrp2-* und *pfhrp3+*) und HB3 (*pfhrp2+* und *pfhrp3-*) jeweils beispielhaft das Ergebnis der 4plex-qPCR für alle vier Gene dargestellt.

Tabelle 56: Beispielhafte Fluoreszenzkurven im HEX- und FAM-Kanal für die *P. falciparum* Stämme 3D7, Dd2 und HB3. Negativkontrolle: H₂O

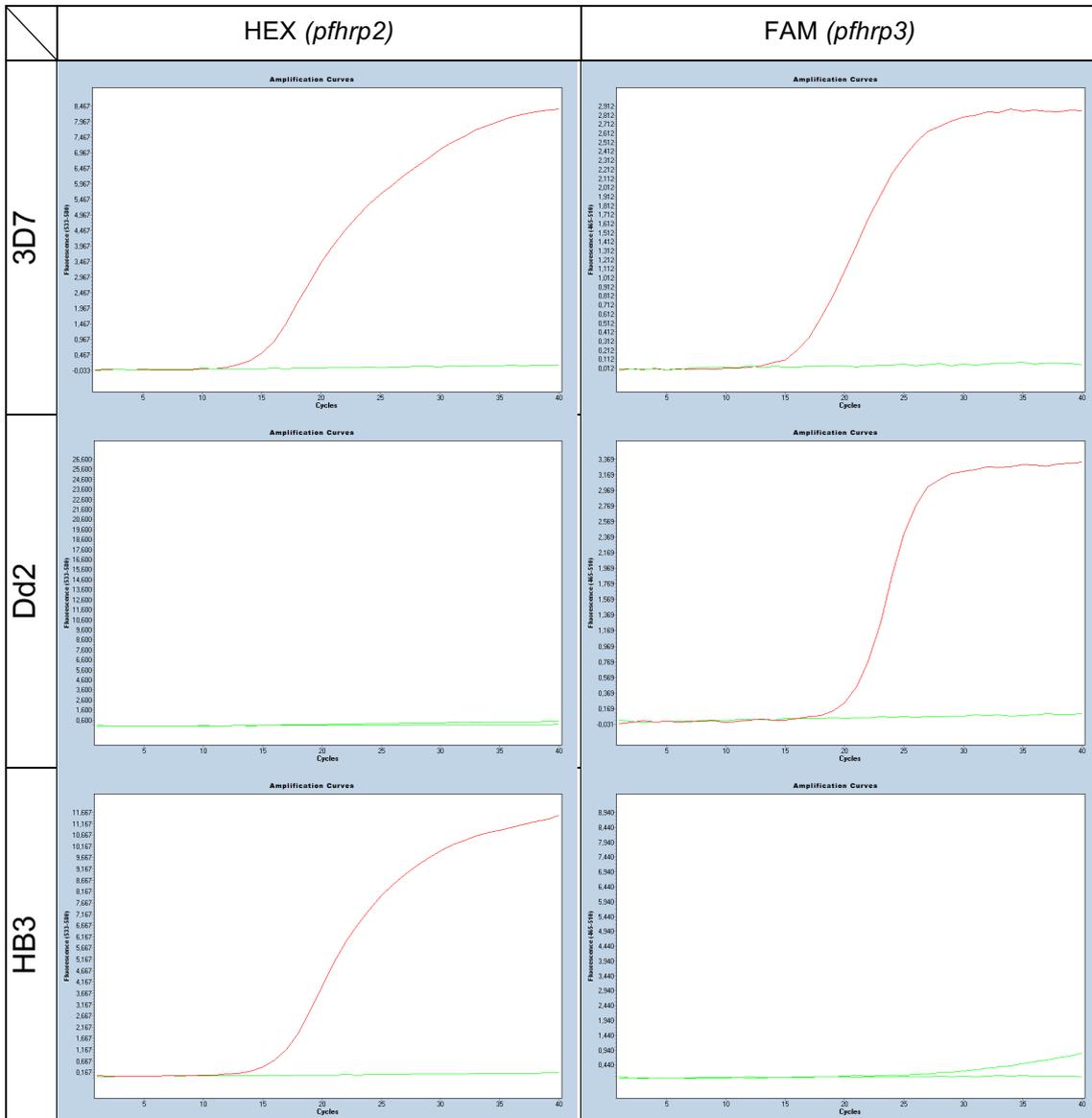
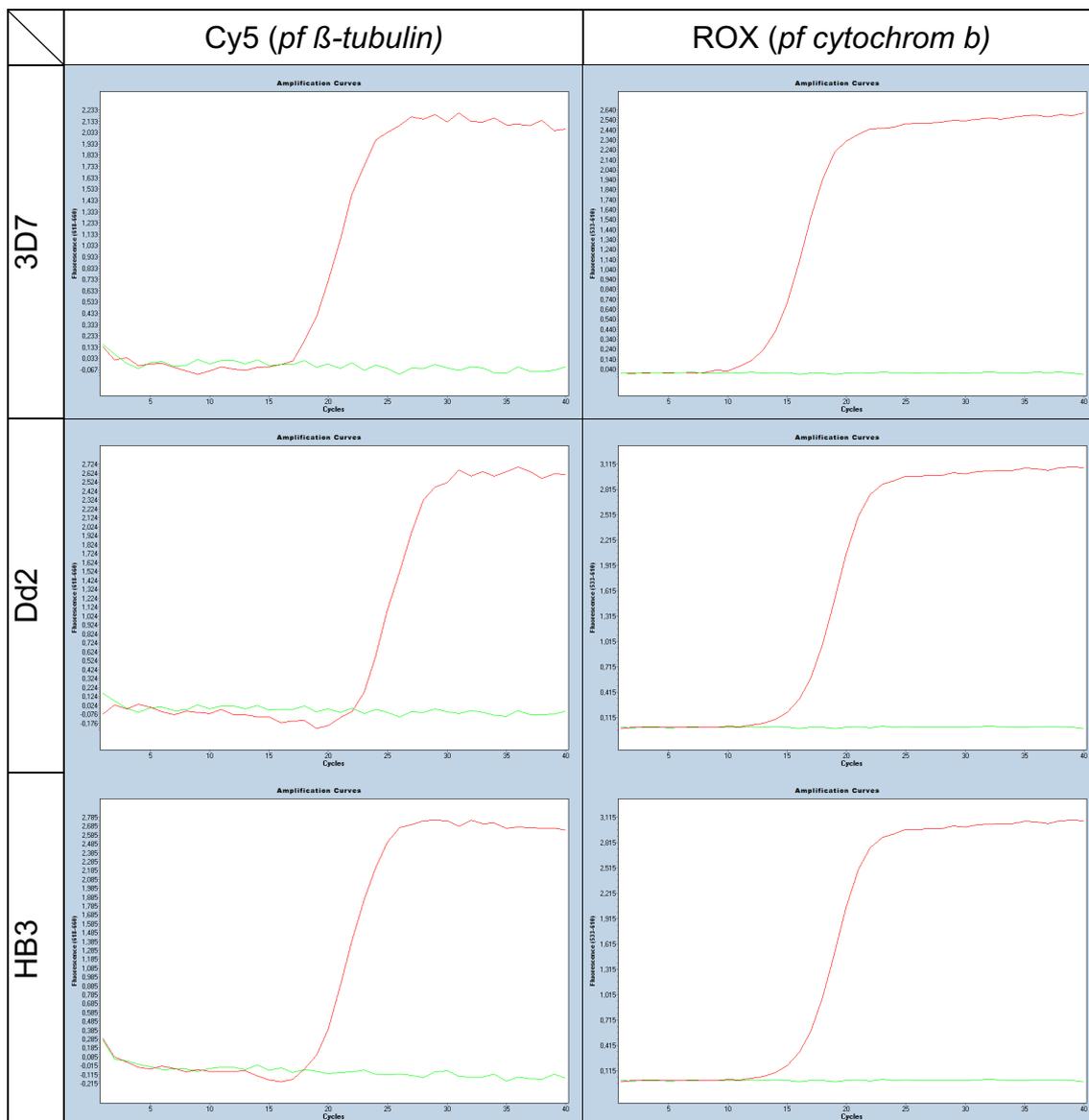


Tabelle 57: Beispielhafte Fluoreszenzkurven im HEX- und FAM-Kanal für die *P. falciparum* Stämme 3D7, Dd2 und HB3. Negativkontrolle: H₂O



Spezifität der Sonden für *pfhrp2* und *pfhrp3*

Für die Untersuchung der Spezifität der *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Sonden wurde die 4plex-Reaktion mit einer Verdünnungsreihe der DNA aus HB3 und Dd2 durchgeführt (Positivkontrolle: DNA aus 3D7-Parasitenkultur). Die *pfhrp2*-Sonde zeigte keine Kreuzreaktion mit *pfhrp3* (Signal im HEX-Kanal für Dd2 negativ, s. Abb. 22). Die *pfhrp3*-Sonde wies eine leichte Kreuzreaktion mit *pfhrp2* auf (Signal im FAM-Kanal für HB3 positiv, s. Abb. 23)(Kreidenweiss et al., 2019).

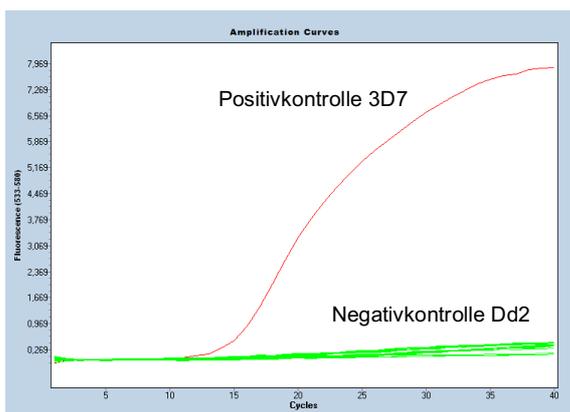


Abbildung 22: Spezifität der *pfhrp2*-Sonde (HEX-Kanal) in der 4plex-qPCR

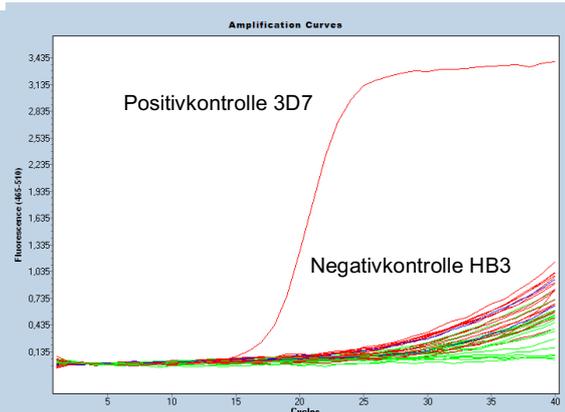


Abbildung 23: Spezifität der *pfhrp3*-Sonde (FAM-Kanal) in der 4plex-qPCR

Wiederholbarkeit

Als „Wiederholbarkeit“ wird in den MIQE-Leitlinien (Bustin et al., 2009) die Intraassay-Variation bezeichnet. Dafür wurde innerhalb eines Experiments die gleiche Untersuchungsprobe mit dem gleichen Reaktionsgemisch zehnmals gemessen. In Tabelle 58 sind die Mittelwerte der C_q-Werte sowie die zugehörige Standardabweichung aller vier Gene aufgeführt.

Tabelle 58: Mittelwert und Standardabweichung (SD) der C_q-Werte aus 10-facher Wiederholung der 4plex Reaktion innerhalb eines Durchlaufs für die vier Kanäle HEX, FAM, Cy5 und ROX

	HEX	FAM	Cy5	ROX
C_q-Mittelwert	16,40	18,04	18,60	12,30
SD	0,06	0,06	0,06	0,07

Standardkurven

Für das 4plex-qPCR Assay wurde eine Standardkurve unter Verwendung von Proben mit unterschiedlicher Parasitämie bestimmt. Hierzu wurden 3D7 Parasiten seriell mit Vollblut verdünnt (s. 2.2.4) und die DNA extrahiert. Als Negativkontrollen wurden Vollblut, Kulturmedium und Wasser eingesetzt.

Aus den Messwerten der qPCR lässt sich für jedes Gen eine Standardkurve erstellen, den linearen Detektionsbereich der qPCR bestimmen und die Effizienz des qPCR-Protokolls berechnen. Zur Bestimmung des Detektionslimits wurde jede Konzentrationsstufe der Parasitenverdünnungsreihe in Triplikaten

gemessen und in vier unabhängigen Durchläufen wiederholt. Waren mindestens elf der zwölf Ergebnisse positiv, wurde die Verdünnungsstufe als positiv gewertet.

Die 4plex-qPCR zeigt für alle vier Gene einen linearen Zusammenhang zwischen zunehmender Ausgangsparasitämie und dem gemessenen Cq-Wert (s. Abb. 24-27). Insgesamt sind alle Assays hochsensitiv und können eine Parasitämie von bis zu 60 Parasiten/ml Blut im Fall von *pf cytochrom b*, von bis zu 204 Parasiten/ml für *pfhrp2* und *pfhrp3* und 600 Parasiten/ml für *pf β-tubulin* detektieren. Die Amplifikationseffizienz liegt für alle vier Gene zwischen 100% und 112% und zeigt somit, dass die Assaybedingungen ideal sind (Kreidenweiss et al., 2019).

pfhrp2

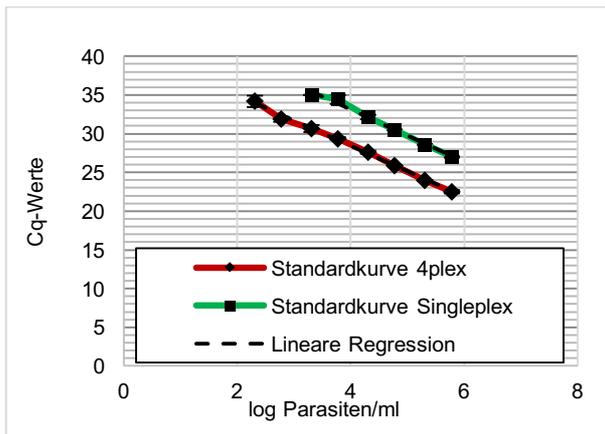


Abbildung 24: Standardkurve der 4plex-qPCR für *pfhrp2*

Lineare Regression:

$$y = -3,2692x + 41,488$$

$$R^2 = 0,99604$$

Effektivität: 1,02

Tabelle 59: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pfhrp2*-4plex-Reaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	22,53	0,22
204000	24,01	0,03
60000	25,91	0,04
20400	27,60	0,19
6000	29,36	0,16
2040	30,67	0,42
600	31,88	0,34
204	34,18	0,77

Detektionslimit:

204 Parasiten/ml

pfhrp3

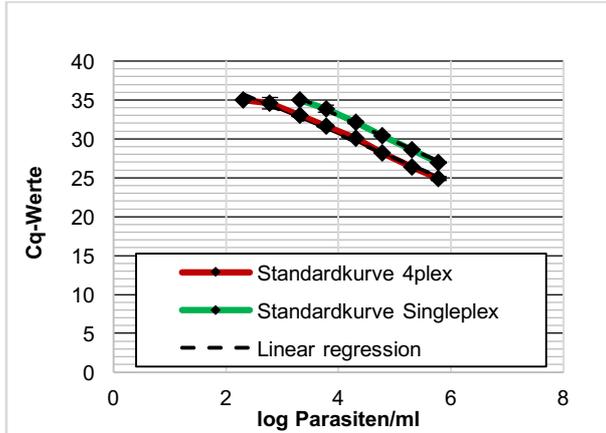


Abbildung 25: Standardkurve der 4plex-qPCR für *pfhrp3*

Lineare Regression:

$$y = -3,0578x + 42,826$$

$$R^2 = 0,98784$$

Effektivität: 1,12

Tabelle 60: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pfhrp3*-4plex-Reaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	24,86	0,25
204000	26,34	0,06
60000	28,20	0,04
20400	30,09	0,07
6000	31,64	0,16
2040	32,98	0,16
600	34,57	0,75
204	35,00	0,00

Detektionslimit:

204 Parasiten/ml

pf β-tubulin

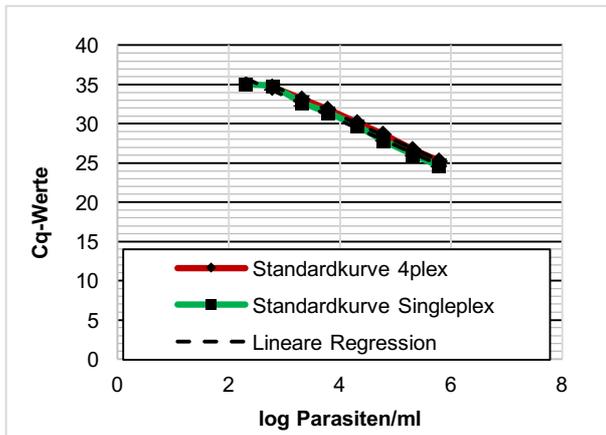


Abbildung 26: Standardkurve der 4plex-qPCR für *pf β-tubulin*

Lineare Regression:

$$y = -3,1892x + 43,755$$

$$R^2 = 0,9986$$

Effektivität: 1,06

Tabelle 61: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pf β-tubulin*-4plex-Reaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	25,25	0,24
204000	26,69	0,06
60000	28,65	0,05
20400	30,12	0,06
6000	31,85	0,10
2040	33,19	0,36
600	34,74	0,46

Detektionslimit:

600 Parasiten/ml

pf cytochrom b

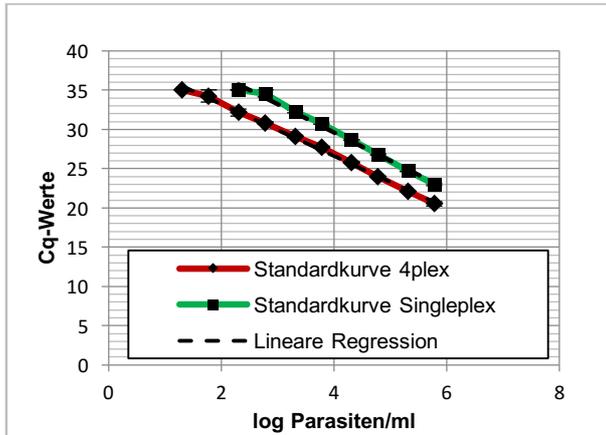


Abbildung 27: Standardkurve der 4plex-qPCR für *pf cytochrom b*

Lineare Regression:

$$y = -3,3092x + 39,872$$

$$R^2 = 0,99689$$

Effektivität: 1,01

Tabelle 62: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Cq-Werte für den „Linear dynamic range“ der *pf cytochrom b*-4plex-Reaktionen

P/ml	Cq-Mittelwert	SD
600000	20,52	0,28
204000	22,10	0,05
60000	23,98	0,06
20400	25,80	0,10
6000	27,72	0,10
2040	29,11	0,18
600	30,83	0,16
204	32,17	0,45
60	34,25	0,77

Detektionslimit:

60 Parasiten/ml

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine qPCR zur Detektion von Deletionen des *pfhrp2* und/ oder des *pfhrp3*-Gens etabliert. Der Assay konnte erfolgreich zu einer 4plex-qPCR erweitert werden, womit in einem Reaktionsansatz parallel zur Detektion von *pfhrp2* und *pfhrp3* sowohl das Vorhandensein einer *P. falciparum* Infektion kontrolliert wird (*pf cytochrom b*), als auch eine Qualitätskontrolle der Proben-DNA (*pf β -tublin*) stattfindet. Dieses neue Multiplex-qPCR-Protokoll ermöglicht kosteneffizient, Probenmaterial- und Zeit sparend viele Proben, wie sie z. B. bei epidemiologischen Studien anfallen, zu screenen. Das Detektionslimit des 4plex-qPCR-Protokolls liegt für *pfhrp2* und *pfhrp3* bei 204 Parasiten/ml, für *pf β -tublin* bei 600 Parasiten/ml und für *pf cytochrom b* bei 60 Parasiten/ml (Kreidenweiss et al., 2019).

Die Optimierung eines Multiplex-qPCR-Protokolls ist aufgrund zahlreicher Einzelparameter, die miteinander interagieren, ein komplexer und langwieriger Vorgang. Im Rahmen der 4plex-qPCR-Etablierung wurden unter anderem vier unterschiedliche Mastermixe, verschiedene Hybridisierungs- und Elongationstemperaturen und -dauern sowie Konzentrationen der Reaktionskomponenten verglichen. Als entscheidend stellte sich eine verlängerte Hybridisierungs- und Elongationsdauer heraus (üblicherweise: 30 sec, hier: 150 sec). Das etablierte Protokoll wurde an zwei qPCR-Geräten getestet und funktioniert sowohl am Rotor-Gene 3000 als auch am LightCycler 480 II.

Die Wahl der Sequenzen für die Primer und Sonden zur spezifischen Amplifikation des *pfhrp2*- und des *pfhrp3*-Gens war nicht ganz einfach und bedarf eventuell einer Verbesserung und Etablierung eines adaptierten 4plex-qPCR-Protokolls. Obwohl die beiden Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, sind die DNA Sequenzen von *pfhrp2* und *pfhrp3* über weite Bereiche homolog. Dies betrifft insbesondere Exon 1 und Exon 2 im zentralen Bereich der Alanin-Histidin-Repeats. Die ausgewählten Sequenzen der Primer und der beiden Sonden sind im 5'-Bereich des jeweiligen Exon 2 lokalisiert. Die Forward- und Reverseprimer unterscheiden sich jeweils nur in

einer bzw. zwei Basen. Die *pfhrp2*-Sonde unterscheidet sich vom *pfhrp3*-Gen in nur einer Base, die *pfhrp3*-Sonde in zwei Basen vom *pfhrp2*-Gen. Tatsächlich konnte bei den Primersets für *pfhrp2* und *pfhrp3* eine Kreuzamplifikation des jeweils anderen Gens gemessen werden (s. Abb. 3-4). Die Spezifität wird über die Sonden erreicht. Dafür wurden 3'-minor groove binder (MGB)-Sonden gewählt, die eine Erhöhung der Spezifität versprechen (Lukhtanov et al., 1995). In Singleplex-Messungen erwiesen sich die Sonden am Rotor Gene 3000 als hoch spezifisch. Bei Messungen am Lightcycler 480 II, ein neueres, hoch sensitives Gerät, zeigte sich jedoch eine leicht falsch positive Detektion von *pfhrp3* (s. Abb. 23). Diese ist abhängig von der Proben-DNA-Menge. Das falsch positive Fluoreszenzsignal nimmt mit steigender Konzentration zu. Durch den Verlauf des Signalanstiegs lässt sich jedoch gut zwischen richtig und falsch positiver Detektion unterscheiden. In der Praxis empfiehlt es sich deshalb DNA von HB3 und Dd2 jeweils als Kontrollen für *pfhrp3*- bzw. *pfhrp2*-Deletionen im selben Ansatz mit zu messen und die maschinelle Bewertung von positiv und negativ durch optische Bewertung des Kurvenverlaufs zu verifizieren. Interessanterweise, zeigt die *pfhrp2*-Sonde keine unspezifische Amplifikation des *pfhrp3*-Gens, obwohl sich Gen und Sonde in nur einer Base unterscheiden. Die Amplifikation des *pf β-tubulin*-Gens hat in der 4plex-qPCR die Funktion einer internen Amplifikationskontrolle (IAC). *Pf β-tubulin* ist wie *pfhrp2* und *pfhrp3* ein „single copy gene“ und hilft falsch negative von richtig negativen *pfhrp2/ 3*-qPCR-Ergebnissen zu unterscheiden bzw. richtig positive Ergebnisse zu bestätigen. Allerdings hat sich gezeigt, dass die *pf β-tubulin*-Detektion weniger sensitiv ist als die von *pfhrp2/ 3*. Daraus folgt, dass ein negatives Ergebnis für alle drei Gene nicht zwangsweise bedeuten muss, dass nicht genug DNA für eine potentielle Detektion von *pfhrp2* und *pfhrp3* vorhanden ist. Deshalb lässt sich im Fall einer Parasitämie zwischen den Detektionslimits von *pfhrp2/ pfhrp3* und *pf β-tubulin* (204-600 Parasiten/ml) nicht zwischen einer echten Deletion und einem Mangel an DNA als Ursache für das negative Ergebnis diskriminieren. Resultat ist ein höheres Detektionslimit bei Proben mit Deletionen beider Gene (*pfhrp2* und *pfhrp3*) (Kreidenweiss et al., 2019). Liegt nur eine Deletion eines

der beiden Gene vor, kann bei einem negativen Ergebnis für *pf* β -*tublin* das jeweils andere die Rolle der IAC übernehmen.

Eine weitere Beobachtung ist, dass die Amplifikation des *pf* β -*tublin*-Gens mittels einer Cy5 markierten Sonden zwar den typisch sigmoidalen Verlauf nimmt, jedoch insgesamt minimale Fluoreszenzintensitätsschwankungen über den gesamten Verlauf zeigt, so dass die Kurve als „zitterig“ erscheint (s. Abb. 18). Es wurden viele Möglichkeiten ausprobiert diese zu eliminieren, jedoch ohne Erfolg. Allerdings hat diese ungewöhnliche Erscheinung keine relevante Auswirkung auf das Messergebnis und die Bestimmung des Cq-Wertes. Eventuell kann ein Wechsel des Farbstoffs oder eine andere Farbstoff-Quencher-Kombination erwogen werden.

Im Klinikalltag werden *P. falciparum* Infektionen vor allem anhand der lichtmikroskopischen Untersuchung eines mit Giemsalösung gefärbten dicken Tropfens oder Antigen-basierten Schnelltests (RDTs) diagnostiziert. Das Detektionslimit der Mikroskopie liegt bei erfahrenen Mikroskopisten unter Feldbedingungen bei 50.000-100.000 Parasiten/ml Blut. Bei schlechtem Equipment oder mangelnder Erfahrung ist mit einem deutlich höheren Detektionslimit zu rechnen (Wongsrichanalai et al., 2007). Schnelltests werden ab einem Detektionslimit von 200.000 Parasiten/ml von der WHO empfohlen (WHO, 2017b). Assays mit konventioneller PCR werden mit Detektionslimits von bis zu 50 Parasiten/ml beschrieben (Padley et al., 2003). Allerdings konnte dies in einer vergleichenden Untersuchung von PCR-Assays nicht reproduziert werden (Mixson-Hayden et al., 2010). Vu et al. stellten ein PCR-Assay mit einem Detektionslimit von 80 Parasiten/ml vor (Vu et al., 1995). Veröffentlichte Protokolle amplifizieren ganz unterschiedliche Gene (*pf18S*-rDNA, *pf**cytb*, *msp1*, *msp2*, *glurp*, ...), sind als nested oder konventionelles Protokoll angewendet und/oder unterscheiden sich sonst in allen denkbaren Parametern einer PCR (Snounou et al., 1993, Rubio et al., 1999). Da kein einheitlicher Standard zur Bestimmung des Detektionslimits verwendet wurde sind keine Vergleiche möglich (Padley et al., 2003).

Eine qPCR erreicht in vielen Fällen im Vergleich zur konventionellen PCR ein niedrigeres Detektionslimit (Dagher et al., 2004, Francino et al., 2006,

Papaparaskevas et al., 2013). In veröffentlichten qPCR Assays zur Detektion und Quantifizierung von *P. falciparum* wurde ein Detektionslimit von 20 Parasiten/ml erreicht. In all diesen Assays wurde ein Abschnitt des „multi copy genes“ 18S der ribosomalen DNA amplifiziert (Hermsen et al., 2001, Murphy et al., 2012, Andrews et al., 2005). Für ein Singleplexassay, das das *P. falciparum* spezifische *cytochrom b*-Gen detektiert, wird ein Detektionslimit von 50 Parasiten/ml angegeben (Farrugia et al., 2011). Dies entspricht dem in dieser 4plex-qPCR erreichten Detektionslimit von 60 Parasiten/ml.

Die WHO weist nachdrücklich darauf hin, dass auch in Malaria endemischen Ländern, eine Therapie erst nach positiver Diagnostik eingeleitet werden soll. Dies dient der Minimierung des Einsatzes von Malariamedikamenten um die Ausbreitung von resistenten Malariaparasiten zu begrenzen (WHO, 2010). Dies hat insbesondere zur Verbreitung und Anwendung von PfHRP2-basierten Malariaschnelltests geführt. Nach den ersten Berichten von *pfhrp2*-Gen-deletierten Parasitenstämmen in Südamerika, wurden - und werden nach wie vor - viele Studien zur Bestimmung der Prävalenz von *pfhrp2/ pfhrp3*-deletierten Malariaparasiten durchgeführt. Bislang kommen hierfür nur konventionelle PCR-Protokolle zum Einsatz. Die Qualität der publizierten Studien ist unterschiedlich. Oft sind das Probenkollektiv und die Auswahlkriterien nicht nachvollziehbar und es fehlen Qualitätskontrollen, um das Ergebnis der publizierten *pfhrp2/ 3*-Deletionen kontrollieren zu können (Akinyi et al., 2013, Maltha et al., 2012, Houze et al., 2011, Cheng et al., 2014, Kozycki et al., 2017). Auch der Nachweis, dass die beschriebenen Proben ein negatives Ergebnis im RDT zeigen ist nicht in allen Studien vorhanden (Gamboa et al., 2010, Akinyi et al., 2013, Wurtz et al., 2013, Koita et al., 2012, Cheng et al., 2014). Daneben sind keine Daten über die jeweiligen Detektionslimits der Assays genannt.

4.2 Grenzen des Nachweises von *pfhrp2*-Deletionen

Wenn in der PCR oder auch qPCR keine Amplifikation des *pfhrp2*-Gens gemessen wird, wird dies mit einer Deletion des Gens gleichgesetzt (Gamboa

et al., 2010, Koita et al., 2012, Kozycki et al., 2017, Fontecha et al., 2018). Allerdings gibt es verschiedene Ursachen, die neben einer tatsächlich vorhandenen Deletion ebenfalls zu einem negativen PCR-/ qPCR-Ergebnis führen können. Einige, wie z.B. zu geringe Probenmenge, Inhibitoren im Reaktionsgemisch, Denaturierung der DNA und Fehler in der Durchführung können durch den Einsatz einer internen Amplifikationskontrolle (hier: *pf β-tubulin*) ausgeschlossen werden. Nicht abgedeckt wird davon, dass bereits geringe Sequenzvariationen im Bereich der Primer- oder Sondenabschnitte durch deren hohe Spezifität die Amplifikation und Detektion in PCR/ qPCR verhindern können. Diese Variationen müssen aber nicht unbedingt entscheidenden Einfluss auf das Protein PfHRP2 haben und können damit für die Detektion im RDT irrelevant sein.

Umgekehrt muss ein positives PCR-/ qPCR-Ergebnis nicht zwangsläufig dazu führen, dass PfHRP2 im Blut nachgewiesen, bzw. von RDTs detektiert werden kann. Für die molekulargenetische Detektion sind nur die Genabschnitte an denen die Primer und Sonden binden relevant. Eine Deletion oder Mutation eines anderen Abschnitts, oberhalb und/ oder unterhalb, kann somit stattgefunden haben ohne dass dies Einfluss auf das qPCR-Ergebnis hat (Cheng et al., 2014). Nichtsdestotrotz, können diese Bereiche entscheidend sein damit ein funktionelles Protein exprimiert und ggf. mittels RDT nachgewiesen werden kann. Die Problematik durch das Gleichsetzen von „Amplifikation detektiert“ mit „keine Deletion“ in PCR-Assays wird in Veröffentlichungen von Fontecha et al. (2018) und Gamboa et al. (2010) deutlich. In beiden werden in *pfhrp2* und *pfhrp3* jeweils zwei Genabschnitte amplifiziert. In einigen Proben wurde nur einer der beiden Genabschnitte amplifiziert. Getrennt voneinander betrachtet würde das eine Ergebnis als „Deletion“ und das andere als „keine Deletion“ interpretiert werden. Ob also eine partielle Deletion detektiert wird hängt davon ab, ob die Sequenzabschnitte an denen Primer und/ oder Sonden binden betroffen sind. Durch Elektrophorese des Amplifikationsprodukts und Vergleich der Länge des Produkts mit der erwarteten Länge könnten größere Deletionen zwischen den Bindungsstellen der Oligonukleotide ausgeschlossen werden.

Mutationen insbesondere in Genabschnitten, die für Antikörperbindungsstellen kodieren haben großen Einfluss auf die Detektierbarkeit in RDTs ohne zwangsweise in PCRs/ qPCRs erfasst zu werden (Baker et al., 2005, Cheng et al., 2014).

Es ist bekannt, dass Mehrfachinfektionen mit mehreren *P. falciparum* Stämmen verbreitet sind (Ntoumi et al., 1995, Henning et al., 2004, Soulama et al., 2009, al-Yaman et al., 1997, Arnot, 1998, Mayengue et al., 2007). Abhängig vom Mengenverhältnis von *pfhrp2*- und/ oder *pfhrp3*-deletierten Stämmen und Stämmen ohne Deletion bleiben Stämme mit Deletionen in der PCR/ qPCR unentdeckt. Dies führt zur Unterschätzung der Prävalenz von *P. falciparum* Stämmen mit *pfhrp2*-Deletionen (Kreidenweiss et al., 2019).

4.3 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein qPCR-Protokoll etabliert werden mit dem parallel *P. falciparum* Infektionen, *pfhrp2*- und *pfhrp3*-Deletionen, sowie eine Qualitätskontrolle hochsensitiv nachgewiesen werden können. In der Multiplex-qPCR konnten folgende Detektionslimits erzielt werden: *pfhrp2*:

204 Parasiten/ml Blut, *pfhrp3*: 204 Parasiten/ml, *pf cytochrom b*: 60 Parasiten/ml, *pf β -tublin*: 600 Parasiten/ml. Dies entspricht bis auf für *pf β -tublin* (204 Parasiten/ml) dem gleichen Detektionslimit, das auch in den Singleplexreaktionen gemessen wurde. Im Vergleich zu anderen Methoden und Assays wurde damit eine sehr hohe Sensitivität erreicht, die ca. 1000-mal sensitiver als Schnelltests ist und ca. 250-mal sensitiver als standardmäßige Mikroskopie (Kreidenweiss et al., 2019).

4.4 Ausblick

Das 4plex-qPCR-Protokoll muss nun an einem menschlichen Probenkollektiv, das sowohl Blutproben von infizierten Personen als auch von uninfizierten Personen enthält, validiert werden. Des Weiteren ist ein Praxistest unter Feldbedingungen, z.B. Durchführung in Afrika, notwendig. Das qPCR-Protokoll

wird dann bei epidemiologischen Studien in Afrika eingesetzt werden (Kreidenweiss et al., 2019).

Darüber hinaus sind unterschiedliche Verbesserungsstrategien denkbar: Eine weitere Erhöhung der Sensitivität des Assays könnte durch eine vorgeschaltete Präamplifikation erreicht werden (Tran et al., 2014). Eventuell könnte die Sensitivität auch durch ein neues Design von Primern und Sonden, deren Schmelztemperaturen näher beieinanderliegen erreicht werden. Eine Verbesserung der Spezifität für *pfhrp3* könnte durch ein spezifischeres Design der *pfhrp3*-Primer und/ oder -Sonde erzielt werden. Durch einen anderen Farbstoff oder Quencher kann versucht werden das „Zittern“ der Fluoreszenzkurve für *pf β-tublin* zu eliminieren.

5 Zusammenfassung

Plasmodium falciparum ist Erreger der potentiell letalen Malaria tropica. In der Routinediagnostik wird die Infektion mit Mikroskopie oder Antigen-basierten Schnelltests (Rapid diagnostic tests, RDT) nachgewiesen. Diese ist Grundlage für die Therapieentscheidung und damit Teil der lebensrettenden Intervention. Ein Großteil der RDTs verwendet als Antigen *P. falciparum*-spezifisches Histidin-reiches Protein 2 (PfHRP2).

Gamboa et al. berichteten 2010 erstmals von *P. falciparum* Stämmen in Peru, die durch PfHRP2-basierte RDTs nicht nachgewiesen werden konnten, weil sie durch eine Deletion des *pfhrp2*-Gens kein PfHRP2-Protein exprimieren. Eine daraus resultierende falsch negative Diagnostik in RDTs kann schwerwiegende Folgen haben und die Eliminierung der Malaria erschweren.

Mittlerweile wurden *P. falciparum* Stämme mit *pfhrp2*-Gendeletionen in allen Malariaregionen weltweit nachgewiesen. Der Nachweis wird mittels konventioneller PCR auf den *pfhrp2*-Genlocus geführt. In vielen Endemiegebieten in Afrika gibt es jedoch bis jetzt kaum gut erhobene Daten über den *pfhrp2*-Status der dortigen Parasitenpopulation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Multiplex-qPCR zur Detektion von Deletionen etabliert. Mit dieser Methode können zeiteffizient große Stichproben untersucht werden. Mit dem neuen 4plex-qPCR-Protokoll konnten neben *pfhrp2* und *pfhrp3*, die wichtig für die RDT-Diagnostik sind, parallel *pf β-tublin* und *pf cytochrom b* detektiert werden. *Pf β-tublin* ist wie *pfhrp2* ein „single copy gene“ und dient hier entsprechend als Kontrollgen. Das Protein von *pfhrp3* reagiert durch seine Ähnlichkeit zu PfHRP2 ebenfalls in RDTs und auch Deletionen dieses Gens wurden beobachtet. Deshalb soll auch dieses Gen parallel amplifiziert werden. *Pf cytochrom b* dient dem Nachweis einer *P. falciparum* Infektion. Das Detektionslimit liegt für *pfhrp2* und *pfhrp3* bei 204 Parasiten/ml Blut, für *pf β-tublin* bei 600 Parasiten/ml und für *pfcytb* bei 60 Parasiten/ml. Im Vergleich zu anderen diagnostischen Methoden (Mikroskopie und RDT) wurde damit eine viel höhere Sensitivität erreicht. Das etablierte Protokoll wurde an zwei qPCR-Geräten getestet und funktioniert sowohl am Rotor-Gene 3000 als auch am LightCycler 480 II.

Das 4plex-qPCR-Protokoll muss nun mit Proben aus einem Patientenkollektiv von Infizierten und Uninfizierten weiter validiert werden, bevor es im Rahmen von epidemiologischen Studien in Afrika eingesetzt werden wird.

6 Literaturverzeichnis

- ABBA, K., DEEKS, J. J., OLLIARO, P., NAING, C. M., JACKSON, S. M., TAKWOINGI, Y., DONEGAN, S. & GARNER, P. 2011. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008122.
- AKINYI, S., HAYDEN, T., GAMBOA, D., TORRES, K., BENDEZU, J., ABDALLAH, J. F., GRIFFING, S. M., QUEZADA, W. M., ARROSPIDE, N., DE OLIVEIRA, A. M., LUCAS, C., MAGILL, A. J., BACON, D. J., BARNWELL, J. W. & UDHAYAKUMAR, V. 2013. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Sci Rep*, 3, 2797.
- AL-YAMAN, F., GENTON, B., REEDER, J. C., ANDERS, R. F., SMITH, T. & ALPERS, M. P. 1997. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91, 602-5.
- AMOAH, L. E., ABANKWA, J. & OPPONG, A. 2016. *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. *Malar J*, 15, 101.
- ANDREWS, L., ANDERSEN, R. F., WEBSTER, D., DUNACHIE, S., WALTHER, R. M., BEJON, P., HUNT-COOKE, A., BERGSON, G., SANDERSON, F., HILL, A. V. & GILBERT, S. C. 2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 191-8.
- ARNOT, D. 1998. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92, 580-5.
- ATROOSH, W. M., AL-MEKHLAFI, H. M., AL-JASARI, A., SADY, H., AL-DELAIMY, A. K., NASR, N. A., DAWAKI, S., ABDULSALAM, A. M., ITHOI, I., LAU, Y. L., FONG, M. Y. & SURIN, J. 2015. Genetic variation of pfhrp2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Yemen and the performance of HRP2-based malaria rapid diagnostic test. *Parasit Vectors*, 8, 388.
- BAKER, J., HO, M. F., PELECANOS, A., GATTON, M., CHEN, N., ABDULLAH, S., ALBERTINI, A., ARIEY, F., BARNWELL, J., BELL, D., CUNNINGHAM, J., DJALLE, D., ECHEVERRY, D. F., GAMBOA, D., HII, J., KYAW, M. P., LUCHAVEZ, J., MEMBI, C., MENARD, D., MURILLO, C., NHEM, S., OGUTU, B., ONYOR, P., OYIBO, W., WANG, S. Q., MCCARTHY, J. & CHENG, Q. 2010. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malar J*, 9, 129.
- BAKER, J., MCCARTHY, J., GATTON, M., KYLE, D. E., BELIZARIO, V., LUCHAVEZ, J., BELL, D. & CHENG, Q. 2005. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J Infect Dis*, 192, 870-7.
- BHARTI, P. K., CHANDEL, H. S., AHMAD, A., KRISHNA, S., UDHAYAKUMAR, V. & SINGH, N. 2016. Prevalence of pfhrp2 and/or pfhrp3 Gene Deletion in *Plasmodium falciparum* Population in Eight Highly Endemic States in India. *PLoS One*, 11, e0157949.

- BROWN, W. M., YOWELL, C. A., HOARD, A., VANDER JAGT, T. A., HUNSAKER, L. A., DECK, L. M., ROYER, R. E., PIPER, R. C., DAME, J. B., MAKLER, M. T. & VANDER JAGT, D. L. 2004. Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from the four species of human malarial parasites. *Biochemistry*, 43, 6219-29.
- BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEWER, C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, 611-22.
- CHA, R. S., ZARBL, H., KEOHAVONG, P. & THILLY, W. G. 1992. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl*, 2, 14-20.
- CHENG, Q., GATTON, M. L., BARNWELL, J., CHIODINI, P., MCCARTHY, J., BELL, D. & CUNNINGHAM, J. 2014. Plasmodium falciparum parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malar J*, 13, 283.
- CHIODINI, P. L., BOWERS, K., JORGENSEN, P., BARNWELL, J. W., GRADY, K. K., LUCHAVEZ, J., MOODY, A. H., CENIZAL, A. & BELL, D. 2007. The heat stability of Plasmodium lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101, 331-7.
- CHRISTOPHERSON, C., SNINSKY, J. & KWOK, S. 1997. The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. *Nucleic Acids Res*, 25, 654-8.
- DAGHER, H., DONNINGER, H., HUTCHINSON, P., GHILDYAL, R. & BARDIN, P. 2004. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods*, 117, 113-21.
- DEME, A. B., PARK, D. J., BEI, A. K., SARR, O., BADIANE, A. S., GUEYE PEL, H., AHOUIDI, A., NDIR, O., MBOUP, S., WIRTH, D. F., NDIAYE, D. & VOLKMAN, S. K. 2014. Analysis of pfhrp2 genetic diversity in Senegal and implications for use of rapid diagnostic tests. *Malar J*, 13, 34.
- EDWARDS, M. C. & GIBBS, R. A. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl*, 3, S65-75.
- FARNERT, A., AREZ, A. P., BABIKER, H. A., BECK, H. P., BENITO, A., BJORKMAN, A., BRUCE, M. C., CONWAY, D. J., DAY, K. P., HENNING, L., MERCEREAU-PUIJALON, O., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C., RUBIO, J. M., SNOUNOU, G., WALLIKER, D., ZWETYENGA, J. & DO ROSARIO, V. E. 2001. Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95, 225-32.
- FARRUGIA, C., CABARET, O., BOTTEREL, F., BORIES, C., FOULET, F., COSTA, J. M. & BRETAGNE, S. 2011. Cytochrome b gene quantitative PCR for diagnosing Plasmodium falciparum infection in travelers. *J Clin Microbiol*, 49, 2191-5.
- FONTECHA, G., MEJIA, R. E., BANEGAS, E., ADE, M. P., MENDOZA, L., ORTIZ, B., SABILLON, I., ALVARADO, G., MATAMOROS, G. & PINTO, A. 2018. Deletions of

- pfhrp2 and pfhrp3 genes of *Plasmodium falciparum* from Honduras, Guatemala and Nicaragua. *Malar J*, 17, 320.
- FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SANCHEZ, A. & ROURA, X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 137, 214-21.
- GAMBOA, D., HO, M. F., BENDEZU, J., TORRES, K., CHIODINI, P. L., BARNWELL, J. W., INCARDONA, S., PERKINS, M., BELL, D., MCCARTHY, J. & CHENG, Q. 2010. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One*, 5, e8091.
- HARVEY, S. A., JENNINGS, L., CHINYAMA, M., MASANINGA, F., MULHOLLAND, K. & BELL, D. R. 2008. Improving community health worker use of malaria rapid diagnostic tests in Zambia: package instructions, job aid and job aid-plus-training. *Malar J*, 7, 160.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- HENNING, L., SCHELLENBERG, D., SMITH, T., HENNING, D., ALONSO, P., TANNER, M., MSHINDA, H., BECK, H. P. & FELGER, I. 2004. A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98, 687-94.
- HERMSEN, C. C., TELGT, D. S., LINDERS, E. H., VAN DE LOCHT, L. A., ELING, W. M., MENSINK, E. J. & SAUERWEIN, R. W. 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasitol*, 118, 247-51.
- HOUZE, S., HUBERT, V., LE PESSEC, G., LE BRAS, J. & CLAIN, J. 2011. Combined deletions of pfhrp2 and pfhrp3 genes result in *Plasmodium falciparum* malaria false-negative rapid diagnostic test. *J Clin Microbiol*, 49, 2694-6.
- HOWARD, R. J., UNI, S., AIKAWA, M., ALEY, S. B., LEECH, J. H., LEW, A. M., WELLEMS, T. E., RENER, J. & TAYLOR, D. W. 1986. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Biol*, 103, 1269-77.
- KAMAU, E., TOLBERT, L. S., KORTEPETER, L., PRATT, M., NYAKOE, N., MURINGO, L., OGUTU, B., WAITUMBI, J. N. & OCKENHOUSE, C. F. 2011. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *J Clin Microbiol*, 49, 2946-53.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P. & DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-9.
- KEMP, D. J., THOMPSON, J. K., WALLIKER, D. & CORCORAN, L. M. 1987. Molecular karyotype of *Plasmodium falciparum*: conserved linkage groups and expendable histidine-rich protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7672-6.

- KILIAN, A. H., METZGER, W. G., MUTSCHELKNAUSS, E. J., KABAGAMBE, G., LANGI, P., KORTE, R. & VON SONNENBURG, F. 2000. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. *Trop Med Int Health*, 5, 3-8.
- KOITA, O. A., DOUMBO, O. K., OUATTARA, A., TALL, L. K., KONARE, A., DIAKITE, M., DIALLO, M., SAGARA, I., MASINDE, G. L., DOUMBO, S. N., DOLO, A., TOUNKARA, A., TRAORE, I. & KROGSTAD, D. J. 2012. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. *Am J Trop Med Hyg*, 86, 194-8.
- KOZYCKI, C. T., UMULISA, N., RULISA, S., MWIKARAGO, E. I., MUSABYIMANA, J. P., HABIMANA, J. P., KAREMA, C. & KROGSTAD, D. J. 2017. False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of Plasmodium falciparum isolates lacking hrp2 and declining malaria transmission. *Malar J*, 16, 123.
- KREIDENWEISS, A., TRAUNER, F., RODI, M., KOEHNE, E., HELD, J., WYNDORPS, L., MANOUANA, G. P., MCCALL, M., ADEGNIKA, A. A., LALREMRUATA, A., KREMSNER, P. G., FENDEL, R. & SANDRI, T. L. 2019. Monitoring the threatened utility of malaria rapid diagnostic tests by novel high-throughput detection of Plasmodium falciparum hrp2 and hrp3 deletions: A cross-sectional, diagnostic accuracy study. *EBioMedicine*, 50, 14-22.
- KUMAR, N., SINGH, J. P., PANDE, V., MISHRA, N., SRIVASTAVA, B., KAPOOR, R., VALECHA, N. & ANVIKAR, A. R. 2012. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian Plasmodium falciparum population: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. *Malar J*, 11, 298.
- KUMAR, S., STECHER, G. & TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33, 1870-4.
- KUTYAVIN, I. V., AFONINA, I. A., MILLS, A., GORN, V. V., LUKHTANOV, E. A., BELOUSOV, E. S., SINGER, M. J., WALBURGER, D. K., LOKHOV, S. G., GALL, A. A., DEMPCY, R., REED, M. W., MEYER, R. B. & HEDGPETH, J. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 28, 655-61.
- KWOK, S., KELLOGG, D. E., MCKINNEY, N., SPASIC, D., GODA, L., LEVENSON, C. & SNINSKY, J. J. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res*, 18, 999-1005.
- KYABAYINZE, D. J., TIBENDERANA, J. K., ODONG, G. W., RWAKIMARI, J. B. & COUNIHAN, H. 2008. Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for Plasmodium falciparum malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malar J*, 7, 221.
- LALREMRUATA, A. 2016. *SOP010-ITM CTP Sampling, storage and total nucleic acids extraction of blood*. Universität Tübingen.
- LEE, M. A., TAN, C. H., AW, L. T., TANG, C. S., SINGH, M., LEE, S. H., CHIA, H. P. & YAP, E. P. 2002. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol*, 40, 4343-5.
- LI, B., SUN, Z., LI, X., LI, X., WANG, H., CHEN, W., CHEN, P., QIAO, M. & MAO, Y. 2017. Performance of pfHRP2 versus pLDH antigen rapid diagnostic tests for the

- detection of *Plasmodium falciparum*: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci*, 13, 541-549.
- LI, P., XING, H., ZHAO, Z., YANG, Z., CAO, Y., LI, W., YAN, G., SATTABONGKOT, J., CUI, L. & FAN, Q. 2015. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the China-Myanmar border area. *Acta Trop*, 152, 26-31.
- LUCHAVEZ, J., BAKER, J., ALCANTARA, S., BELIZARIO, V., JR., CHENG, Q., MCCARTHY, J. S. & BELL, D. 2011. Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malar J*, 10, 286.
- LUKHTANOV, E. A., KUTYAVIN, I. V., GAMPER, H. B. & MEYER, R. B., JR. 1995. Oligodeoxyribonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole oligopeptides: preparation and hybridization properties. *Bioconjug Chem*, 6, 418-26.
- LUU-THE, V., PAQUET, N., CALVO, E. & CUMPS, J. 2005. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques*, 38, 287-93.
- MACKAY, J. 2007. Introduction to kinetic (real-time) PCR. *Methods Mol Biol*, 353, 167-76.
- MALTHA, J., GAMBOA, D., BENDEZU, J., SANCHEZ, L., CNOPS, L., GILLET, P. & JACOBS, J. 2012. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PLoS One*, 7, e43094.
- MAYENGUE, P. I., KALMBACH, Y., ISSIFOU, S., KREMSNER, P. G. & NTOUMI, F. 2007. No variation in the prevalence of point mutations in the *Pfcr1* and *Pfmdr1* genes in isolates from Gabonese patients with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Res*, 100, 487-93.
- MAYXAY, M., PUKRITTAYAKAMEE, S., CHOTIVANICH, K., LOOAREESUWAN, S. & WHITE, N. J. 2001. Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95, 179-82.
- MENEGON, M., L'EPISCOPIA, M., NURAHMED, A. M., TALHA, A. A., NOUR, B. Y. M. & SEVERINI, C. 2017. Identification of *Plasmodium falciparum* isolates lacking histidine-rich protein 2 and 3 in Eritrea. *Infect Genet Evol*.
- MIXSON-HAYDEN, T., LUCCHI, N. W. & UDHAYAKUMAR, V. 2010. Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. *BMC Res Notes*, 3, 88.
- MURPHY, S. C., PRENTICE, J. L., WILLIAMSON, K., WALLIS, C. K., FANG, F. C., FRIED, M., PINZON, C., WANG, R., TALLEY, A. K., KAPPE, S. H., DUFFY, P. E. & COOKSON, B. T. 2012. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. *Am J Trop Med Hyg*, 86, 383-94.
- NDONWI, M., BURLINGAME, O. O., MILLER, A. S., TOLLEFSEN, D. M., BROZE, G. J., JR. & GOLDBERG, D. E. 2011. Inhibition of antithrombin by *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II. *Blood*, 117, 6347-54.
- NTOUMI, F., CONTAMIN, H., ROGIER, C., BONNEFOY, S., TRAPE, J. F. & MERCEREAU-PUJALON, O. 1995. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium*

- falciparum merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg*, 52, 81-8.
- OKELL, L. C., GHANI, A. C., LYONS, E. & DRAKELEY, C. J. 2009. Submicroscopic infection in Plasmodium falciparum-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*, 200, 1509-17.
- PADLEY, D., MOODY, A. H., CHIODINI, P. L. & SALDANHA, J. 2003. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol*, 97, 131-7.
- PADLEY, D. J., HEATH, A. B., SUTHERLAND, C., CHIODINI, P. L., BAYLIS, S. A. & COLLABORATIVE STUDY, G. 2008. Establishment of the 1st World Health Organization International Standard for Plasmodium falciparum DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. *Malar J*, 7, 139.
- PAL, P., DANIELS, B. P., OSKMAN, A., DIAMOND, M. S., KLEIN, R. S. & GOLDBERG, D. E. 2016. Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein II Compromises Brain Endothelial Barriers and May Promote Cerebral Malaria Pathogenesis. *MBio*, 7.
- PAPAPARASKEVAS, J., MELA, V., HOUHOULA, D. P., PANTAZATOU, A., PETRIKKOS, G. L. & TSAKRIS, A. 2013. Comparative evaluation of conventional and real-time PCR assays for detecting Bacteroides fragilis in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 51, 1593-5.
- PARR, J. B., VERITY, R., DOCTOR, S. M., JANKO, M., CAREY-EWEND, K., TURMAN, B. J., KEELER, C., SLATER, H. C., WHITESELL, A. N., MWANDAGALIRWA, K., GHANI, A. C., LIKWELA, J. L., TSHEFU, A. K., EMCH, M., JULIANO, J. J. & MESHNICK, S. R. 2017. Pfhrp2-Deleted Plasmodium falciparum Parasites in the Democratic Republic of the Congo: A National Cross-sectional Survey. *J Infect Dis*, 216, 36-44.
- PARRA, M. E., EVANS, C. B. & TAYLOR, D. W. 1991. Identification of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. *J Clin Microbiol*, 29, 1629-34.
- PERANDIN, F., MANCA, N., CALDERARO, A., PICCOLO, G., GALATI, L., RICCI, L., MEDICI, M. C., ARCANGELETTI, M. C., SNOUNOU, G., DETTORI, G. & CHEZZI, C. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*, 42, 1214-9.
- PLUCINSKI, M. M., HERMAN, C., JONES, S., DIMBU, R., FORTES, F., LJOLJE, D., LUCCHI, N., MURPHY, S. C., SMITH, N. T., CRUZ, K. R., SEILIE, A. M., HALSEY, E. S., UDHAYAKUMAR, V., AIDOO, M. & ROGIER, E. 2018. Screening for Pfhrp2/3-Deleted Plasmodium falciparum, Non-falciparum, and Low-Density Malaria Infections by a Multiplex Antigen Assay. *J Infect Dis*.
- POLOGE, L. G. & RAVETCH, J. V. 1988. Large deletions result from breakage and healing of P. falciparum chromosomes. *Cell*, 55, 869-74.
- PREISER, P. R., WILSON, R. J., MOORE, P. W., MCCREARY, S., HAJIBAGHERI, M. A., BLIGHT, K. J., STRATH, M. & WILLIAMSON, D. H. 1996. Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J*, 15, 684-93.
- PRICE, R. N., UHLEMANN, A. C., BROCKMAN, A., MCGREADY, R., ASHLEY, E., PHAIPUN, L., PATEL, R., LAING, K., LOOAREESUWAN, S., WHITE, N. J., NOSTEN, F. &

- KRISHNA, S. 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*, 364, 438-447.
- RENNIE, W., PHETSOUVANH, R., LUPISAN, S., VANISAVETH, V., HONGVANTHONG, B., PHOMPIDA, S., ALDAY, P., FULACHE, M., LUMAGUI, R., JORGENSEN, P., BELL, D. & HARVEY, S. 2007. Minimising human error in malaria rapid diagnosis: clarity of written instructions and health worker performance. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101, 9-18.
- ROCK, E. P., MARSH, K., SAUL, A. J., WELLEMS, T. E., TAYLOR, D. W., MALOY, W. L. & HOWARD, R. J. 1987. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology*, 95 (Pt 2), 209-27.
- ROUGEMONT, M., VAN SAANEN, M., SAHLI, R., HINRIKSON, H. P., BILLE, J. & JATON, K. 2004. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*, 42, 5636-43.
- RUBIO, J. M., BENITO, A., BERZOSA, P. J., ROCHE, J., PUENTE, S., SUBIRATS, M., LOPEZ-VELEZ, R., GARCIA, L. & ALVAR, J. 1999. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol*, 37, 3260-4.
- SCHERF, A. & MATTEI, D. 1992. Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*: breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes. *Nucleic Acids Res*, 20, 1491-6.
- SINGH, S. K., KOSHKIN, A. A., WENGEL, J. & NIELSEN, P. 1998. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications*, 0, 455-456.
- SMYTHE, J. A., PETERSON, M. G., COPPEL, R. L., SAUL, A. J., KEMP, D. J. & ANDERS, R. F. 1990. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 39, 227-34.
- SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., ZHU, X. P., JARRA, W., PINHEIRO, L., DO ROSARIO, V. E., THAITHONG, S. & BROWN, K. N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 61, 315-20.
- SOULAMA, I., NEBIE, I., OUEDRAOGO, A., GANSANE, A., DIARRA, A., TIONO, A. B., BOUGOUMA, E. C., KONATE, A. T., KABRE, G. B., TAYLOR, W. R. & SIRIMA, S. B. 2009. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J*, 8, 135.
- STADHOUDERS, R., PAS, S. D., ANBER, J., VOERMANS, J., MES, T. H. & SCHUTTEN, M. 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn*, 12, 109-17.
- SULLIVAN, D. J., JR., GLUZMAN, I. Y. & GOLDBERG, D. E. 1996. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*, 271, 219-22.
- TRAN, T. M., AGHILI, A., LI, S., ONGOIBA, A., KAYENTAO, K., DOUMBO, S., TRAORE, B. & CROMPTON, P. D. 2014. A nested real-time PCR assay for the quantification of

- Plasmodium falciparum DNA extracted from dried blood spots. *Malar J*, 13, 393.
- TURGUT-BALIK, D., AKBULUT, E., SHOEMARK, D. K., CELIK, V., MORETON, K. M., SESSIONS, R. B., HOLBROOK, J. J. & BRADY, R. L. 2004. Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, Plasmodium vivax. *Biotechnol Lett*, 26, 1051-5.
- UGUEN, C., RABODONIRINA, M., DE PINA, J. J., VIGIER, J. P., MARTET, G., MARET, M. & PEYRON, F. 1995. ParaSight-F rapid manual diagnostic test of Plasmodium falciparum infection. *Bull World Health Organ*, 73, 643-9.
- VERON, V., SIMON, S. & CARME, B. 2009. Multiplex real-time PCR detection of P. falciparum, P. vivax and P. malariae in human blood samples. *Exp Parasitol*, 121, 346-51.
- VIRIYAKOSOL, S., SIRIPOON, N., PETCHARAPIRAT, C., PETCHARAPIRAT, P., JARRA, W., THAITHONG, S., BROWN, K. N. & SNOUNOU, G. 1995. Genotyping of Plasmodium falciparum isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*, 73, 85-95.
- VU, T. T., TRAN, V. B., PHAN, N. T., LE, T. T., LUONG, V. H., O'BRIEN, E. & MORRIS, G. E. 1995. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89, 44-7.
- WARHURST, D. C. & WILLIAMS, J. E. 1996. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol*, 49, 533-8.
- WELLEMS, T. E. & HOWARD, R. J. 1986. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 6065-9.
- WHO 2010. Guidelines for the treatment of malaria - 2nd edition. Genf, Schweiz.
- WHO 2015. Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition.
- WHO 2016a. False-negative RDT results and implications of new reports of P.falciparum histidine-rich protein 2/3 gene deletions. Geneva, Suisse.
- WHO 2016b. *World malaria report 2016.*, Genf, Schweiz.
- WHO 2017a. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 7 (2015-2016). Genf, Schweiz.
- WHO 2017b. World malaria report 2017. Genf, Schweiz.
- WITTWER, C. T., HERRMANN, M. G., GUNDRY, C. N. & ELENITOBA-JOHNSON, K. S. 2001. Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25, 430-42.
- WONGSRICHANALAI, C., BARCUS, M. J., MUTH, S., SUTAMIHARDJA, A. & WERNSDORFER, W. H. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg*, 77, 119-27.
- WURTZ, N., FALL, B., BUI, K., PASCUAL, A., FALL, M., CAMARA, C., DIATTA, B., FALL, K. B., MBAYE, P. S., DIEME, Y., BERCIÓN, R., WADE, B., BRIOLANT, S. & PRADINES, B. 2013. Pfhrp2 and pfhrp3 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar J*, 12, 34.
- MASHIMA, R., TILLEY, L., SIOMOS, M. A., PAPALEXIS, V., RAFTERY, M. J. & STOCKER, R. 2002. Plasmodium falciparum histidine-rich protein-2 (PfHRP2) modulates the redox activity of ferri-protoporphyrin IX (FePPiX): peroxidase-like activity of the PfHRP2-FePPiX complex. *J Biol Chem*, 277, 14514-20.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Innere Medizin VII- Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin, Humanparasitologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Andrea Kreidenweiss durchgeführt.

Die Konzeption der Studie und wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch Dr. Andrea Kreidenweiss.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Lilith Berner, Erik Köhne, Dr. Andrea Kreidenweiss, Albert Lalremruata, The Nguyen, Dr. Thaisa Sandri und Claudia Strecke von mir eigenständig durchgeführt. Miriam Rodi unterstützte mich bei der Ausführung einiger Versuche. Die Erstellung der Parasitenverdünnungsreihe erfolgte gemeinsam mit Annette Knoblich, Albert Lalremruata und The Nguyen. Die Primer und Sonden für *pfhrp2* und *pfhrp3* wurden von Dr. Andrea Kreidenweiss und Albert Lalremruata designt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Meine Arbeiten werden Teil einer Publikation sein, die zurzeit von Dr. Andrea Kreidenweiss und Ko-Autoren erstellt wird.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Andrea Kreidenweiss verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen, Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 06.03.2019

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

KREIDENWEISS, A., TRAUNER, F., RODI, M., KOEHNE, E., HELD, J., WYNDORPS, L., MANOUANA, G. P., MCCALL, M., ADEGNIKA, A. A., LALREMRUATA, A., KREMSNER, P. G., FENDEL, R. & SANDRI, T. L. 2019. Monitoring the threatened utility of malaria rapid diagnostic tests by novel high-throughput detection of *Plasmodium falciparum* hrp2 and hrp3 deletions: A cross-sectional, diagnostic accuracy study. *EBioMedicine*, 50, 14-22.

9 Anhang

8.1 Einzelergebnisse der Standarderstellung für Singleplexreaktionen für *pfhrp2*, *pfhrp3*, *pf β-tubulin* und *pf cytochrom b*

Tabelle 63: Einzelergebnisse der Standarderstellung für Singleplexreaktionen für <i>pfhrp2</i> (HEX), <i>pfhrp3</i> (FAM), <i>pf β-tubulin</i> (Cy5) und <i>pf cytochrom b</i> (ROX). Jede Parasitenkonzentration in Triplikaten.									
P/ml	HEX-Kanal		FAM-Kanal		Cy5-Kanal		ROX-Kanal		
	Cq-Wert	optische Bewertung							
600000	1	26,9	+	26,9	+	24,54	+	22,86	+
	2	27,06	+	27,04	+	24,73	+	23,08	+
	3	27,07	+	26,94	+	24,58	+	22,98	+
20400	1	28,6	+	28,65	+	26	+	24,65	+
	2	28,66	+	28,58	+	26,15	+	24,71	+
	3	28,64	+	28,66	+	25,97	+	24,72	+
60000	1	30,52	+	30,5	+	27,86	+	26,87	+
	2	30,51	+	30,3	+	27,95	+	26,87	+
	3	30,47	+	30,46	+	27,78	+	26,7	+
20400	1	31,81	+	32,09	+	29,81	+	28,69	+
	2	32,38	+	31,92	+	29,69	+	28,61	+

	3	32,31	+	32,26	+	29,83	+	28,72	+
6000	1	34,46	+	34,29	+	31,43	+	30,8	+
	2	33,87	+	33,45	+	31,63	+	30,74	+
	3	35	+	33,91	+	31,41	+	30,66	+
2040	1	35	+	35	+	32,23	+	32,29	+
	2	35	+	35	+	32,72	+	32,13	+
	3	35	+	35	+	33,03	+	32,42	+
600	1	35	+	35	+	35	+	35	+
	2	35	+	35	+	34,55	+	34,59	+
	3	35	+	35	+	35	+	34,1	+
204	1	35	+	35	+	-		35	+
	2			35	+	35	+	35	+
	3	35	+	35	+	35	+	35	+
60	1							35	+
	2							35	+
	3	35	+	35	+	35	+	35	+
20	1							35	(+)
	2			35	+			35	(+)
	3	35	+			35	+	35	(+)
	1								

6	2 3				
2	1 2 3				
3	1 2 3				
1	1 2 3				
LOD (P/ml):		204	205	206	60

Positivkontrolle (3D7) waren alle drei in allen vier Kanälen positiv.

Negativkontrollen (Wasser, Medium, Vollblut) waren alle in allen vier Kanälen negativ.

8.2 Ergebnisse der Standarderstellung für 4plex-Reaktionen für *pfhrp2*, *pfhrp3*, *pf β-tubulin* und *pf cytochrom b*

Tabelle 64: Einzelergebnisse der Standarderstellung für 4plex-Reaktionen im HEX-Kanal. Vier unabhängige Durchgänge (Nr. 1- 4). Jede Parasitenkonzentration in Triplikaten. LoD= Limit of Detection

P/ml		Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4	
		Cq-Wert	optische Bewertung						
600000	1	22,28	+	22,55	+	22,58	+	22,81	+
	2	22,6	+	22,72	+	22,62	+	22,72	+
	3	22,71	+	22,76	+	22,8	+	22,85	+
204000	1	23,98	+	24,15	+	24,16	+	24,27	+
	2	24,04	+	24,18	+	24,3	+	24,45	+
	3	24,02	+	24,12	+	24,29	+	25,18	+
60000	1	25,93	+	25,96	+	26,05	+	26,23	+
	2	25,94	+	25,94	+	26,07	+	26,18	+
	3	25,86	+	25,91	+	26,05	+		-
20400	1	27,39	+	27,77	+	27,84	+	27,95	+
	2	27,77	+	27,77	+	27,94	+	27,91	+
	3	27,63	+	27,72	+	28,01	+	28,23	+
6000	1	29,5	+	29,88	+	29,62	+	29,88	+
	2	29,19	+	29,69	+	29,41	+	30	+
	3	29,4	+	29,52	+	29,75	+	31,54	+
2040	1	30,65	+	30,52	+	30,69	+	33,5	+
	2	30,25	+	31,03	+	31,47	+		-
	3	31,1	+	30,85	+	30,75	+	31,55	+
	1	32,04	+	33,14	+	33,06	+	33,54	+

600	2	32,12	+	32,61	+	34	+	33,09	+
	3	31,49	+	34,54	+	32,89	+	34,01	+
204	1	33,48	+	35	+	35	+	35	+
	2	34,05	+	35	+	35	+	35	+
	3	35	+	33,74	+	33,16	+		-
60	1	30,52	-		-		-	34,09	+
	2		-		-		-		-
	3	35	+		-		-		-
20	1	35	+	35	+		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-	35	+		-		-
6	1		-		-		-		-
	2	35	+		-		-		-
	3		-		-		-		-
2	1		-		-	31,78	-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
3	1	31,01	-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
1	1	35	+		-		-		-
	2	30,34	-	35	-		-		-
	3		-		-		-		-
LOD (P /ml):		204		20		204		204	

Tabelle 65: Einzelergebnisse der Standarderstellung für 4plex-Reaktionen im FAM-Kanal. Vier unabhängige Durchgänge (Nr. 1- 4). Jede Parasitenkonzentration in Triplikaten. LoD= Limit of Detection

		Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4	
P/ml		Cq-Wert	optische Bewertung						
600000	1	24,6	+	24,62	+	24,5	+	24,66	+
	2	24,9	+	24,81	+	24,58	+	24,81	+
	3	25,09	+	24,86	+	24,77	+	24,83	+
204000	1	26,27	+	26,36	+	26,16	+	26,31	+
	2	26,38	+	26,29	+	26,19	+	26,39	+
	3	26,37	+	26,39	+	26,38	+	27,33	+
60000	1	28,23	+	28,13	+	28	+	28,07	+
	2	28,21	+	28,13	+	28,16	+	28,19	+
	3	28,16	+	28,19	+	28,08	+		-
20400	1	30,07	+	29,73	+	29,74	+	30,09	+
	2	30,04	+	30,08	+	30,03	+	29,6	+
	3	30,17	+	29,95	+	29,68	+	29,94	+
6000	1	31,46	+	31,32	+	31,2	+	31,42	+
	2	31,76	+	31,54	+	31,06	+	31,09	+
	3	31,71	+	31,62	+	31,47	+	32,52	+
2040	1	33,03	+	32,11	+	32,92	+	35	+
	2	32,81	+	32,24	+	33,3	+		-
	3	33,11	+	33,77	+	32,84	+	32,61	+
600	1	35	+	35	+	35	+	34,48	+
	2	35	+	35	+	35	+	35	+

	3	33,7	+	35	+	34,47	+	35	+
204	1	35	+	35	+	35	+	35	+
	2	35	+	35	+	35	+		+
	3	35	+	35	+	35	+		-
60	1		-	35	+		-	35	+
	2		-		-	35	+		-
	3		-	35	+		-		-
20	1		-	35	+		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-	35	+		-
6	1		-		-		-		-
	2	29,93	-		-		-		-
	3		-		-		-		-
2	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
3	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
1	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
LOD (P/ml):		204		60		204		204	

Tabelle 66: Einzelergebnisse der Standarderstellung für 4plex-Reaktionen im Cy5-Kanal. Vier unabhängige Durchgänge (Nr. 1- 4). Jede Parasitenkonzentration in Triplikaten. LoD= Limit of Detection

		Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4	
P/ml		Cq-Wert	optische Bewertung						
600000	1	24,99	+	25,05	+	24,97	+	25,04	+
	2	25,29	+	25,23	+	25,13	+	25,17	+
	3	25,46	+	25,48	+	25,17	+	25,25	+
204000	1	26,64	+	26,75	+	26,6	+	26,63	+
	2	26,77	+	26,7	+	26,66	+	26,78	+
	3	26,68	+	26,73	+	26,79	+	27,66	+
60000	1	28,67	+	28,61	+	28,33	+	28,76	+
	2	28,59	+	28,49	+	28,74	+	28,65	+
	3	28,68	+	28,32	+	28,71	+		-
20400	1	30,09	+	30,06	+	30,24	+	30,57	+
	2	30,19	+	30,67	+	30,26	+	30,05	+
	3	30,09	+	30,56	+	30,16	+	30,48	+
6000	1	31,74	+	31,72	+	31,56	+		+
	2	31,91	+	31,85	+	31,77	+	31,78	+
	3	31,9	+	31,97	+	31,83	+	33,15	+
2040	1	32,99	+	32,69	+	33,06	+		+
	2	32,96	+	33,67	+	33,53	+		-
	3	33,6	+	33,08	+	33,32	+	35	+
600	1	35	+	35	+	35	+	35	+
	2	35	+		+	35	-	35	+

	3	34,21	+		+	35	+	35	+
204	1		-	34,9	+		-		+
	2		+	35	+		+		-
	3		+		+	35	+		-
60	1		-		-		-		
	2		-		-	35	+		-
	3	35	+		-	35	+		-
20	1		+		-		+		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-	35	+		-
6	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
2	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
3	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
1	1		-		-		-		-
	2		-		-		-		-
	3		-		-		-		-
LOD (P/ml):		204		204		20		600	

Tabelle 67: Einzelergebnisse der Standarderstellung für 4plex-Reaktionen im ROX-Kanal. Vier unabhängige Durchgänge (Nr. 1- 4). Jede Parasitenkonzentration in Triplikaten. LoD= Limit of Detection

		Nr.1		Nr.2		Nr.3		Nr.4	
P/ml		Cq-Wert	optische Bewertung						
600000	1	20,2	+	20,49	+	20,45	+	20,65	+
	2	20,66	+	20,67	+	20,57	+	20,65	+
	3	20,7	+	20,71	+	20,76	+	20,76	+
204000	1	22,07	+	22,14	+	22,08	+	22,23	+
	2	22,16	+	22,17	+	22,21	+	22,26	+
	3	22,08	+	22,13	+	22,27	+	23,24	+
60000	1	24,03	+	24,11	+	23,92	+	24,23	+
	2	23,99	+	24,08	+	24,13	+	24,21	+
	3	23,91	+	23,97	+	24,08	+		-
20400	1	25,7	+	25,89	+	25,9	+	26,05	+
	2	25,91	+	25,97	+	26,09	+	25,93	+
	3	25,79	+	25,88	+	25,99	+	26,24	+
6000	1	27,63	+	27,57	+	27,62	+	27,77	+
	2	27,83	+	27,77	+	27,67	+	27,69	+
	3	27,69	+	27,71	+	27,76	+	29,33	+
2040	1	29,22	+	29,31	+	29,11	+	31,45	+
	2	28,9	+	29,33	+	29,13	+		-
	3	29,19	+	29,29	+	29,09	+	29,65	+
600	1	30,65	+	31,48	+	30,93	+	30,86	+
	2	30,96	+	30,83	+	30,8	+	31,1	+

	3	30,88	+	31,48	+	31,4	+	32,72	+
204	1	31,72	+	32,79	+	32,38	+	32,91	+
	2	32,15	+	32,32	+	32,97	+	33,26	+
	3	32,63	+	32,26	+	32,08	+		-
60	1	33,45	+	35	+	33,99	+	34,56	+
	2	34,29	+	35	+	35	+	35	+
	3	35	+	35	+	33,75	+	35	+
20	1	35	+	35	+	35	+		-
	2	35	+	35	+	35	+	35	+
	3			35	+	35	+		-
6	1		-				-		-
	2		-				-		-
	3		-	35	+		-		-
2	1		-				-		-
	2		-				-		-
	3		-				-		-
3	1		-				-		-
	2		-				-		-
	3		-				-		-
1	1		-				-	35	+
	2		-				-		-
	3		-				-		-
LOD (P/ml):		20		20		20		60	

Positivkontrolle (3D7): Alle drei der Triplikate waren in allen vier Kanälen positiv.

Negativkontrollen (Wasser, Medium, Vollblut): Alle drei der Triplikate waren in allen vier Kanälen negativ.

Danksagung

Dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen, insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. P. Kremsner, danke ich herzlich für die Möglichkeit der Promotion.

Herausheben möchte ich meine Betreuerin Frau Dr. Andrea Kreidenweiss, die mich immerzu forderte und förderte. Vielen Dank für all dein geteiltes Wissen und deine Unterstützung!

Ein herzliches Dankeschön den Mitarbeitenden des Instituts für Tropenmedizin für das freundliche Miteinander und jede Unterstützung. Besonders seien dabei Dr. Thaisa Sandri und Miriam Rodi bedacht.

Zuletzt bedanke ich mich zutiefst bei meiner Familie und Sergej für all ihre Unterstützung. Es ist wundervoll euch immer an meiner Seite zu wissen.