

**Vergleich von 4 verschiedenen PCR-Methoden zum Nachweis von
Trypanosoma cruzi im Blut hinsichtlich Sensitivität und Spezifität
mit diagnostischer Evaluierung in einem Endemiegebiet**

Jan Gordian Hubert

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. T. Löscher

an der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Vergleich von 4 verschiedenen PCR-Methoden zum Nachweis von
Trypanosoma cruzi im Blut hinsichtlich Sensitivität und Spezifität
mit diagnostischer Evaluierung in einem Endemiegebiet**

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

vorgelegt von
Jan Gordian Hubert
aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Löscher
Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Haas
Mitbetreuung: PD Dr. Dr. H. Rinder
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

I	EINLEITUNG	6
II	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	10
III	MATERIAL UND METHODEN	12
1.	Material.....	12
1.1	Geräte	12
1.2	Röhrchen	12
1.3	Chemikalien	12
1.4	Enzyme.....	13
1.5	Gel.....	13
1.6	Nukleotide.....	13
1.7	Parasiten-Stämme.....	13
1.8	Filme	14
1.9	Serologie	14
2.	Methoden	14
2.1	Parasitengewinnung	14
2.2	DNA-Isolierung.....	14
2.3	PCR (Polymerasekettenreaktion) und „nested“ PCR	15
2.4	Darstellung und Dokumentation der Ergebnisse	17
2.5	Serologische Testverfahren	17
2.6	Blutproben von Einwohnern eines Endemiegebietes und Kontrollen	18
IV	ERGEBNISSE	20
1.	PCR-Optimierung.....	20
1.1	Annealingtemperatur.....	21
1.2	Magnesiumkonzentration	21
2.	Sensitivität.....	23
2.1	Verdünnungsreihen von <i>Trypanosoma cruzi</i> in PBS	23
2.2	Verdünnungsreihen von <i>Trypanosoma cruzi</i> in EDTA-Blut und Serum	25
3.	Spezifität	28
4.	Vergleich zweier Isolationsmethoden mit und ohne Zusatz von Guanidinhydrochlorid.....	33
5.	Validierung	35
5.1	Blutproben aus einem endemischen Gebiet	35
5.2	Blutproben aus einem nicht-endemischen Gebiet	41
V	DISKUSSION	42
1.	Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen.....	42
1.1	Primerauswahl.....	42
1.2	PCR-Methode.....	43
1.3	Optimierung	43
1.4	Probenvorbereitung	44
1.5	Vergleich zweier Isolationsmethoden mit und ohne Zusatz von Guanidinhydrochlorid.....	45
1.6	Validierung.....	45
2.	Vergleich mit anderen Untersuchungen:	47
2.1	PCR-Protokolle	47

3. Schlussfolgerungen.....	49
VI ZUSAMMENFASSUNG	50
VII LITERATURVERZEICHNIS	52
ANNEX.....	56
CURRICULUM VITAE.....	61

I EINLEITUNG

Epidemiologie

Die amerikanische Trypanosomiasis (Chagas-Krankheit) ist eine von Carlos Chagas 1909 erstmals beschriebene Zoonose, die ausschließlich in Mittel- und Südamerika vorkommt. Der Erreger ist *Trypanosoma cruzi*, Überträger sind blutsaugende Raubwanzen. Man schätzt die Zahl infizierter Personen auf etwa 16-18 Millionen. Betroffen ist vor allem die ländliche und arme Bevölkerung. Mit Palmblättern bedeckte Häuser sowie unverputzte Mauern bieten einen hervorragenden Lebensraum für den Vektor. Die Häufigkeit des Vorkommens ist regional unterschiedlich, wobei Bolivien als eines der Hauptendemiegebiete eine besondere Bedeutung zukommt (Abb. 1) mit Seroprävalenzen von regional bis über 30% (WHO 1991). In den Anden oberhalb von 3000 Metern über dem Meeresspiegel sowie im Amazonas-Urwald kommt die Krankheit nicht vor, da die Wanze unter diesen Bedingungen nicht leben kann.



Abb. 1: Geographische Verteilung von *Trypanosoma cruzi* Infektionen in Mittel- und Südamerika (WHO 1991)

Parasitologie und Vermehrungszyklus

Der Erreger *Trypanosoma cruzi* ist ein Protozoon der Ordnung Kinetoplastidae, Familie Trypanosomatidae (Stercoraria). Er gelangt über angesaugtes Blut in den Vektor und vermehrt sich dort im Gastrointestinaltrakt. Überträger (Vektor) sind blutsaugende Raubwanzen (Triatomen) der Familie Reduviidae, Unterfamilie Triatominae. Die häufigsten Vertreter sind *Triatoma infestans* und *Rhodnius prolixus*. Die Wanzen stechen bevorzugt nachts. Während des Saugaktes, der etwa 20-30 Minuten dauert, setzt die Wanze Kot ab. Die darin befindlichen Trypanosomen gelangen durch Inokulation (Einreiben) in die Einstichstelle oder über Schleimhäute (z.B. Konjunktiven) ins Gewebe. Als trypomastigote, d.h. begeißelte Form dringen sie in menschliche Gewebszellen ein und vermehren sich intrazellulär als amastigote, d.h. unbegeißelte Form durch Zweiteilung. Nach Freisetzung aus der Wirtszelle können sich die Erreger wieder in trypomastigote Formen umwandeln, die über die Blutbahn im Körper verteilt werden. In dieser Phase können durch einen erneuten Stich einer Raubwanze Trypanosomen wieder in ihren Vektor gelangen. Die Parasiten persistieren intrazellulär bevorzugt in Muskel- und Nervenzellen. Besonders häufig ist der Herzmuskel betroffen, wobei es dann zu einer Myokarditis kommen kann. Aber auch quergestreifte sowie glatte Muskulatur, z.B. im Magen-Darm-Trakt, werden befallen. (Sauerteig et al. 2000)

Übertragung

Es gibt drei Wege über die der Erreger übertragen werden kann. Der häufigste ist der über den Vektor. Ein weiterer Infektionsweg ist die kongenitale Übertragung. Hat eine Frau während der Schwangerschaft eine nachweisbare Parasitämie, so liegt das Risiko, dass der Fötus infiziert wird bei 2-5% (Sauerteig et al. 2000). Ein weiterer, zunehmend wichtiger Übertragungsweg ist die Bluttransfusion.

Klinik

Stunden bis Tage nach der Infektion kann sich an der kutanen Inokulationsstelle ein entzündliches Infiltrat, ein so genanntes Chagom bilden. Gelangen die im Wanzenkot befindlichen Trypanosomen über eine Kontamination der Hände und anschließendes „Reiben der Augen“ in die Konjunktiven, führt dies zu einer meist einseitigen Konjunktivitis mit Ödem des Augenlides und Schwellung der periaurikulären Lymphknoten. Eine solche Symptomentrias nennt man Romana-Zeichen. Derartige Primäraffekte an der Eintrittsstelle sind jedoch bei vielen Infizierten nicht Erinnerungswürdig. Bei diaplazentarer oder Transfusionsbedingter Transmission fehlt naturgemäß ein Primäraffekt.

Der weitere klinische Verlauf kann in drei Stadien unterteilt werden:

1. Nach etwa 2-4 Wochen setzt die **akute Phase** der Erkrankung ein. Sie ist gekennzeichnet durch unspezifische Entzündungszeichen wie Fieber, Lymphknotenschwellung und Hepatosplenomegalie. Als Komplikation kann es vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern zu einer akuten Myokarditis und Enzephalitis kommen. Klinische Symptome können aber auch gänzlich fehlen.
2. Es schließt sich die **intermediäre Phase** an (Latenz). Sie ist in aller Regel symptomlos. Die serologische Diagnostik bleibt während dieser Phase positiv.

3. Bei etwa einem Drittel aller Infizierten geht die Latenzphase in die **chronische Phase** der Krankheit über. Durch eine chronische Myokarditis kommt es zu einer chronisch progredienten, dilatativen Kardiomyopathie mit Gefügedilatation, Herzvergrößerung und Aneurysmabildung. Dies kann zu Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen (besonders zu Schenkelblöcken und Extrasystolen) führen. Todesfälle treten in Folge der terminalen Herzinsuffizienz oder akut als Folge schwerwiegender ventrikulärer Rhythmusstörungen oder einer Aneurysma-Ruptur auf. Die langsame Zerstörung des parasympathischen Nervenplexus in der Verdauungstraktmuskulatur bedingt Störungen der gastrointestinalen Motorik. So entstehen besonders im Ösophagus und im Colon Megaorgane (Megaösophagus, Megacolon).

Diagnose

Für die Diagnostik der Erkrankung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Der direkte Erregernachweis ist möglich durch mikroskopische Diagnostik, Xenodiagnose oder Hämokultur. Von besonderer Bedeutung, vor allem in den chronischen Stadien der Erkrankung, ist die Immundiagnostik. Neuerdings ist auch der Nachweis von Nukleinsäureabschnitten des Erregers mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) möglich.

Die Mikroskopie kann als „goldener Standard“ angesehen werden, ist allerdings nur in der akuten Phase verlässlich, da nur hier eine ausreichend hohe Parasitämie vorhanden ist. Im chronischen Stadium ist die Parasitämie trotz verschiedener Anreicherungsverfahren wie der Buffy coat-Mikroskopie (Untersuchung der Grenzschicht zwischen Plasma und Erythrozyten nach der Zentrifugation in einer Mikrokapillare), der Silicon-Methode nach Rohwedder, der Dreifachzentrifugation nach Martin-Leboeuf-Roubaud (Anreicherung der Parasiten im Serum) meist zu gering, um sie mit dem Mikroskop nachweisen zu können. Die Hämokultur ist eine langwierige und nicht sehr sensitive Methode. Die Xenodiagnose zeigt in bis zu 50% der Fälle positive Resultate im chronischen Stadium, ist jedoch ein lang dauerndes und bei Patienten unbeliebtes Verfahren. Es werden 30-40 Nymphen von trypanosomenfreien Raubwanzen mit einem Kästchen an den Arm des Patienten fixiert, so dass die Wanzen ihre Blutmahlzeit einnehmen können. Nach 1-3 Monaten wird der Darm oder der Kot der Wanzen hinsichtlich einer Infektion mit *Trypanosoma cruzi* untersucht. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn für den Nachweis regionaler *T. cruzi*-Stämme die ebenfalls regional vorherrschenden Raubwanzen-Arten verwendet werden. Zusammengefasst ist die Xenodiagnose zwar eine äußerst spezifische Methode, jedoch besonders im chronischen Stadium nicht genügend sensitiv und zudem relativ aufwändig.

Bei den serologischen Untersuchungen haben sich vor allem der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und der Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) durchgesetzt; unter Feldbedingungen auch die Agglutinations-Teste (direkte Agglutination, indirekter Hämagglutinations-Test). Besonders der ELISA und der IFAT haben eine sehr hohe Sensitivität. Ist ein Patient einmal mit *Trypanosoma cruzi* infiziert, so bleiben die Antikörper meist lebenslang nachweisbar. Daraus ergeben sich zwei Probleme: Erstens kann das Stadium der Erkrankung anhand der serologischen Parameter nicht definiert werden und zweitens der Erfolg einer Therapie nicht sicher beurteilt werden. Ein weiteres Problem stellt die Spezifität dar. So sind Kreuzreaktionen mit Leishmanien und mit apathogenen Trypanosomen (*Trypanosoma rangeli*) beobachtet worden (Vexenet et al. 1996, Chiaramonte et al. 1999). Vor kurzem wurde schließlich auch über seronegative Einzelfälle chronischer Infektionen berichtet (Salomone et al. 2003).

Die PCR detektiert sehr sensitiv die DNA der Parasiten und ist damit besonders für das chronische Stadium eine attraktive diagnostische Methode. Die verschiedenen PCR-Protokolle, die bislang beschrieben wurden, sind aber noch nicht genügend etabliert, um als goldener Standard für die Diagnostik gelten zu können.

Therapie

Es stehen zwei Medikamente zur Behandlung der Chagaserkrankung zur Verfügung: Nifurtimox und Benznidazol. Diese Medikamente sind vor allem in der akuten Phase wirksam, da sie direkt toxisch auf die Parasiten wirken. Beide Medikamente müssen allerdings über einen längeren Zeitraum gegeben werden (2-3 Monate) und verursachen bei einem wesentlichen Teil der Patienten Nebenwirkungen. In der chronischen Phase konnte die Wirksamkeit nur bedingt nachgewiesen werden. Dies wird u.a. dadurch erklärt, dass Entzündungsvorgänge und Zerstörung der Zellen im chronischen Stadium wohl weniger direkt durch die Parasiten erfolgen, sondern vor allem auf einer durch parasitäre Antigene getriggerten Autoimmunreaktion zu beruhen scheinen (Sauerteig et al. 2000).

II PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Diagnostik der Chagaserkrankung mit den bislang verfügbaren Methoden bereitet im chronischen Stadium erhebliche Probleme:

In den chronischen Latenz- und Erkrankungsstadien liegt eine extrem niedrige Parasitämie vor. Der mikroskopische Parasitennachweis hat außer in der akuten Phase kaum eine Bedeutung für die Diagnostik. Auch unter Anwendung aller verfügbaren Anreicherungsverfahren ist die Parasitämie in der Regel zu gering um mit dem Mikroskop erkannt werden zu können. Selbst die Kulturmethode und die aufwändige Xenodiagnose (Nachweis aus am Patienten angesetzten Vektoren) haben eine unbefriedigende Sensitivität in der chronischen Phase.

Die Immunantwort bleibt meist lebenslang positiv, auch bei Menschen bei denen die Infektion spontan oder nach Chemotherapie ausgeheilt ist. Zudem gibt es falsch-positive Ergebnisse auf Grund unspezifischer Reaktionen in einigen Testverfahren und auf Grund von Kreuzreaktionen mit Leishmanien und anderen, apathogenen Trypanosomen, wie z. B. *Trypanosoma rangeli* (Vexenet et al. 1996, Chiaramonte et al. 1999).

Der sichere Nachweis einer Infektion ist jedoch aus mehreren Gründen wichtig:

1. Durch eine spezifische antiparasitäre Therapie im Latenz- bzw. Intermediärstadium kann die Manifestation der meist intractablen Spätstadien verhindert oder zumindest wesentlich reduziert werden. In Anbetracht der Dauer, der Nebenwirkungen und der Kosten der Therapie ist die Indikation zur Therapie aller seropositiven Personen jedoch umstritten. Zudem würde hiermit auch ein wesentlicher Anteil von Personen behandelt, bei denen die Infektion spontan ausgeheilt ist. Schließlich wäre eine zuverlässige Therapiekontrolle sowie eine bessere Identifikation der nach Therapie oder Spontanheilung möglichen Reinfektion wünschenswert.
2. Schwangere Frauen übertragen, wenn eine Parasitämie vorliegt in 2-5% der Fälle die Infektion auf den Fötus. Besonders wenn die Schwangere im intermediären oder chronischen Stadium ist, scheint das Risiko einer vertikalen Infektion hoch zu sein (Bittencourt 2000). Die Letalität des akuten Stadiums bei Säuglingen kann bis zu 10% betragen (Sauerteig et al. 2000). Es gilt also in jedem Fall eine Parasitämie bei Schwangeren bzw. (besser noch) bei allen Frauen mit Kinderwunsch frühzeitig zu erkennen.
3. Die Bluttransfusion ist ein dritter wichtiger Übertragungsweg. Auch hier kann die Serologie nicht klären, ob eine Blutkonserve tatsächlich infektiös ist. Derzeit wird daher empfohlen alle seropositiven Menschen lebenslang von einer Blutspende auszuschließen. In Regionen hoher Seroprävalenz kommt hierdurch ein erheblicher Anteil der Bevölkerung als Blutspender nicht in Frage.

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein vielversprechendes diagnostisches Verfahren, das insbesondere bei der Diagnostik einiger viraler Infektionen schon routinemäßig eingesetzt wird. Es weist den Erreger nach indem es spezifische Nukleinsäureabschnitte amplifiziert.

Die Einführung dieser Methode scheint im chronischen Stadium der Chagaserkrankung sinnvoll, da es bisher keine Methode gibt, die eine Parasitämie direkt und sehr sensitiv bestimmen kann. Selbst im akuten Stadium, in dem die Mikroskopie der „goldene Standard“ ist, konnte die Parasitämie um durchschnittlich 3,9 Tage früher mit der PCR erkannt werden, als mit Anreicherungsverfahren und direktem mikroskopischem Nachweis (Kirchhoff et al. 1996).

In den letzten Jahren wurden eine Reihe verschiedener PCR-Protokolle für *Trypanosoma cruzi* beschrieben, die unterschiedliche Nukleinsäureabschnitte der Kern-DNA, der Kinetoplasten-DNA oder der RNA amplifizieren und nachweisen. Mehrere dieser PCR-Methoden wurden bereits mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen in der Diagnostik (Russomando et al. 1992, Wincker et al. 1994, Kirchhoff et al. 1996, Silber et al. 1997, Russomando et al. 1998, Ribero-dos-Santos et al. 1999) und bei der Therapiekontrolle (Solari et al. 2001, Virreira et al. 2003) bei zahlenmäßig noch sehr begrenzten Patientenkollektiven eingesetzt. Zudem wurden unterschiedliche Methoden zur Stabilisierung und Verarbeitung von Proben publiziert einschließlich solcher unter einfachen Feldbedingungen, wie sie in den Hauptverbreitungsgebieten vorherrschen.

Ziel dieser Arbeit war es die wichtigsten dieser PCR-Methoden unter experimentellen Bedingungen zu vergleichen und eine Methode zu identifizieren, die eine hohe Sensitivität und eine hohe Spezifität aufweist und robust funktioniert.

Anschließend sollte eine Validierung mit Proben aus einem Endemiegebiet erfolgen. Ein weiteres Ziel war dabei, Methoden der Nukleinsäuren-Isolierung und -Konservierung unter Feldbedingungen zu untersuchen und zu optimieren.

III MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte

Pipetten:	Gilson, France
Brutschrank:	Heraeus
Heizplatte:	IKA-COMBIMAG RCT Janke & Kunkel Staufen i.B., Deutschland
Tischzentrifuge:	Biofuge 13, Heraeus,
Schüttler:	Vortex, Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
PCR-Gerät:	Biometra, UNO II Thermoblock, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresegerät:	GIBCO BRL
Gelelektrophoresekammer:	BIOplex Strehlau & Kruse, Freiburg, Deutschland
UV-Leuchttisch:	Bachhofer, Reutlingen
Fotodokumentation	Polaroid MP4 System

1.2 Röhrchen

EDTA-Monovetten:	9ml EDTA-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen:	Nalgene

1.3 Chemikalien

Nährmedium <i>Trypanosoma cruzi</i> und Leishmanien:	M199 (Morgan 50) Hepes, L-Glutamin, NaHCO ₃ , FCS 10%, 1% Penicillin- Streptomycin
Nährmedium <i>Trypanosoma rangeli</i> :	ATCC Culture Medium 1029 LITmedium
Guanidinhydrochlorid:	6M, Sigma-Aldrich Chemie, Schnelldorf
QIAGEN DNA Blood Mini Kit: (Proteinase K, AL-Puffer, AW1, AW2, AE-Puffer)	QIAGEN, Hilden
Ethanol:	99,6 Gew.% DAB 9, Roth, Karlsruhe
PBS:	Phosphatic buffer solution pH 7,2
Magnesium:	25mM Mg ²⁺ Cl, Amersham, Biosciences
Mineralöl:	Sigma, Deisenhofen

10x Puffer: 500mM KCl, 15 mM MgCl, 100mM Tris-HCl, Amersham, Biosciences
 Agarosepuffer: 1% SDS, 0.25% Bromphenolblau, 15% Ficoll 400, 0.1M EDTA

1.4 Enzyme

Taq-Polymerase: 5 units/μl Amersham Biosciences, Freiburg
 Proteinase K: QIAGEN, Hilden
 Protease: QIAGEN, Hilden

1.5 Gel

Agarose: „molecular biology grade“ Appligene, Illkirch, France
 TAE: 40 mM Tris-Acetat (pH: 8.0), 1mM EDTA
 1% Ethidium bromid-Lösung: Sigma, Deisenhofen

1.6 Nukleotide

DNS-Leiter:
 dNTP (dTTP, dATP, dCTG, dGTP, je 100 mM): Amersham, Biosciences, Freiburg
 Primer: Interactiva Biotechnologies, Ulm; MWG Biotech AG

TCZ1: 5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3'
 TCZ2: 5'-CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG-3'
 121: 5'-AAA TAA TGT ACG GGC GAG ATG CAT GA-3'
 122: 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'
 89: 5'-GGG AGG TGG GGT TCG ATT GGG GTT GG-3'
 90: 5'-GGG AGG TGG GGG TTC GAT TGG GGT TGG-3'
 91: 5'-GSC CCM AAA KTT GAA CGC CCC TCC C-3'
 BP1: 5'-ATG GGT GCT TGT GGG TCG AAG-3'
 BP2: 5'-TCA AGC CTT CTC CGG CAC GTT-3'

1.7 Parasiten-Stämme

Trypanosoma cruzi: eigener Laborstamm (Isolat Bolivien M 383-C)
Trypanosoma rangeli: ATCC-α+17 und ATCC-Q1140
Trypanosoma brucei brucei: eigener Laborstamm (Isolat Tanzania p11-3)
Leishmania major: MHOM/IL/67/JERICHO II (1985)
Leishmania tropica: MHOM/IL/96/MRT-96
Leishmania donovani infantum: MHOM/FR/96/HNI-96
Leishmania chagasi: MHOM/BR/75/M2903
Leishmania braziliensis: MHOM/BR/75/M2903 (1985)
Leishmania mexicana: MNYC/BZ/62/M379 (1986)

1.8 Filme

Sofortbild: Polaroid Typ „667“ Vertrieb Sigma

1.9 Serologie

96-Loch-Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Medco
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop Zeiss, Jena

2. Methoden

2.1 Parasitengewinnung

Epimastigote Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* wurden zur Aufbewahrung in Stickstoff bei -170°C in 10% DMSO tiefgefroren. Zur Anzucht wurden sie rasch bei 37°C aufgetaut, mit 5 ml M199-Nährmedium (nach Morgan 50) versetzt und sofort in 25 cm² NUNC-Kulturflaschen bei 28°C im Brutschrank kultiviert. Während der logarithmischen Vermehrungsphase wurden die Kulturen mehrmals geteilt, in 5 ml frisches Nährmedium gegeben und weiter bebrütet. Nach ausreichender Vermehrung wurden die Kulturen drei mal mit PBS gewaschen, für 10 min. bei $1880 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden sie in der Neubauer-Kammer ausgezählt, aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren.

2.2 DNA-Isolierung

Die gereinigte DNA von *Trypanosoma cruzi* und der anderen in dieser Arbeit verwendeten Parasiten (Leishmanien, *Trypanosoma brucei*, etc.), wurde aus Blutproben und Kulturen mittels des „QIAGEN DNA Blood Mini Kit“ gewonnen.

2.2.1 DNA-Extraktion

Die Methode erfolgte nach dem „Blood Spin Protocol“ des Herstellers.

1. Vermengung von 200 µl Blutprobe oder Kultursuspension mit 20 µl Proteinase K (zerstört die Proteine der Zellwand und die Enzyme des Parasiten) und AL-Puffer. Der Puffer schafft günstige Voraussetzungen für die Proteinase und verhindert die Retention störender Proteine in der Filtermembran (s.u.)
2. Inkubation bei 56°C für 10 min. erhöht die Aktivität der Proteinase
3. 200 µl Ethanol hinzufügen.
4. Die Lösung auf eine Filtersäule geben und bei $6000 \times g$ für 1 min. zentrifugieren. Die DNA bindet an die Filtermembran. Das Filtrat kann verworfen werden.
5. Den Filter mit verschiedenen Pufferlösungen zweimal waschen und zentrifugieren (bis 14.000 rpm für 3 min.) um evtl. zurückgehaltene Proteine von der Membran zu lösen.

6. Die am Filter haftende DNA mit AE-Puffer oder destilliertem Wasser mittels Zentrifugation (8000 rpm für 1 min.) lösen.
7. Das Filtrat wird in die PCR eingesetzt.

2.3 PCR (Polymerasekettenreaktion) und „nested“ PCR

Um einen Vergleich verschiedener PCR-Protokolle auf Sensitivität und Spezifität anzustellen, wurden vier schon etablierte PCR-Protokolle verwendet, die DNA-Sequenzen von Kern-DNA und Kinetoplasten-DNA amplifizieren.

2.3.1 PCR-Methoden und Primer (s. 1.6)

1. Die Primerpaare TCZ1 und TCZ2 (Kirchhoff et al. 1996) amplifizieren eine repetitive Sequenz von Kern-DNA mit einer Länge von 188 Basenpaaren (bp) (Moser et al. 1989).
2. Die Primerpaare BP1 und BP2 amplifizieren eine Kern-DNA-Sequenz, die für das Flagellarprotein F29 kodiert (Silber et al. 1997).
3. Die Primerpaare 121 und 122 (Wincker et al. 1994) amplifizieren eine DNA-Sequenz von 330 bp, die konstante und variable Anteile enthält und auf den Minicircles der Kinetoplasten-DNA liegt (Degrave et al. 1988, Sturm et al. 1988,).
4. Die „nested“ PCR mit den Primerpaaren 121+ 89/90 und 91+122 (Ribero-dos-Santos et al. 1999) amplifiziert ebenfalls einen Bereich auf den Minicircles der Kinetoplasten-DNA. Die Primer 121 und 89/90 (diese beiden unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche Base in 90 und werden somit schon gemischt zum Ansatz dazugegeben) amplifizieren eine 330 bp lange DNA-Sequenz. Dieses Amplifikat wird dann in eine zweite PCR mit den Primern 91 und 122 eingesetzt. Diese amplifizieren einen DNA-Abschnitt innerhalb der ersten DNA-Sequenz. Das entstehende Produkt hat eine Länge von 289 bp. Durch diese geschachtelte Methode („nested“) kann die Spezifität und die Sensitivität erhöht werden.

2.3.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte mit einer „hot start“-Technik. Das heißt der Reaktionsansatz wird zunächst ohne Taq-Polymerase, dNTP und Puffer (sog. Mastermix) 2 Minuten lang auf 96° C erhitzt um die DNA-Stränge zu trennen. Erst nach anschließendem Abkühlen auf 85° C wird der „Mastermix“ zugegeben. Dies reduziert sowohl unspezifische Primerhybridisierungen als auch die Denaturierung der Taq-Polymerase.

	TCZ1+TCZ2	BP1+BP2	121+122	121+89/90	91+122
Primer (je 25µM)	1µl	1µl	1µl	1.5µl	1µl
Mg ²⁺ Cl (25mM)	4µl	8µl	10µl	6µl	6µl
Gelatine (0,5%)	1µl	1µl	-	-	-
Aqua dest.	31.5µl	27.5µl	26.5µl	30µl	30.5µl
isolierte DNA	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl (Amplifikat aus dem Ansatz 121+89/90)
„Mastermix“:					
Taq- Polymerase (5 Units/µl)	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
dNTP (je 50mM)	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
10x-Puffer	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl

Tab. 1: Reaktionsansätze der 4 verschiedenen PCR-Protokolle TCZ1+TCZ2, BP1+BP2, 121+122 und der nested PCR (121+89/90 und 91+122) nach der Optimierung.

Es ergibt sich in allen Ansätzen somit ein Volumen von 50 µl. Schon bevor der „Mastermix“ hinzugefügt wird, wird durch 2 Tropfen Mineralöl auf dem Ansatz der Verdunstung der wässrigen Lösung während des PCR-Vorganges vorgebeugt. Dies wird auch durch Aufheizen des Deckels des PCR-Gerätes auf 100° C unterstützt.

Reaktionsablauf:

- | | |
|--|---|
| 1. 96° C für 2 Minuten | Initiale Denaturierung |
| 2. 85° C | Hinzufügen des Mastermix |
| 3. 94° C für 60 Sekunden | Denaturierung |
| 4. T* für 60 Sekunden | Annealingtemperatur: Anlage der Primer an den komplementären DNA-Strang |
| 5. 72° C für 90 Sekunden | Extensionstemperatur: Verdoppelung der DNA-Stränge |
| 6. Die Schritte 3.-5. werden 32 mal wiederholt (Zykluszahl insgesamt:33) | |
| 7. 72° C für 10 Minuten | Letzte, ausreichend lange Elongation |
| 8. 25° C | Die Reaktion ist mit der Abkühlung auf 25° C abgeschlossen |

* Die Annealingtemperaturen der verschiedenen PCR-Protokolle unterscheiden sich wie folgt:

	TCZ1+TCZ2	BP1+BP2	121+122	121+89/90	91+122
T:	55° C	60° C	60° C	64° C	60° C

Maßnahmen zur Sicherstellung der Ergebnistreue:

Die PCR ist eine äußerst sensitive Methode und ist daher sehr anfällig für Kontaminationen durch Fremd-DNA. Zur Überprüfung der Kontaminationsfreiheit wurden daher in jedem

Ansatz mehrere Negativkontrollen (mit destilliertem Wasser oder PBS als DNA-freie Substanz) mitgeführt. Dieser Schritt begann schon bei der DNA-Isolation. Bei der „nested“ PCR, bei der durch das Pipettieren von amplifizierter DNA die Kontaminationsgefahr besonders hoch ist, galt der Durchlauf nur als kontaminationsfrei, wenn nach beiden Durchgängen bei der Negativkontrolle kein Amplifikat entstand.

Zur Überprüfung der einwandfreien Funktion lief bei der Validierung und der Bestimmung von Kreuzreaktionen mit anderen Parasiten eine Positivkontrolle mit. Nur bei Produktbildung der Positivkontrolle galt der Test als verwertbar.

2.4 Darstellung und Dokumentation der Ergebnisse

2.4.1 Gelelektrophorese

Auf Grund der relativ kleinen Amplifikate (188 – 692 bp) wurde ein 2.5%iges Gel gewählt. Dazu wurde 1,1g Agarose in 44ml TAE-Puffer unter Erhitzen aufgelöst, nach Abkühlung auf ca. 50° C mit 1,2 µl Ethidiumbromid vermischt und in eine Gelkammer gegossen, wo die Lösung zu Gel erstarrte. 10µl des PCR-Produktes wurden mit 1µl Blaupuffer vermischt und davon 10µl in die Geltaschen gegeben. In TAE-Puffer erfolgte die Elektrophorese bei maximal 35V und maximal 40mA über ca. 60 Minuten. Eine oder mehrere Geltaschen wurden mit einer 100bp-DNA-Leiter-Lösung gefüllt, um anhand der Leiterbanden die Größe der eigenen Produkte abschätzen zu können.

Die Amplifikate verteilen sich ihrer Größe nach über dem Gel, dabei „wandern“ kleinere Produkte schneller und somit weiter als größere. Das Ethidiumbromid lagert sich in die Doppelhelix der DNA ein und kann mittels UV-Licht die Produktbanden sichtbar werden lassen.

Die Banden wurden mit einer Sofortbildkamera unter UV-Licht-Bestrahlung fotografisch festgehalten.

2.5 Serologische Testverfahren

2.5.1 ELISA

Für den Enzyme-linked Immunosorbent Assay wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 0.35 µg/ml (Proteingehalt) Kultur-Antigen von epimastigoten *Trypanosoma cruzi* (Knecher et al. 1994) beschichtet, verdünntes Patientenserum (1:160) aufgetragen, inkubiert und anschließend gewaschen. An Peroxidase gebundenes Antihuman-IgG (Dako) wird auf die Platte gegeben und nach erneutem Waschen das Substrat zugesetzt. Durch eine Extinktionsmessung wird bei 492 nm der Farbumschlag des Substrates gemessen und anhand einer polynomischen Eichkurve in Antikörpereinheiten (AKE) als Vielfaches der Normalaktivität umgerechnet (Felgner 1978). 15 AKE und mehr wurden als positives Ergebnis gewertet (Nachweis von IgG-Antikörpern in signifikanter Konzentration), AKE von 10-14 als grenzwertig und AKE unter 10 als negativ. Alle Untersuchungen wurden im

Doppelansatz und unter Mitführung einer Antigen-Negativkontrolle (zum Ausschluss einer unspezifischen Serumbindung) durchgeführt.

2.5.2 Immunfluoreszenz (IFAT)

Für den indirekten Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) nach Camargo et al. (1966) wurden 12-Felder-Objektträger für den IFAT mit formalinaktivierten, epimastigoten Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* beschichtet. Von den Patientenseren wurden Verdünnungen von 1:32-1:128 hergestellt und im Doppelansatz auf die Objektträgerfelder gegeben. Nach einstündiger Inkubation wurden diese 3mal mit PBS gewaschen und mit einem Konjugat bedeckt, das aus mit Fluorescein-Isothiocyanat markiertem Antihuman-IgG (BioMerieux) besteht. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregung von 450-490 nm. Eine vollständige Randfluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:128 und höher wurde als positiv gewertet, bei 1:64 als grenzwertig und bei einer niedrigeren Verdünnung als 1:64 als negativ.

Entsprechend den derzeitigen Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO 1991) wurde die Serodiagnostik als positiv gewertet, wenn beide Testverfahren positive Ergebnisse zeigten.

2.6 Blutproben von Einwohnern eines Endemiegebietes und Kontrollen

2.6.1 Proben- und Datensammlung

Die Gegend um Cochabamba ist ein wichtiges Endemiegebiet Boliviens (WHO 1991). Es wurden 44 Einwohnern aus und um Cochabamba je 4,5 ml Blut abgenommen. Die ausgewählten Personen leben alle in einer Gegend in der die Chagas-Krankheit endemisch vorkommt, sind in einer solchen aufgewachsen, oder haben eine Zeitlang in einer solchen gelebt. Das Blut wurde im Policlinico de la Caja Nacional de Seguridad Social, Cochabamba abgenommen. Ein anamnestischer Fragebogen zu möglichen Symptomen einer chronischen Chagaserkrankung, sowie früheren Untersuchungen und Therapien diesbezüglich wurde für jede Person ausgefüllt (siehe Abb. 2).

Als Negativkontrollen aus einem nichtendemischen Gebiet wurden 30 Blutabnahmen bei gesunden jungen Erwachsenen in Deutschland vorgenommen.

2.6.2 Vorbereitung der Blutproben mit Guanidinhydrochlorid.

Die Blutproben aus Bolivien wurden alle direkt nach Abnahme (EDTA-Röhrchen, 4,5ml) mit einer 6 molaren wässrigen Guanidinhydrochlorid-Lösung 1:1 vermischt und anschließend 15 min lang im Wasserbad gekocht.

Alle Proben wurden bei + 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und gekühlt nach München transportiert.

Apellidos: _____ Nombre: _____ Fecha de nacimiento.: _____ Lugar: _____ Dirección actual: _____	Paciente Nr.: <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; display: inline-block; vertical-align: middle;"></div> Sexo: m <input type="checkbox"/> f <input type="checkbox"/> Lugar endémico: <input type="checkbox"/> Lugar endémico: <input type="checkbox"/>
Clínica:	
Con diagnóstico de Chagas desde: _____ Síntomas en este momento: <input type="checkbox"/> _____ _____	
Capacidades físicas↓ <input type="checkbox"/> Taquicardias/ritmo de galope <input type="checkbox"/> Disnea <input type="checkbox"/> Edema de extremidades <input type="checkbox"/>	Fiebre <input type="checkbox"/> Poliadenopatía <input type="checkbox"/> Obstipación <input type="checkbox"/> Disfagia <input type="checkbox"/>
Laboratorio:	
Examen microscópico pos. <input type="checkbox"/> Fecha: _____ Examen serológico: <input type="checkbox"/> Método utilizado: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Fecha: _____ Otros exámenes: _____	
Ex. complementarios:	
Rx Pulmón: <input type="checkbox"/> Volumen cardiaco: _____ Electrocardiograma: <input type="checkbox"/> _____ _____ Datos complementarios: _____	
Terapia:	
Actual: <input type="checkbox"/> _____ Anterior: <input type="checkbox"/> _____ Fecha: _____	

Abb. 2: Fragebogen für die Einwohner Cochabambas, denen für diese Arbeit Blut entnommen wurde. Er diente zur Erfassung der Grunddaten, des klinischen Zustandes und der vorangegangenen Untersuchungen bzw. Therapien bezüglich der Chagas-Krankheit. Alle Angaben wurden rein anamnestisch erhoben.

IV ERGEBNISSE

Die vier in der Literatur schon beschriebenen PCR-Methoden (s. 2.3.1) wurden zunächst einzeln optimiert.

Es wurde ein Vergleich hinsichtlich der Sensitivität und der Spezifität unternommen. Die Sensitivität wurde anhand von Verdünnungsreihen ermittelt. Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* wurden in 10er-Potenzschritten in PBS und in EDTA-Vollblut verdünnt. Die Spezifität wurde ermittelt indem andere Trypanosomatidae wie *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma rangeli* und verschiedene *Leishmania* Spezies untersucht wurden. Die Ergebnisse der 4 PCR-Methoden wurden verglichen.

Zuletzt wurden die Protokolle mit Proben von Einwohnern aus Cochabamba, Bolivien validiert. Die 28 seropositiven Proben wurden zusammen mit 14 seronegativen bolivianischen Proben und 30 seronegativen deutschen Blutproben „blind“ untersucht. Alle 4 PCR-Methoden wurden hiermit validiert.

Alle Blutproben waren EDTA-Vollblut, vermischt mit 6M Guanidinhydrochlorid als Stabilisator. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem QIAGEN DNA Blood Mini Kit. Um Interferenzen zwischen der chaotropen Säure Guanidinhydrochlorid und dem DNA Blood Mini Kit zu erkennen, wurde ein Vergleich dieser DNA-Extraktion mit einer weiteren Isolationsmethode (Phenol-Chloroform-Isoamyl) unternommen.

1. PCR-Optimierung

Um sicherzustellen, dass die PCR-Methoden unter optimalen Bedingungen ablaufen, war es erforderlich die beschriebenen Verfahren zunächst an die verwendeten Reagenzien und Geräte anzupassen, d.h. sie zu optimieren. Die publizierten Daten werden dabei nach oben und unten variiert um Maxima einer evtl. Kurve zu erkennen. Die Annealingtemperatur sowie die Magnesiumkonzentration spielen hierbei eine große Rolle.

Die gefundenen Optimalwerte (s. Tab 2 und 3) wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

1.1 Annealingtemperatur

Die Annealingtemperatur wurde je nach publiziertem Ausgangswert um 4°-5° C nach oben und unten verschoben:

	publizierte Temperaturen	verwendete Variationsbreite	gefundener Optimalwert
TCZ1+TCZ2	55°/53°/64° C (Moser 1989/ Russomando 1992, 1998/ Ribeiro-dos-santos 1999)	50°-55°-60° C	55°C
BP1+BP2	60° C (Silber 97)	55°-60°-64° C	60° C
121+122	64° C (Wincker 1994, Britto 1994, Gomes 1998)	60°-64°-68° C	60° C
121+89/90	64° C (Ribeiro 1999)	60°-64°-68° C	64° C
91+122	64° C (Ribeiro 1999)	60°-64°-68° C	60° C

Tab. 2: Optimierung der Annealingtemperaturen bei allen 4 PCR-Protokollen (siehe auch Abb. 3-5).

1.2 Magnesiumkonzentration

Die Magnesiumkonzentration wurde um 0.5mM-2.5mM von der Publikation abweichend eingesetzt.

	publizierte Mg ²⁺ -Konzentrationen	verwendete Variationsbreite	gefundener Optimalwert
TCZ1+TCZ2	1.5mM (Moser 1989, Ribeiro 1999)	1-1.5-2 mM	2 mM
BP1+BP2	7.5mM (Silber 1997)	1-2-3-4-5-7.5-10 mM	4mM
121+122	4.5mM/3.5mM (Wincker 1994, Britto 1994, Britto 1995, Wincker 1996, Junqueira 1996/Gomes 1999)	3-4.5-6 mM	5mM
121+89/90	4.5mM (Ribeiro 1999)	3-4.5-6 mM	3mM
91+122	4.5mM (Ribeiro 1999)	3-4.5-6 mM	3mM

Tab. 3: Optimierung der publizierten Magnesiumkonzentrationen bei allen 4 PCR-Protokollen (siehe auch Abb. 3-5).

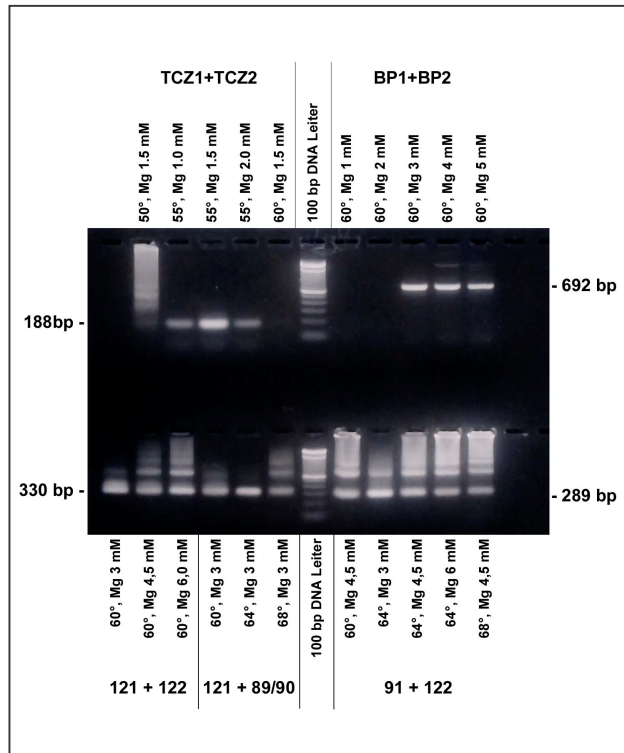


Abb. 3: Optimierung der Protokolle aller 5 Primerpaare mit Veränderung der Annealingtemperatur (in Grad Celsius) und der Magnesiumkonzentration.

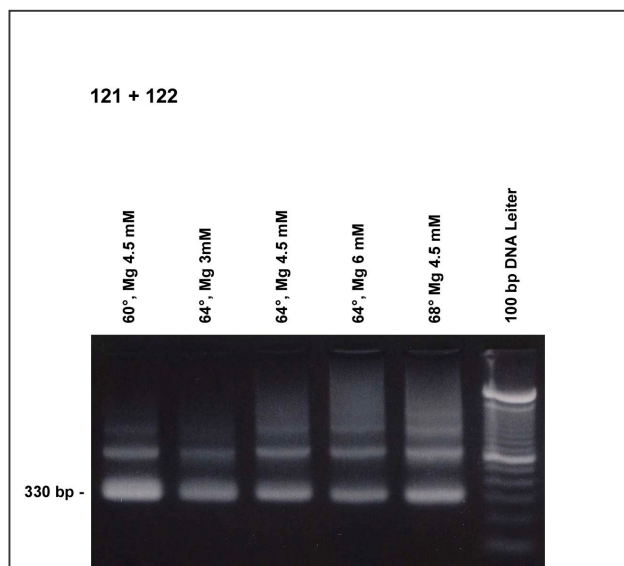


Abb. 4: Optimierung des 121+122 PCR-Protokolls mit Veränderung der Annealingtemperatur (in Grad Celsius) und der Magnesiumkonzentration.

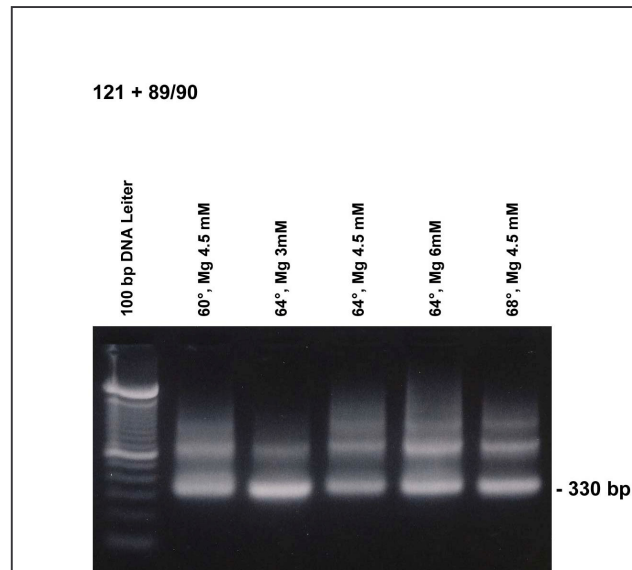


Abb. 5: Optimierung des ersten Primerpaares der nested PCR bezüglich Annealingtemperatur (in Grad Celsius) und Magnesiumkonzentration.

Eine Elongationszeit (90 Sekunden bei 72° C) wurde bei den Minicircle-PCR-Protokollen (121+122 und 121+89/90 und 91+122) hinzugefügt. Dadurch entstand eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Protokolle.

Die Gelatinekonzentration in den Protokollen TCZ1+TCZ2 und BP1+BP2 wurde belassen (0.01%).

2. Sensitivität

2.1 Verdünnungsreihen von *Trypanosoma cruzi* in PBS

Epimastigote Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* wurden in steril filtriertem PBS auf Konzentrationen von 1000-100-10-1-0.1-0.01-0.001-0.0001 Parasiten/ μ l verdünnt, anschließend die DNA isoliert und mit allen 4 Protokollen die entsprechenden Sequenzen amplifiziert:

	geringste noch nachweisbare Konzentration (Parasit/ μ l)
TCZ1+TCZ2	0.001/ μ l - 0.01/ μ l
BP1+BP2	1/ μ l
121+122	0.001/ μ l
„nested“	0.001/ μ l

Tab. 4: Verdünnungsreihen (1000-100-10-1-0.1-0.01-0.001-0.0001 Parasiten/ μ l) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in PBS wurden in die 4 PCR-Protokolle eingesetzt und die geringste noch nachweisbare Konzentration bestimmt.

Die Ergebnisse waren bei mindestens 5maliger Wiederholung in getrennten Ansätzen reproduzierbar. Lediglich bei dem TCZ1+TCZ2-Protokoll ergaben sich Schwankungen um eine 10er-Potenz (Tab. 4).

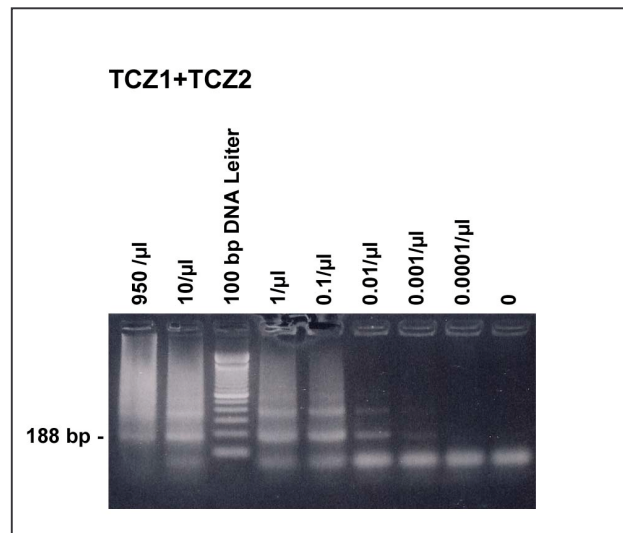


Abb. 6: Verdünnungsreihe (950-100-10-1-0.1-0.01-0.001-0.0001 Parasiten/µl) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in PBS. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern TCZ1+TCZ2 war 0.001Parasit/µl.

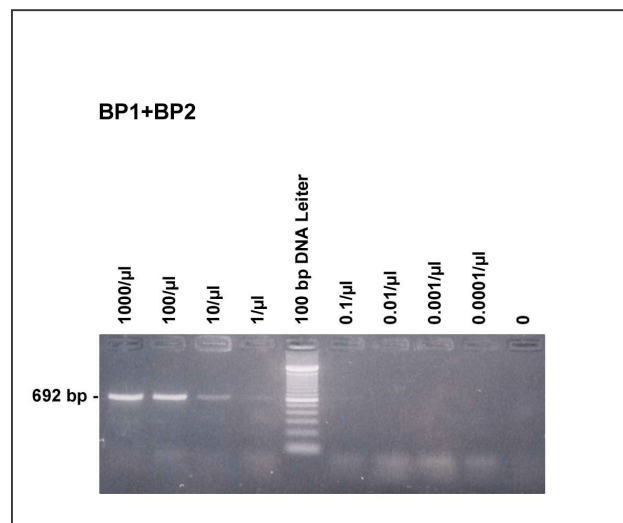


Abb. 7: Verdünnungsreihe (1000-100-10-1-0.1-0.01-0.001-0.0001 Parasiten/µl) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in PBS. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern BP1+BP2 war 1Parasit/µl.

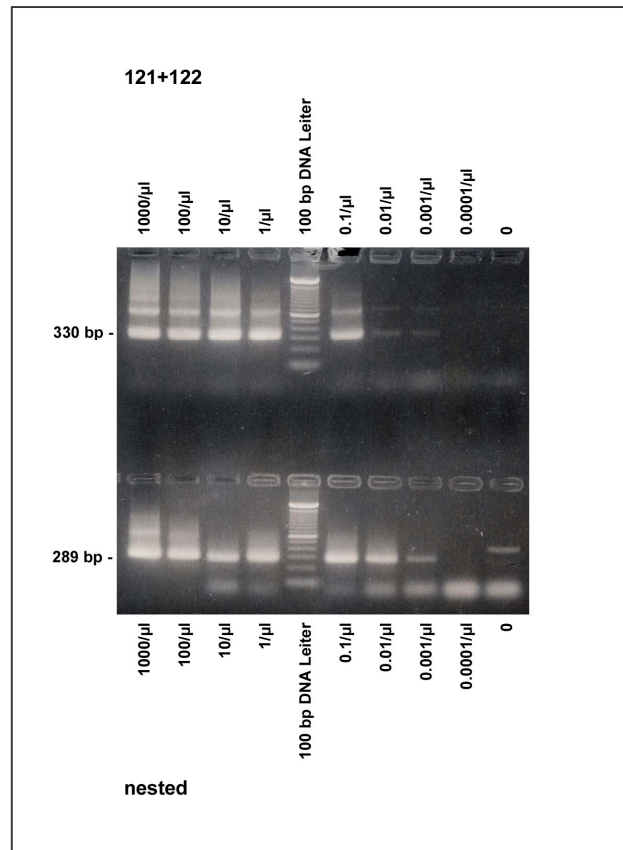


Abb. 6: Verdünnungsreihe (1000-100-10-1-0.1-0.01-0.001-0.0001 Parasiten/ μ l) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in PBS. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern 121+122 war 0.001Parasit/ μ l. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern der nested PCR war ebenfalls 0.001Parasit/ μ l.

2.2 Verdünnungsreihen von *Trypanosoma cruzi* in EDTA-Blut und Serum

Es wurde zur Verdünnung EDTA-Blut und Serum verwendet, um eventuelle Einflüsse von Blutbestandteilen auf die PCR und die DNA-Extraktion zu erkennen.

Frisch abgenommenes Blut wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von epimastigoten Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* versetzt. Ein Teil des Blutes wurde dann mit EDTA vermischt, der andere Teil nach einsetzender Gerinnung zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Von den Blut- sowie den Serumproben wurde nun die DNA isoliert und in die 4 PCR-Methoden eingesetzt.

In den einzelnen Proben befanden sich 100-10-1-0.1 Parasiten/ μ l. Die geringsten noch nachweisbaren Konzentrationen waren:

	Serum	EDTA-Blut
TCZ1+TCZ2	0.1/μl	0.1/μl
BP1+BP2	>100/μl	10/μl
121+122	0.1/μl	0.1/μl
„nested“	0.1/μl	0.1/μl

Tab. 5: Verdünnungsreihen (100-10-1-0.1 Parasiten/μl) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in Serum und EDTA-Blut wurden in die 4 PCR-Protokolle eingesetzt und die geringste noch nachweisbare Konzentration bestimmt.

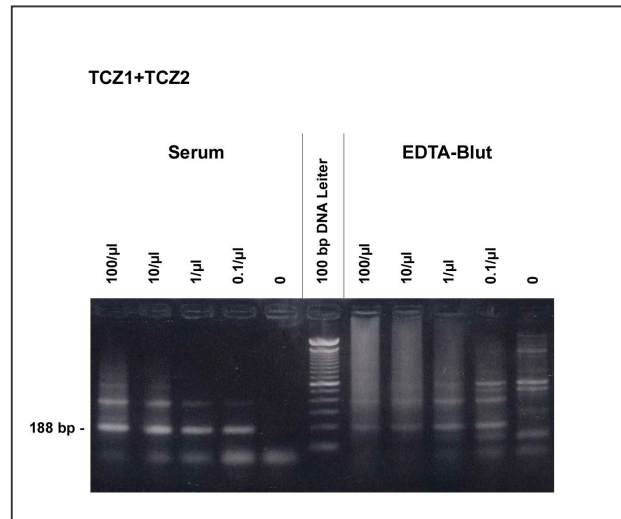


Abb. 8: Verdünnungsreihe (100-10-1-0.1-0.1 Parasiten/μl) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in Serum und EDTA-Blut. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern TCZ1+TCZ2 war in Serum sowie in EDTA-Blut 0.1Parasit/μl. 0 = Negativkontrolle.

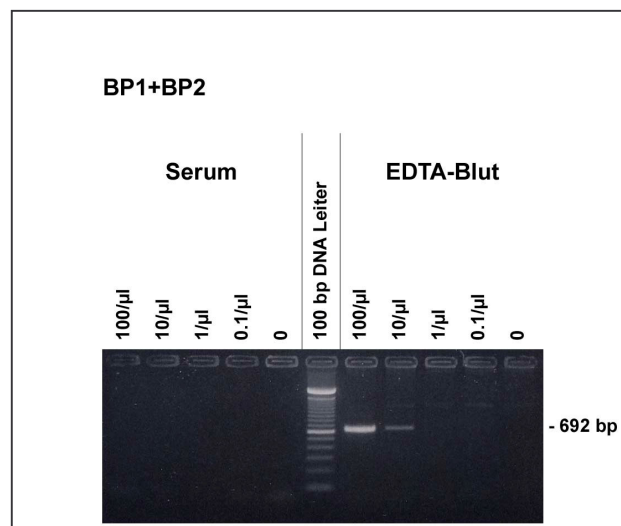


Abb. 9: Verdünnungsreihe (100-10-1-0.1-0.1 Parasiten/μl) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in Serum und EDTA-Blut. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern BP1+BP2 war in Serum >100 Parasiten/μl, in EDTA-Blut 10 Parasiten/μl. 0 = Negativkontrolle.

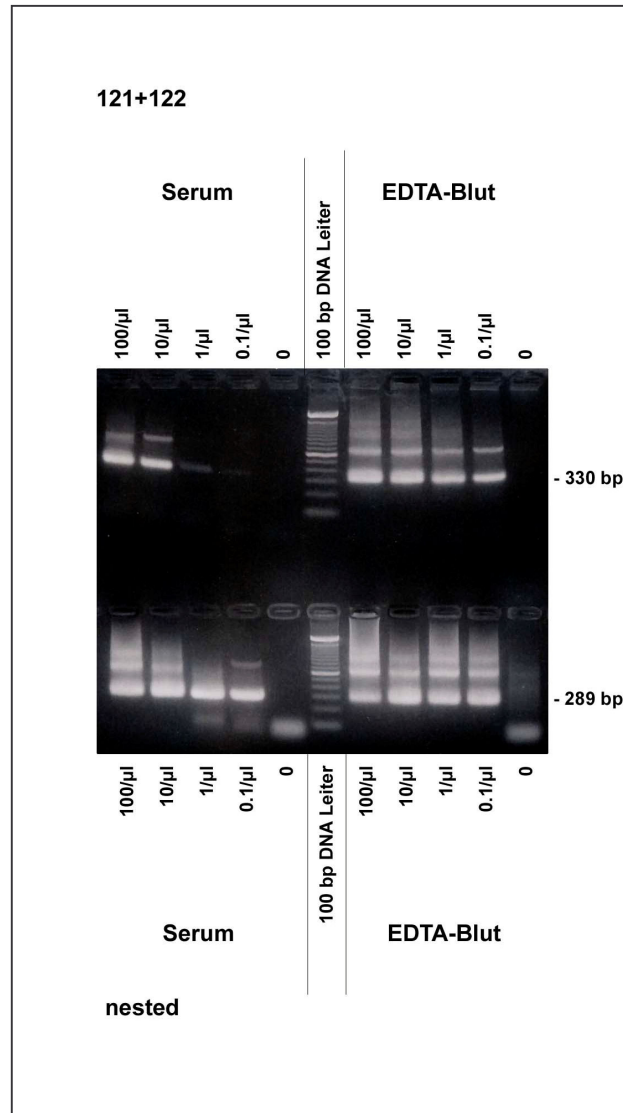


Abb. 10: Verdünnungsreihe (100-10-1-0.1-0.1 Parasiten/μl) von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* in Serum und EDTA-Blut. Die geringste noch nachweisbare Konzentration mit den Primern 121+122 war in Serum sowie in EDTA-Blut 0.1 Parasiten/μl. Mit der nested PCR war sie ebenfalls in Serum sowie in EDTA-Blut 0.1 Parasiten/μl. 0 = Negativkontrolle.

3. Spezifität

Um zu erkennen, ob mit den hier verwendeten Primerpaaren bei anderen Parasiten Amplifikate mit ähnlicher Basenpaarlänge entstehen, wurden verschiedene Kinetoplastidae in die PCR eingesetzt:

	TCZ1+TCZ2	BP1+BP2	121+122	„nested“
<i>Leishmania major</i>	-	-	-	-
<i>Leishmania tropica</i>	-	-	-	-
<i>Leishmania donovani infantum</i>	-	-	-	-
<i>Leishmania chagasi</i>	-	-	-	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	-	-	-	-
<i>Leishmania mexicana</i>	-	-	-	-
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	-	-	-	pos.
<i>Trypanosoma rangeli</i> (α+17)	-	-	pos.	pos.
<i>Trypanosoma rangeli</i> (Q1140)	-	pos.*	pos.	pos.

Tab. 6: Es wurden verschiedene andere Kinetoplastiden in die 4 PCR-Protokolle eingesetzt um herauszufinden ob mit ihnen Amplifikate mit einer ähnlichen Basenpaarlänge wie bei *Trypanosoma cruzi* entstehen.

* Bei BP1+BP2 ergab sich ein geringfügig kleineres Amplifikat (ca. 620 bp) bei *Trypanosoma rangeli* Q1140 als bei *Trypanosoma cruzi*.

Mit den Primerpaaren, die an den Minicircles ansetzen (121+122 und 121+89/90, 91 +122) zeigten sich deutliche Amplifikate bei beiden *Trypanosoma rangeli*-Stämmen. Bei der nested PCR zeigten sich zusätzlich Amplifikate bei *Trypanosoma brucei brucei*. Bei keiner der Leishmanien kam es zu Amplifikationen.

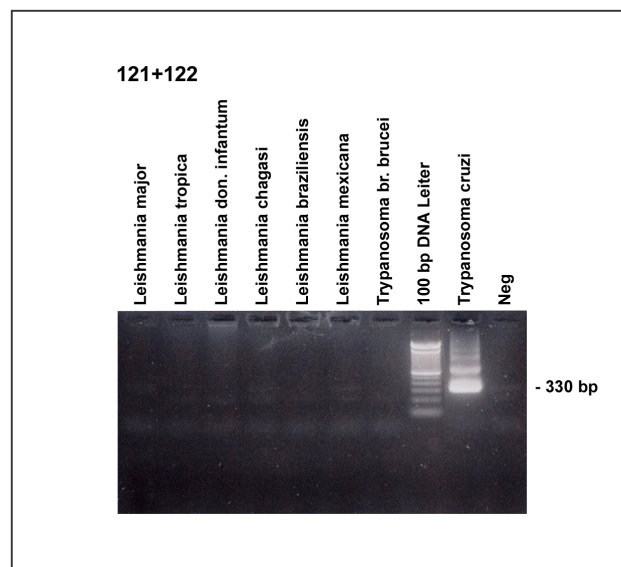


Abb. 11: Verschiedene Kinetoplastiden (Leishmanien und Trypanosomen) wurden mit der PCR untersucht. Mit den Primern 121+122 zeigten sich keine *Trypanosoma cruzi*-spezifischen Amplifikationen.

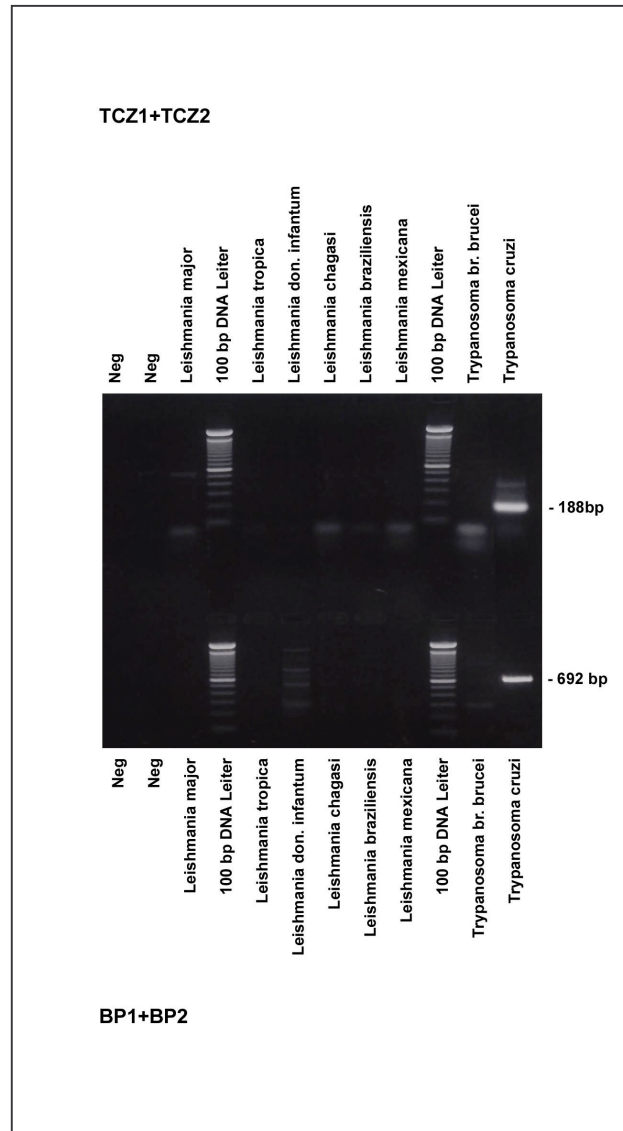


Abb. 12: Verschiedene Kinetoplastiden (Leishmanien und Trypanosomen) wurden mit der PCR untersucht. Mit den Primern TCZ1+TCZ2 und BP1+BP2 zeigten sich keine Trypanosoma cruzi-spezifischen Amplifikationen.

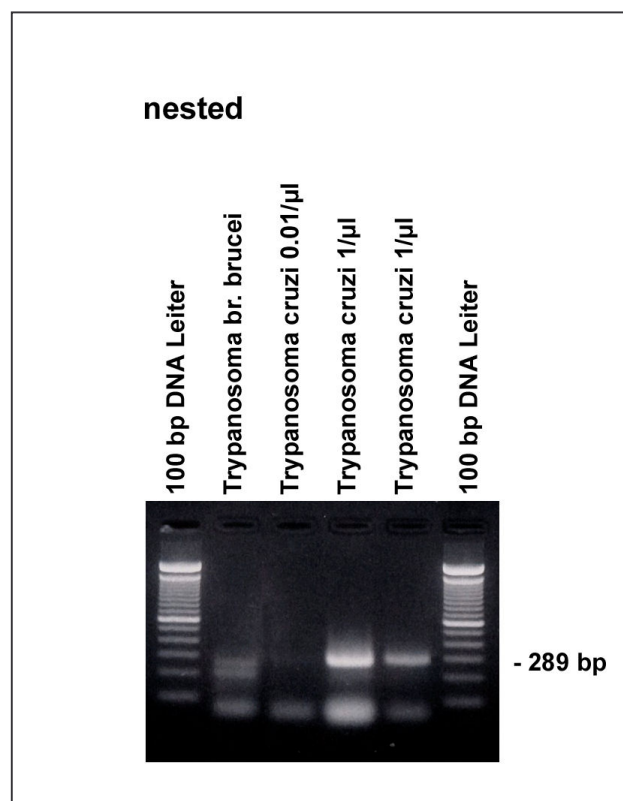
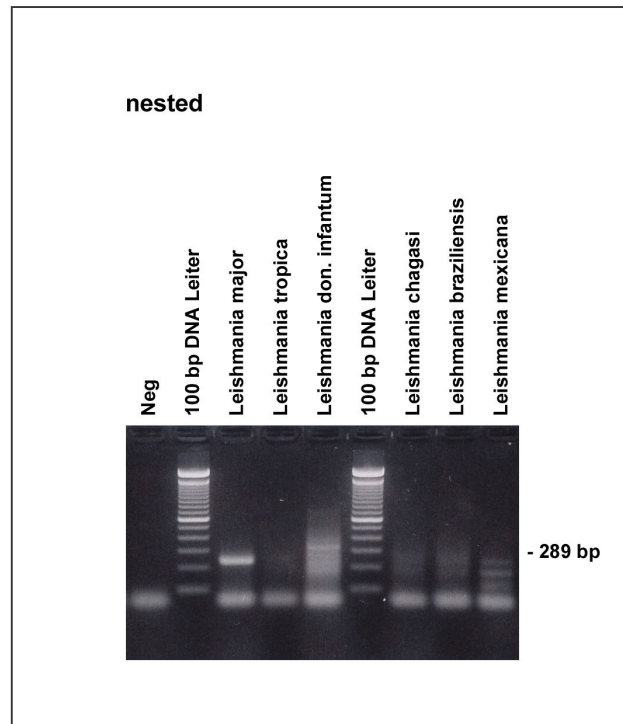


Abb. 13 und 14: Verschiedene Kinetoplastiden (Leishmanien und Trypanosomen) wurden mit der PCR untersucht. Mit den Primern der nested PCR zeigte sich bei *Leishmania major* eine Amplifikation, die allerdings eine kürzere Basenpaarlänge aufwies als *Trypanosoma cruzi*. Bei *Trypanosoma brucei brucei* zeigte sich eine *Trypanosoma cruzi*-spezifische Amplifikation.

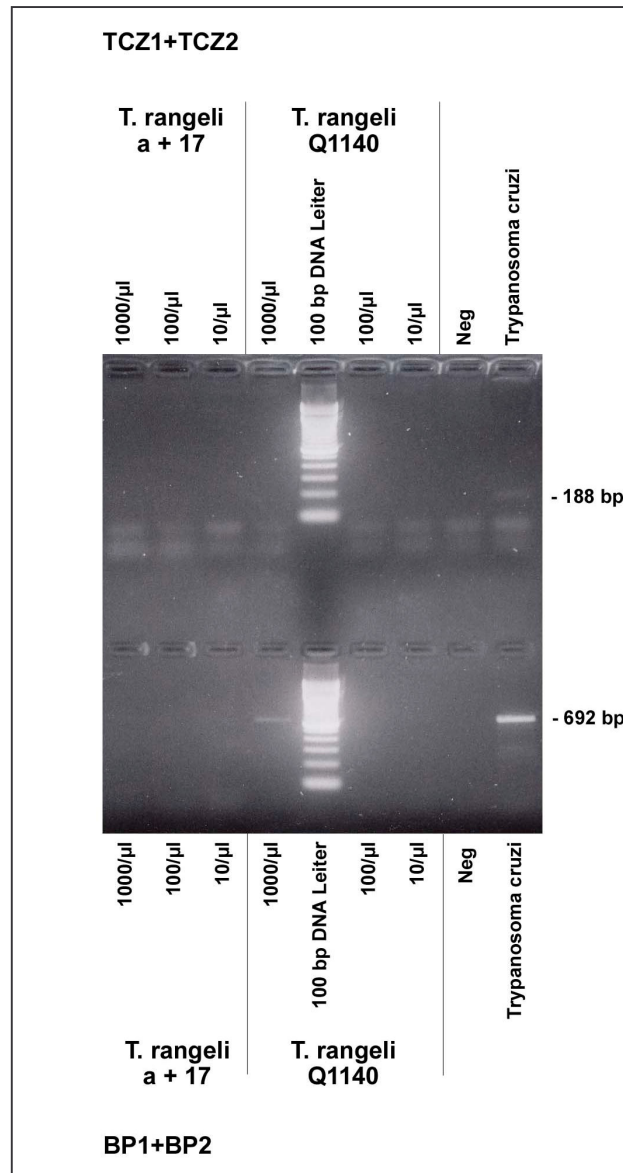


Abb. 15: Zwei verschiedene *Trypanosoma rangeli*-Stämme (α+17 und Q1140) wurden in verschiedenen Verdünnungen mit der PCR untersucht. Mit den Primern TCZ1+TCZ2 und BP1+BP2 zeigten sich keine trypanosoma-cruzi-spezifischen Amplifikationen. Bei einer hohen Konzentration des Stammes Q1140 (1000/μl) ergab sich mit den Primern BP1+BP2 ein Amplifikat, das geringfügig kürzer war als bei *Trypanosoma cruzi* (ca. 620 bp).

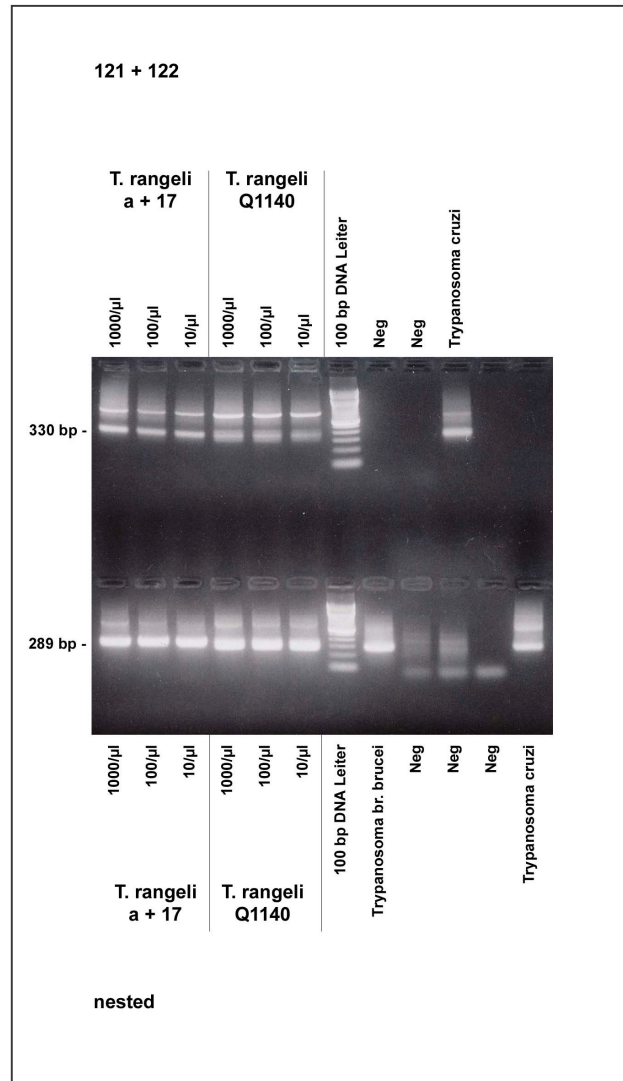


Abb. 16: Zwei verschiedene *Trypanosoma rangeli*-Stämme ($\alpha+17$ und Q1140) wurden in verschiedenen Verdünnungen mit der PCR untersucht. Mit den Primern 121+122 und denen der nested PCR zeigten sich bei beiden Stämme und in allen Verdünnungen *Trypanosoma cruzi*-spezifische Amplifikationen. Auch *Trypanosoma brucei brucei* zeigte mit den Primern der nested PCR Amplifikationen mit einer Länge von ca. 289 bp.

4. Vergleich zweier Isolationsmethoden mit und ohne Zusatz von Guanidinhydrochlorid

Epimastigote Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit EDTA-Blut vermischt und mit der gleichen Menge 6-molarer Guanidinhydrochlorid-Lösung versetzt. Die Endkonzentrationen betragen 100, 1 und 0,01 Parasiten/ μ l.

Parallel dazu wurden Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* mit PBS vermischt, so dass sich auch hier die Endkonzentrationen von 100, 1 und 0,01 Parasiten/ μ l ergaben. Bei allen 6 nun vorliegenden Proben wurden jeweils einmal mit dem QIAGEN Blood Mini Kit und einmal mit der PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl)-Methode die DNA isoliert. Anschließend wurden die 12 Isolate in die PCR mit den Primern 121+122 eingesetzt.

Ergebnisse:

	EDTA-Blut + Guanidinhydrochlorid			PBS		
	0.01/ μ l	1/ μ l	100/ μ l	0.01/ μ l	1/ μ l	100/ μ l
QIAGEN	+	++	++	-	++	++
PCI	-	++	++	-	++	++

Tab. 7: Sensitivität der PCR-Methode mit den Primern 121/122 bei Anwendung der beiden DNA-Isolationsmethoden QIAGEN Blood Mini Kit und PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl) anhand einer Verdünnungsreihe der Kulturformen von *Trypanosoma cruzi*: Vergleich von Proben mit EDTA-Blut und Guanidinhydrochlorid als Stabilisator und von Proben mit PBS.

Wurde bei EDTA-Blutproben mit dem Stabilisator Guanidinhydrochlorid die DNA mittels der QIAGEN-Extraktion isoliert, entstanden bis zur Konzentration von 0,01 Parasiten/ μ l Amplifikate. Wurde bei den gleichen Proben zur DNA-Isolation die PCI-Methode angewandt, bildeten sich Amplifikate nur bis zu einer Minimal-Konzentration von 0,1 Parasiten/ μ l.

PBS als Lösung zeigte keinen Unterschied bei den beiden verschiedenen DNA-Isolationsmethoden. Bei beiden Methoden bildeten sich Amplifikate bis zu einer Minimal-Konzentration von 0,1 Parasiten/ μ l.

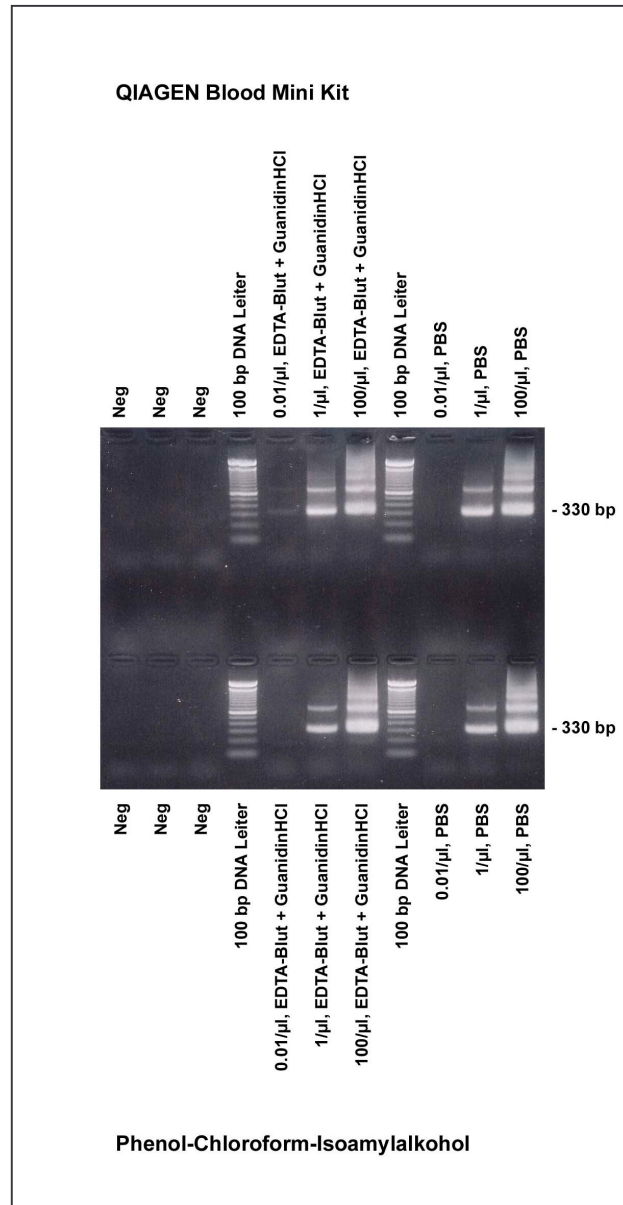


Abb.17: Anhand einer Verdünnungsreihe von Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* wurde ein Vergleich der zwei DNA-Isolationsmethoden QIAGEN-Blood-Mini-Kit und PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl) auf Sensitivität und auf den Einfluss von EDTA-Blut unternommen.

Kulturformen von *Trypanosoma cruzi* wurden mit EDTA-Blut und Guanidinhydrochlorid zu drei verschiedenen Konzentrationen vermischt. Parallel hierzu wurden die gleichen Konzentrationen mit PBS hergestellt. Von jeder Probe wurde nun die DNA einmal mit der PCI-Extraktion und einmal mit dem QIAGEN-Blood-Mini-Kit isoliert und mit den Primern 121+122 die DNA-Sequenz in der PCR amplifiziert.

5. Validierung

Die insgesamt 74 Proben (27 seropositive, 3 serologisch grenzwertige, 14 seronegative aus Bolivien; 30 seronegative aus Deutschland) wurden institutsintern von einer unabhängigen Person mit Zahlen einer Zufallstafel codiert. Dem Auswerter der Ergebnisse war somit die Zugehörigkeit der Proben zu den Personen nicht bekannt. Erst nach Darstellung und Interpretation wurden die Proben decodiert. Alle 74 Proben wurden mit allen 4 PCR-Methoden untersucht.

5.1 Blutproben aus einem endemischen Gebiet

5.1.1 Basisdaten und Serologie

Es wurden anamnestisch die Daten zur Person, zur Klinik und zu evtl. vorangegangenen Untersuchungen und Therapien bezüglich der Chagas-Krankheit erhoben. In der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München wurden alle Proben serologisch mittels ELISA und IFAT untersucht.

Unter den 44 gesammelten Proben waren 27 seropositiv (Tab. 8), 3 waren serologisch grenzwertig (Tab. 9) und 14 seronegativ (Tab. 10).

Serologisch positive Einwohner (Bolivien):

Nr.	Grunddaten				Klinik								Untersuchungen/Therapie in Bolivien				Serologie in München	
	Alter	Geschlecht	Wohnort = Endemiegebiet	anamn. Chagasdiagnose (Jahr)	Leistungsabfall	Rhythmusstörungen	Dyspnoe	Ödeme	Fieber	Polyadenopathie	Obstipation	Dysphagie	Sonstiges	Mikroskopie	Serologie (Jahr)	pos. Xenodiagnose	Therapie (Benznidazol)	IFAT
1	58	f	x	98			x		x			art. Hypertonie			98 99	98	>128	38
2	51	m	x	01										HAI: 1/128 ELISA: +	01		>128	173
3	49	f	x	00	x	x				x		Magenulkus	-	HAI: 1/128 ELISA: +	01		>128	1187
4	47	f	x	91	x	x	x		x			Herzschmerzen					>128	60
5	20	m	x	93								kard.Hypertrophie		HAI: 1/16 ELISA: +	01	95	128	13
8	56	f	x	00	x	x	x							HAI: 1/16 TIF:+	00	00	>128	22
9	68	f	x	00	x	x	x			x		Herzinsuff., RS-Block, Colonhypotonie		HAI: 1/64 ELISA: +	00		>128	38
11	35	f	x	94													>128	118
12	40	f	x	01		x				x	x	Nachtschweiß, Bradykardie		HAI: 1/128	01		>128	33
13	27	f	x	00		x	x									00	128	76
16	45	f	x	91						x		LVHypertr., RS-Block, Hyperthyreose		HAI: 1/128 ELISA: +	01		>128	32
19	58	m	x	01													>128	47
20	54	m	x	95								kard.Hypertrophie		HAI: + ELISA: +	01	95	>128	40
21	61	f	x	01			x										128	49
23	57	m	x	-	x	x	x									01	128	12
25	56	f	x	94	x		x	x		x		Herzschmerzen				94	>128	66
26	52	f	x	65		x		x				kard.Hypertrophie		HAI: 1/8 ELISA: +		82	128	13
27	41	f	x	87	x	x				x					87	87	128	15
28	41	f	x	98	x					x				HAI: 1/128 TIF: 1/128	97		>128	67

Nr.	Grunddaten				Klinik									Untersuchungen/Therapie in Bolivien				Serologie in München	
	Alter	Geschlecht	Wohnort = Endemiegebiet	anamn. Chagasdiagnose (Jahr)	Leistungsabfall	Rhythmusstörungen	Dyspnoe	Ödeme	Fieber	Polyadenopathie	Obstipation	Dysphagie	Sonstiges	Mikroskopie	Serologie (Jahr)		pos. Xenodiagnose	Therapie (Benznidazol)	IFAT
30	56	f	x	01							x			HAI: + ELISA: +	01			>128	50
31	44	m	x	01		x				x								128	35
32	31	m	x	00		x								HAI: +	00			>128	136
33	26	f	x	89						x		art. Hypotonie		+	93	97		64	16
35	44	f	x	00	x	x	x					Herz- schmerzen		+	00			>128	122
36	45	f	x	96								Rheuma		Imm.fl.: + ELISA: +	96			>128	154
39	31	m	x	99	x						x	HNO- Tumor		TIF: + ELISA: +	99			>128	96
40	39	f	x	99	x	x	x	x				Nacht- schweiß		HAI: + ELISA: +	99	99	99	>128	67

Tab. 8: Zusammenstellung der Einwohner Boliviens, die in München serologisch positiv waren: Anhand eines Fragebogens (siehe Abb. 2) wurden anamnestisch die Grunddaten, die klinischen Symptome und die (in Bolivien) vorausgegangenen Untersuchungen bzw. Therapien bezüglich der Chagas-Krankheit erhoben (HAI=Hämagglutination-Inhibitions-Test). In München wurden IFAT und ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden folgendermaßen gewertet:

Immunfluoreszenz-AK-Test: ≥ 128 = positiv; 64 = grenzwertig; < 64 = negativ

ELISA: > 15 AKE = positiv; 10-14 = grenzwertig; < 10 = negativ

Serologisch grenzwertige Einwohner (Bolivien):

Nr.	Grunddaten				Klinik										Untersuchungen/Therapie in Bolivien				Serologie in München	
	Alter	Geschlecht	Wohnort = Endemiegebiet	anamn. Chagasdiagnose (Jahr)	Leistungsabfall	Rhythmusstörungen	Dyspnoe	Ödeme	Fieber	Polyadenopathie	Obstipation	Dysphagie	Sonstiges	Mikroskopie	Serologie (Jahr)		pos. Xenodiagnose	Therapie (Benznidazol)	IFAT	ELISA
7	57	f	x	99	x	x	x	x					LV-Hypertrophie	-	HAI: 1/16 ELISA: +	01			128	8
29	32	f	x	77											HAI: + ELISA: +			77	64	7
41	49	m	x	81													+		64	5

Tab. 9: Zusammenstellung der Einwohner Boliviens, die in München serologisch grenzwertig waren: Anhand eines Fragebogens (siehe Abb. 2) wurden anamnestisch die Grunddaten, die klinischen Symptome und die (in Bolivien) vorausgegangenen Untersuchungen bzw. Therapien bezüglich der Chagas-Krankheit erhoben (HAI=Hämagglutination-Inhibitions-Test). In München wurden IFAT und ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden folgendermaßen gewertet:

Immunfluoreszenz-AK-Test: ≥ 128 = positiv; 64 = grenzwertig; < 64 = negativ

ELISA: > 15 AKE = positiv; 10-14 = grenzwertig; < 10 = negativ

* Es wurde die vom Patienten entdeckte Raubwanze untersucht. Es konnte *Trypanosoma cruzi* nachgewiesen werden.

Serologisch negative Einwohner (Bolivien):

Nr.	Grunddaten				Klinik								Untersuchungen/Therapie in Bolivien				Serologie in München		
	Alter	Geschlecht	Wohnort = Endemiegebiet	anamn. Chagadiagnose (Jahr)	Leistungsabfall	Rhythmusstörungen	Dyspnoe	Ödeme	Fieber	Polyadenopathie	Obstipation	Dysphagie	Sonstiges	Mikroskopie	Serologie (Jahr)	pos. Xenodiagnose	Therapie (Benznidazol)	IFAT	ELISA
6	47	m	x		x	x	x	x					kard.Hypertrophie					neg	1
10	50	f	x	81				x		x							81	32	2
14	45	f		81	x	x	x							+ -	81 97		81	neg	2
15	17	f	x	00														neg	1
17	19	f		01			x			x			Hyperthyreose					32	3
18	26	f	x	99	x					x				HAI: 1/64	98	98		neg	1
22	9	m	x										Romaña-Zeichen '97					neg	1
24	29	f	x	97		x	x	x		x			Herzschmerzen	HAI: + ELISA: +	97			neg	1
34	51	m	x	01	x	x		x		x	x		RS-Block, Asystolien, kard.Hypertrophie	HAI: + ELISA: +	01			neg	1
37	29	m	x	01										+	01			neg	1
38	34	f	x		x	x							Wanzenbiss '89					neg	1
42	69	m	x											HAI: - ELISA: -	01			neg	2
43	18	f	x													+* 00		32	1
44	36	f	x		x	x	x	x		x				- -	97 01			neg	1

Tab. 10: Zusammenstellung der Einwohner Boliviens, die in München serologisch negativ waren: Anhand eines Fragebogens (siehe Abb. 2) wurden anamnestisch die Grunddaten, die klinischen Symptome und die (in Bolivien) vorausgegangenen Untersuchungen bzw. Therapien bezüglich der Chagas-Krankheit erhoben (HAI=Hämagglutination-Inhibitions-Test). In München wurden IFAT und ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden folgendermaßen gewertet:

Immunfluoreszenz-AK-Test: ≥ 128 = positiv; 64 = grenzwertig; < 64 = negativ

ELISA: > 15 AKE = positiv; 10-14 = grenzwertig; < 10 = negativ

* Es wurde die vom Patienten entdeckte Raubwanze untersucht. Es konnte *Trypanosoma cruzi* nachgewiesen werden.

5.1.2 PCR-Ergebnisse

Serologie	Nr.	TCZ1+TCZ2	BP1+BP2	121+122	nested
positiv	1	-	-	-	-
positiv	2	-	-	-	-
positiv	3	-	-	+	+
positiv	4	-	-	-	-
positiv	5	-	-	-	-
positiv	8	-	-	-	-
positiv	9	-	-	+	-
positiv	11	-	-	-	+
positiv	12	-	-	-	-
positiv	13	-	-	-	-
positiv	16	-	-	-	-
positiv	19	-	-	-	+
positiv	20	-	-	-	-
positiv	21	-	-	+	+
positiv	23	-	-	-	-
positiv	25	-	-	-	-
positiv	26	-	-	-	+
positiv	27	-	-	-	-
positiv	28	-	-	-	-
positiv	30	-	-	-	-
positiv	31	-	-	-	-
positiv	32	-	-	-	-
positiv	33	-	-	-	-
positiv	35	-	-	+	-
positiv	36	-	-	-	-
positiv	39	-	-	-	+
positiv	40	-	-	-	-
grenzwertig	7	-	-	-	-
grenzwertig	29	-	-	-	-
grenzwertig	41	-	-	-	-
negativ	6	-	-	-	-
negativ	10	-	-	-	-
negativ	14	-	-	-	-
negativ	15	-	-	-	-
negativ	17	-	-	-	-
negativ	18	-	-	-	-
negativ	22	-	-	-	-
negativ	24	-	-	-	-
negativ	34	-	-	-	-
negativ	37	-	-	-	-
negativ	38	-	-	-	-
negativ	42	-	-	-	-
negativ	43	-	-	-	-
negativ	44	-	-	-	-

Tab. 11: PCR-Ergebnisse der Blutproben aus endemischem Gebiet (Cochabamba, Bolivien). Siehe auch Annex: Abb. 18-33.

- 6 der 27 seropositiven Blutproben erwiesen sich in der nested PCR als positiv (22.2%)
- 4 der 27 seropositiven Blutproben erwiesen sich in der 121+122-PCR als positiv (14.8%)
- Keine der serologisch grenzwertigen Blutproben zeigte *T. cruzi*-spezifische Amplifikate.
- Die Methoden TCZ1+TCZ2 und BP1+BP2 zeigten bei keiner Probe *T. cruzi*-spezifische Amplifikate.
(siehe auch Annex: Abb. 18-33)

5.2 Blutproben aus einem nicht-endemischen Gebiet

5.2.1 Serologie

Als Negativkontrollen wurden 30 Blutabnahmen bei gesunden jungen Erwachsenen in Deutschland vorgenommen. Sie waren alle sowohl mit dem IFAT als auch mit dem ELISA negativ.

5.2.2 PCR-Ergebnisse

Keine dieser Blutproben zeigte mit den 4 PCR-Methoden trypanosomenspezifische Amplifikate.

V DISKUSSION

1. Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen

1.1 Primerauswahl

TCZ1+TCZ2

Diese bereits von mehreren Autoren untersuchten Primer (Ribeiro et al. 1999, Russomando et al. 1998, Russomando et al. 1992, Kirchhoff et al. 1996) amplifizieren eine repetitive Gensequenz der nukleären DNA (nDNA), die etwa 700 mal im Trypanosomen-Genom vorkommt (Lanar et al. 1981, Gonzales et al. 1984). Das Produkt hat eine Basenpaarlänge von 188, die innerhalb der 195 bp langen repetitiven Sequenz liegt. Die große Anzahl an Repetitionen der Sequenz ist eine günstige Voraussetzung für die PCR und kann die Sensitivität erheblich steigern. Wofür dieses Gen codiert ist noch nicht bekannt.

BP1+BP2

Dieses Primerpaar wurde von Silber et al. 1997 beschrieben. Es amplifiziert einen 692 bp langen Kern-DNA-Abschnitt (nDNA). Das Gen codiert für das Flagellarprotein F29 (Silber et al. 1997). Genabschnitte, die für ein bekanntes Protein codieren erweisen sich generell als konstant und selten variabel. Spontanmutationen in diesen Genabschnitten setzen sich meistens nicht durch.

121+122

Dieses Primerpaar amplifiziert eine Gensequenz auf den Minicircles der Kinetoplasten. Die Primer setzen an zwei konstanten Regionen an, die eine variable Region umschließen. Die Länge des entstehenden Produktes ist 330 Basenpaare lang. Die Funktion der Kinetoplasten, vermutlich ehemalige Mitochondrien, ist bislang unbekannt. Die Kinetoplasten-DNA (kDNA) besteht aus Maxicircles und Minicircles (Degrove et al. 88). Die Minicircles liegen in etwa 10.000-facher Kopie vor. Die Sensitivität wird dadurch enorm erhöht. Als ein erstes Problem erweist sich die hohe Variabilität des mittleren Genabschnittes, die eine enzymatische Spaltung der DNA oder eine Hybridisierung als Bestätigungstest in diesem Bereich schwierig werden lässt. Zum Zweiten ist diese Kinetoplasten-DNA auch in anderen Trypanosomatidae (z.B. Leishmanien) vorhanden. Auch bei diesen ist ungeklärt, wofür der Abschnitt codiert. Es kann also möglicherweise auch bei anderen Kinetoplastiden zu Amplifikationen und damit zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.

121+89/90, 91+122

Die „nested“ PCR funktioniert mit einem doppelten, geschachtelten System. Das erste Primerpaar (121+89/90) amplifiziert eine 330 bp lange Region auf den Minicircles der kDNA. Das zweite Paar (91+122) amplifiziert einen Abschnitt innerhalb dieses ersten Produktes, mit einer Länge von 289 bp. Zu der schon amplifizierten ersten Gensequenz wird das zweite Primerpaar zugesetzt und erneut die gesamte Zyklenzahl durchlaufen. Durch diese doppelte Amplifizierung ist nicht nur eine höhere Sensitivität sondern auch eine Zunahme der Spezifität zu erwarten. Insgesamt müssen nun 4 zu den verwendeten Primern komplementäre

Nukleinsäurenabschnitte vorliegen, damit ein Amplifikat entsteht. Die Amplifikation von kDNA-Abschnitten anderer Kinetoplastidae wird dadurch unwahrscheinlicher. Der Genabschnitt entspricht weitgehend dem der 121+122-Methode. Seine Funktion ist nicht bekannt.

1.2 PCR-Methode

Die Polymerasekettenreaktion hat eine sehr hohe Sensitivität, was den Nachweis der Erreger auch schon bei sehr niedrigen Konzentrationen im Untersuchungsmaterial ermöglicht. Hierdurch bedingt ist allerdings auch eine hohe Anfälligkeit für DNA-Kontaminationen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Inhibitorische Komponenten im Patientenblut können auch zu falsch-negativen Resultaten führen. Um beide Fehler rasch zu erkennen, wurde immer mit entsprechenden Negativ- und Positiv-Kontrollen gearbeitet.

Durch die Hotstart-Technik wird die PCR günstig beeinflusst: Ein initialer Denaturierungsschritt bei 96° C über 2 min. sorgt zum einen für die vollständige Denaturierung und Aufspaltung der Doppelstrang-DNA, zum anderen werden unspezifische Primerpaarbildungen reduziert (Nuovo et al. 1991, Chou et al. 1992, Dang et al. 1996). Dieser erste Schritt wird vor Zusatz der Taq-Polymerase durchgeführt um das Enzym zu schonen, da dessen Aktivitätshalbwertszeit bei hohen Temperaturen sinkt (Innis et al. 1990). Alle weiteren Denaturierungsschritte hatten eine Temperatur von 94° C.

1.2.1 Einfluss von Blutbestandteilen auf die PCR

Vergleicht man die Verdünnungsreihen von *Trypanosoma cruzi* in PBS und in EDTA-Blut (bzw. Serum) zeigt sich folgendes: Bei Verdünnung der Erreger in PBS waren mit allen 4 PCR-Methoden deutlich niedrigere Konzentrationen von Parasiten nachweisbar als bei den Verdünnungsreihen mit EDTA-Blut oder Serum. Die Differenzen betragen ein bis zwei 10er-Potenzen. Dies ist wahrscheinlich auf inhibitorische Blutbestandteile zurückzuführen. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen EDTA-Blut und Serum erkannt werden. Beide Probenmaterialien schienen gleichwertig einsetzbar. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen früherer Arbeiten (Russomando et al. 1992).

1.3 Optimierung

Die Optimierung der Parameter Magnesiumkonzentration und Annealingtemperatur ist essentiell um eine maximale Sensitivität unter den eigenen Arbeitsbedingungen zu erreichen. Zudem kann hierdurch verhindert werden, dass man sich zu nahe an der Toleranzgrenze eines dieser Parameter befindet. In der Nähe einer solchen Grenze kann die PCR abrupt abbrechen. Die 4 PCR-Methoden erwiesen sich als unterschiedlich stabil:

TCZ1+TCZ2:

Diese Methode zeigte ein empfindliches und instabiles Bild. Sie brach bei der Annealingtemperatur von 60° C ab, bei 50° C war sie nicht reproduzierbar positiv, bei 55° C war sie am ehesten reproduzierbar. Die Magnesiumkonzentrationen brachen bei 1.0 mM nach unten hin ab, z. T. auch schon bei 1.5 mM. Auch eine Nachoptimierung ergab keine stabileren Resultate. Ebenso erwies sich diese Methode im Verlauf der weiteren Versuche nicht als robust.

BP1+BP2:

Diese Methode erschien gegenüber den unterschiedlichen Parametern relativ stabil. Die Annealingtemperaturen zwischen 55°-64° C zeigten alle ähnlich gute Ergebnisse. Auch die Magnesiumkonzentrationen zwischen 3 und 10mM waren vergleichbar gut. Lediglich bei Konzentrationen unter 2mM waren keine Amplifikate mehr nachweisbar.

121+122 und 121+89/90 und 91+122:

Diese Methoden mit Ziel-Locus auf den Minicircles waren bei Annealingtemperaturen zwischen 60° und 68° C stabil. Ebenso bei Magnesiumkonzentrationen zwischen 3 und 6mM.

Die unterschiedliche Stabilität der verschiedenen Methoden war bei der Gesamtbewertung im Vergleich zu berücksichtigen.

1.4 Probenvorbereitung

Bei Patienten mit Chagas im chronischen Stadium kommt es zu sehr niedrigen Parasitämien von ≤ 3 -4 Parasiten/ml (Centurion-Lara et al. 1994). Damit sich einige dieser wenigen Trypanosomen auch in dem abgenommenen Blut wiederfinden und diese mittels PCR nachgewiesen werden können, haben sich folgende Überlegungen und Methoden zur Probenentnahme und Probenvorbereitung ergeben:

1. Je größer das Probenvolumen, desto höher die Sensitivität. Verständlich ist dies durch die niedrige Parasitämie bei chronischer Trypanosomiasis (Junqueira et al. 1996).
2. Die Beimengung von 6M Guanidinhydrochlorid zum EDTA-Blut im Verhältnis 1:1 ist eine häufig angewandte Methode zur Verbesserung der Sensitivität (Avila et al. 1991, Wincker et al. 1994, Britto et al. 1994, Britto et al. 1995, Wincker et al. 1996, Junqueira et al. 1996, Kirchhoff et al. 1996, Silber et al. 1997, Gomes et al. 1998, Gomes et al. 1999, Antas et al. 1999). Die theoretischen Hintergründe sind leicht verständlich: Dieses chaotrophe Salz löst weitgehend alle Proteine auf. Die Zellmembran der Parasiten und der humanen Zellen bricht auf, die DNA-beinträchtigenden Enzyme wie Nukleasen etc. werden zerstört. Die DNA der Trypanosomen gelangt somit frei in Lösung. Die mehrfach vorhandenen Kopien einzelner Gene verteilen sich gleichmäßig über das gesamte Probenvolumen. Bei den Minicircles, die bis zu 10.000fach im Kinetoplasten vorhanden sind (Sturm et al. 1988) wird der Vorteil dieser Methode besonders evident. Es liegen nun in einem Milliliter nicht nur 3-4 detektierbare Nukleinsäureabschnitte vor, sondern 30.000-40.000. Aus dieser nun gemischten Lösung ist es daher ausreichend von einem relativ kleinen Volumen die DNA-Isolation vorzunehmen. Die Proben werden hierdurch auch konserviert und bedürfen lediglich einer Kühlung von + 4° C, was unter Feldbedingungen von Vorteil ist.

3. Erhitzen der Blutproben auf 100°C. Das Kochen über 15 min. im Wasserbad hat sich als nützlich erwiesen. Durch das Kochen werden ebenfalls Zellwandproteine zerstört (Britto et al. 1993, Britto et al. 1994, Britto et al. 1995, Wincker et al. 1996, Junqueira et al. 1996, Silber et al. 1997, Gomes et al. 1998, Gomes et al. 1999, Dorn et al. 1999).

1.5 Vergleich zweier Isolationsmethoden mit und ohne Zusatz von Guanidinhydrochlorid

Bei dem Vergleich einer Verdünnungsreihe von *Trypanosoma cruzi* in EDTA-Blut mit Guanidinhydrochlorid und in PBS ohne Guanidinhydrochlorid zeigte sich, dass das Salz weder die DNA-Isolation mit dem QIAGEN Blood Mini Kit, noch die PCR selbst beeinträchtigt. Es wurde, im Gegenteil, eine höhere Sensitivität mit dem Zusatz von Guanidinhydrochlorid erreicht. Dies ist möglicherweise auf die Wirkung des chaotropen Salzes zurückzuführen (siehe Diskussion 1.4). Auch die Blutbestandteile schienen weder einen Einfluss auf die Isolationsmethoden, noch auf die PCR zu haben.

Vergleicht man in diesem Versuch die beiden Isolationsmethoden, so zeigt sich, dass der QIAGEN Blood Mini Kit ähnlich sensitiv wie die PCI-Methode war, wenn hierfür der PBS-Ansatz verwendet wurde, jedoch sensitiver, wenn der EDTA-Guanidinhydrochlorid-Ansatz eingesetzt wurde. Warum die positive Wirkung des Guanidinhydrochlorid bei der PCI-Methode nicht zum tragen kommt, ist unklar. Möglicherweise bestehen zwischen dem Salz und der Isolationsmethode Wechselwirkungen, die sich negativ auswirken.

1.6 Validierung

1.6.1 Allgemein

Die Validierung neuer diagnostischer Methoden wie der PCR zur Erkennung von chronischer Trypanosomiasis weist einige Schwierigkeiten auf. Um eine Methode zu beurteilen, muss die Klinik der Patienten entweder eindeutig sein, der Parasit direkt nachgewiesen werden, oder sie muss mit den bisher üblichen Methoden verglichen werden. Bei Patienten mit chronischer Chagas ist die Klinik oft nicht eindeutig und häufig nicht abgrenzbar gegenüber anderen Erkrankungen wie z.B. der idiopathischen Kardiomyopathie. Auch liegt nur eine extrem niedrige Parasitämie von $\leq 3-4$ Parasiten/ml vor (Centurion-Lara et al. 1994), so dass ein mikroskopischer Nachweis nicht möglich ist. Es bleibt der Vergleich mit anderen diagnostischen Methoden. Der „goldene Standard“, in diesem Fall die Mikroskopie, ist um mehrere 10er Potenzen zu wenig sensitiv. Die Xenodiagnose ist ein aufwendiges, bei Patienten unbeliebtes und langsames diagnostisches Mittel. Sie wurde in mehreren Arbeiten mit der PCR verglichen (Avila et al. 1991, Avila et al. 1993, Wincker et al. 1994, Britto et al. 1994, Junqueira et al. 1996), wobei die PCR eine höhere Sensitivität aufwies. In einer Arbeit waren von den untersuchten Seropositiven 90% mit der PCR ebenfalls positiv, während die Xenodiagnostik nur auf 43% kam (Britto et al. 1994). In einer weiteren Arbeit waren 59.4% der Seropositiven auch PCR-positiv, während die Xenodiagnostik nur auf 35.6% kam

(Junqueira et al. 1996). Bei Wincker et al. (1994) waren immerhin 21 der 24 seropositiven und xenonegativen Patienten mit der PCR positiv. Und bei Avila et al. (1993) ergaben sogar alle 35 seropositiven und xenonegativen ein positives PCR-Amplifikat. Die Xenodiagnose eignet sich folglich nicht als goldener Standard, obwohl sie eine extrem hohe Spezifität aufweist. Auch die Hämokultur wies eine geringere Sensitivität auf als die PCR (Junqueira et al. 1996, Gomes et al. 1999). Die serologischen Methoden wie Hämagglutinations-Inhibitionstest, ELISA und Immunfluoreszenz-Antikörper-Test sind bisher die verlässlichsten. Hier wurden allerdings Kreuzreaktionen mit Leishmanien und anderen Kinetoplastiden gefunden (Vexenet et al. 1996, Chiaramonte et al. 1999). Zudem besteht meist eine lebenslange Immunantwort gegen *Trypanosoma cruzi*, so dass ein chronischer Verlauf der Erkrankung nur anhand der serologischen Parameter nicht zu beweisen ist. Auch der Verlauf und Erfolg einer Therapie kann mit den serologischen Parametern nicht überprüft werden. Bei Britto et al. (1994) blieben nach Behandlung mit Benznidazol von 32 (PCR-positiven) Patienten mit chronischer Chagas nur noch 9 PCR-positiv, während alle 32 noch seropositiv waren. Die Myokardbiopsie kann eine eindeutige Diagnose ergeben, ist jedoch zu aufwendig und zu risikoreich um sie als Routineuntersuchung einzuführen.

1.6.2 Proben aus endemischem und nicht endemischem Gebiet

Qualität der Proben

Die Blutproben wurden Einwohnern des Endemiegebietes in und um Cochabamba abgenommen. Diese Einwohner wiesen zum Teil Symptome einer Chagaserkrankung auf, zum Teil waren sie klinisch völlig unauffällig (siehe Tab. 8-10). Das Ziel war es sowohl seropositive wie auch seronegative Blutproben zu erfassen. Bereits mehrere Autoren beschrieben in der Vergangenheit seronegative Proben, die mit der PCR-Methode positiv waren (Avila et al. 1993, Wincker et al. 1996, Gomes et al. 1999, Salomone et al. 2003). Dieses Phänomen konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Die Blutproben aus nicht endemischem Gebiet waren in Deutschland abgenommen worden.

PCR-Ergebnisse

Die Polymerasekettenreaktion mit den Primern TCZ1+TCZ2 und BP1+BP2 zeigten bei keinem der Blutproben ein trypanosomenspezifisches Amplifikat. Mit dem Primerpaar 121+122 waren vier Fälle positiv (14.8%)

Von den 27 seropositiven Blutproben zeigten sich mit der „nested“ PCR 6 positiv (22.2%). Nur eine der Personen, die mit den PCR-Methoden positiv waren, hatte eine Therapie in der Vergangenheit erhalten (Nr. 26).

Weshalb es zu dieser großen Diskrepanz zwischen serologischen und PCR-Ergebnissen kommt, kann verschiedene Gründe haben:

1. Wie schon erwähnt ist die Klinik der Patienten nicht immer eindeutig einer Trypanosomiasis zuzuordnen. Ob die Patienten, deren Blutproben verwendet wurde, tatsächlich an einer chronischen Verlaufsform der Chagaserkrankung leiden, kann klinisch nicht definitiv bestimmt werden.
2. Eine Seropositivität beweist noch keine chronische Verlaufsform der Erkrankung. Es ist also durchaus möglich, dass diese Patienten eine Infektion mit *Trypanosoma cruzi*

durchgemacht hatten, nun aber keine Erreger mehr im Blut vorhanden sind. In einem solchen Fall wären zwar Antikörper nachweisbar, nicht jedoch die Parasiten-DNA mittels PCR. Auch kommen Kreuzreaktionen mit den in Südamerika ebenfalls endemischen Leishmanien und *Trypanosoma rangeli* vor (Vexenet et al. 1996, Chiaramonte et al. 1999).

3. Die geschätzte Parasitämie bei chronischer Chagas-Erkrankung beträgt $\leq 3-4/\text{ml}$. Es liegen jedoch keine gesicherten Daten über diese Zahlen vor (Centurion-Lara et al. 1994). Es bedarf möglicherweise der Abnahme einer größeren Menge Blut, um sicher Parasiten in der Probe zu erhalten.
4. Das PCR-Protokoll ist möglicherweise nicht sensitiv genug und erkennt nicht jede Parasitämie.

Da die Sensitivität anhand von Verdünnungsreihen bestimmt wurde, sind die Punkte 3 und 4 eher unwahrscheinlich.

Zu 1.: Da die Patienten seropositiv waren ist zumindest eine vorangegangene Infektion sicher. Am wahrscheinlichsten ist, dass bei den Patienten keine Parasitämie mehr vorliegt und die positive Serologie auf früherer Infektion beruht.

Keiner der Protokolle zeigte positive Amplifikate bei seronegativen Blutproben. Es gab folglich keine falsch-positiven Ergebnisse. Die Spezifität ist demnach gut.

2. Vergleich mit anderen Untersuchungen:

2.1 PCR-Protokolle

TCZ1+TCZ2 (repetitive nDNA):

Dieses Protokoll zeigte eine Sensitivität von 0.01-0.001 Parasiten/ μl in PBS und 0.1 Parasiten/ μl in EDTA-Blut. Allerdings waren die Ergebnisse schlecht reproduzierbar und hat sich in der vorliegenden Studie als nicht robust erwiesen. Virrera et al. (2003) berichten ebenfalls über mangelnde Reproduzierbarkeit dieser Methode, die durch Reduktion der Taq-Polymerase-Konzentration (auf ca. 30%) verbessert werden konnte. In früheren Arbeiten wurde zum Teil über eine hohe Sensitivität berichtet. So berichten Moser et al. (1998) über die Amplifikation von DNA-Äquivalenten von 0,5 Parasiten. Russomando et al. (1992) konnten sogar DNA-Äquivalente von 0.25 Parasiten pro Reaktionsansatz nachweisen. Demgegenüber konnte Kirchhoff et al. (1996) lediglich 1 Parasiten/25 μl und Ribeiro-Dos-Santos (1999) sogar nicht einmal die Konzentration von 10 Parasiten/ μl mit diesem Protokoll detektieren.

Mit diesen Primern konnten Genabschnitte anderer Trypanosomatidae, wie *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma brucei brucei* und verschiedene *Leishmania* species nicht amplifiziert werden. Auch in früheren Untersuchungen wurden keine Amplifikationen mit *Leishmania mexicana mexicana*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma brucei gambiense*, und *Trypanosoma congolense* gefunden (Moser et al. 1989, Russomando et al. 1992). Die Spezifität der Methode scheint demnach sehr gut zu sein. Bei 27 seropositiven Bolivianern konnten bei keinem ein trypanosomenspezifisches Amplifikat gefunden werden. Die Sensitivität scheint eher gering.

BP1+BP2 (F29-Flagellin-nDNA):

Dieses Protokoll mit einem Zielgen auf der Kern-DNA erreichte eine Sensitivität von 1 Parasiten/ μ l in PBS (1000 Parasiten/ml) und 10 Parasiten/ μ l in EDTA-Blut. Dies steht in deutlichem Unterschied zu früheren Ergebnissen. Silber et al (1997) konnten 5 Parasiten/ml noch nachweisen.

Es entstanden keine Amplifikate bei dem Versuch mit *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani infantum*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei brucei* und *Trypanosoma rangeli* Stamm α +17. Lediglich bei *Trypanosoma rangeli* Stamm Q1140 zeigte sich ein Amplifikat, das jedoch etwas kleiner erscheint. Silber et al. machten ähnliche Erfahrungen: Sie fanden keine Reaktion bei *Leishmania braziliensis*, jedoch eine geringfügig kleinere Bande bei *Trypanosoma rangeli* (615 bp) (Silber et al. 1997). Die Spezifität ist demnach gut. Von den 27 seropositiven Blutproben konnten mit diesem Primerpaar bei keiner trypanosomenspezifische Amplifikate gefunden werden. Die Sensitivität ist daher als gering einzustufen.

121+122 (kDNA):

Dieses Protokoll zeigte eine Sensitivität von 0.001 Parasiten/ μ l (1 Parasit/ml) in PBS und 0.1/ μ l in EDTA-Blut. In früheren Untersuchungen konnten Sturm et al. (1988) mit den Primern S35/S36, (sie entsprechen den 121/122 weitgehend und weisen nur im S36 ein etwas kürzeres Ende auf als 122, ergeben jedoch das gleiche Produkt von 330 bp) 10 Parasiten/100 μ l nachweisen (100 Parasiten/ml). Avila et al. (1991) gelang sogar mit dem Zusatz von Guanidinhydrochlorid nach der Probenentnahme der Nachweis über 1 Parasiten/20ml. Kirchhoff et al. (1996) detektierten 3 Parasiten/25 μ l (120 Parasiten/ml). Ribeiro-Dos-Santos konnte bei einer Konzentration von 10 Parasiten/ml mit dieser PCR-Methode keine Amplifikate nachweisen.

Bei den getesteten anderen Trypanosomatidae wie *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani infantum*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* und *Trypanosoma brucei brucei* wurden mit diesen Primern keine Genabschnitte amplifiziert. Der Ansatz mit *Trypanosoma rangeli* zeigte ein *Trypanosoma cruzi*-typisches Amplifikat mit einer Länge von 330 bp. *T. rangeli*, ein naher Verwandter von *T. cruzi* der auch in Südamerika beheimatet ist, ist zwar nur tierpathogen, kann aber auch Menschen infizieren. Eine Abgrenzung von der harmlosen Infektion mit *T. rangeli* zu der Chagas-Krankheit, ist wichtig. Sturm et al. konnten 1988 keine Amplifikationen bei *Trypanosoma rangeli* finden. Es wurde deshalb dieser Tatbestand genauer untersucht, indem zwei verschiedene Laborstämme von *T. rangeli* (α +17 und Q 1140) für den Versuch verwendet wurden. Beide Stämme zeigten ein Amplifikat mit einer Länge von ca. 330 Basenpaaren. Die Spezifität ist somit eingeschränkt. 4 der 27 seropositiven Blutproben zeigten positive Amplifikate. Damit ist die Sensitivität höher als bei einem Zielort auf der Kern-DNA.

121+89/90, 91+122 (kDNA):

Die nested PCR konnte in künstlich kontaminierten Proben eine Konzentration von 0.001 Parasiten/ μ l (1 Parasit/ml) in PBS und 0.1/ μ l in EDTA-Blut detektieren. Die gleiche Sensitivität konnte schon in früheren Arbeiten festgestellt werden (Ribeiro-Dos-Santos 99).

Auch mit diesen Primern wurden keine Genabschnitte von *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani infantum*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* und *Trypanosoma brucei brucei* amplifiziert. Aber auch hier reagierten beide Laborstämme von *T. rangeli* (α +17 und Q1140) positiv. Auch hier ist die Spezifität nur mit Einschränkung gut. 6 der 27 seropositiven Blutproben zeigten ein trypanosomenspezifisches Produkt. Diese kDNA-nested PCR ist folglich die sensitivste der 4 PCR-Protokolle.

3. Schlussfolgerungen

1. Die höchste **Sensitivität** zeigte die nested PCR mit Amplifikation eines 289 bp langen Minicircle-kDNA-Abschnittes bis zu einer Konzentration von 0,001 Parasiten/ μ l (1 Parasit/ml).
2. Die **Spezifität** von TCZ1+TCZ2 (repetitive nDNA) und BP1+BP2 (F29-Flagellin) war hoch. Sie amplifizierten keine Genabschnitte von anderen Trypanosomatidae. Das Primerpaar 121+122 (kDNA) und die Primerpaare der nested PCR (kDNA) zeigten beide Amplifikate bei *Trypanosoma rangeli*, in der nested PCR auch bei *Trypanosoma brucei brucei*, nicht jedoch bei anderen Trypanosomatidae.
3. **Robustheit:** Die 4 PCR-Protokolle erwiesen sich als unterschiedlich stabil und reproduzierbar. Die Methode mit dem Primerpaar TCZ1+TCZ2 erwies als instabil und ergab Amplifikate nur in einem sehr engen Toleranzbereich der Arbeitsbedingung. Die anderen drei Methoden erwiesen sich als robust und zeigten stets reproduzierbare Ergebnisse.
4. **Probenvorbereitung und DNA-Isolation:** 6M Guanidinhydrochlorid hat sich als Zusatz zu den Blutproben bewährt. Neben der Wirksamkeit als Stabilisator (bes. für Felduntersuchungen) wird die Sensitivität verbessert. Der QIAGEN Blood Mini Kit als Isolationsmethode zeigte eine etwas höhere Sensitivität als die Phenol-Chloroform-Isoamyl-Methode.
5. **Seropositive Patientenproben** aus einem Endemiegebiet: Die nested PCR zum Nachweis von kDNA erwies sich als sensitivste Methode. 6 der 27 seropositiven Proben zeigten ein Amplifikat (22,2%). Die Methode mit den Primern 121+122 (kDNA) amplifizierte bei 4 der 27 Proben die entsprechende Gensequenz (14,8%).
6. **Kontroll-Proben:** Mit allen 4 PCR-Prokollen ergaben sich keine Amplifikationen bei seronegativen bzw. serologisch grenzwertig Proben aus einem Endemiegebiet (n=17) und seronegativen Proben aus einem nicht-endemischem Gebiet (n=30). Insgesamt ist die Spezifität aller angewandten PCR-Methoden hoch.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnostik der ausschließlich in Lateinamerika vorkommenden amerikanischen Trypanosomiasis (Chagaskrankheit) bereitet vor allem in den chronischen Infektionsstadien (Latenz, chronische Erkrankung) erhebliche Probleme, da in der Regel eine extrem niedrige Parasitämie vorliegt. Der in der akuten Phase bedeutsame Parasitennachweis gelingt in den Spätstadien häufig nicht, trotz Anwendung von Anreicherungsverfahren, Kultur und Xenodiagnose (Nachweis aus am Patienten angesetzten Überträgerwanzen). Zwar sind im chronischen Stadium nahezu regelmäßig spezifische Antikörper nachweisbar, die Aussagekraft der Immundiagnostik ist jedoch eingeschränkt. So bleibt die Immunantwort oft lebenslang positiv, auch wenn die Infektion spontan oder nach Chemotherapie ausgeheilt ist. Zudem gibt es falsch-positive Ergebnisse, z. B. aufgrund von Kreuzreaktionen mit Leishmanien und anderen Trypanosomen (z. B. *Trypanosoma rangeli*).

Der sichere Nachweis einer Infektion in den Spätstadien ist jedoch von erheblicher Bedeutung. So kann durch eine rechtzeitige Therapie die Manifestation der meist intractablen Spätstadien verhindert bzw. reduziert werden. Zudem wäre es bedeutsam chronische Infektionen bei seropositiven Frauen mit Kinderwunsch und bei Schwangeren zu erkennen, da auch asymptomatische Schwangere die Infektion auf das Kind übertragen können. Schließlich kommt in Hochendemiegebieten ein erheblicher Teil der Bevölkerung als Blutspender nicht in Frage, da alle Seropositiven ausgeschlossen werden, auch wenn offen bleibt ob tatsächlich eine chronische Infektion vorliegt.

Zum Nachweis der extrem niedrigen Parasitämien im chronischen Stadium scheint die Polymerasekettenreaktion (PCR) besonders vielversprechend. Mittlerweile sind bereits mehrere PCR-Methoden zum Nachweis von *Trypanosoma cruzi* entwickelt und mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen in der Diagnostik und Therapiekontrolle bei zahlenmäßig noch sehr begrenzten Patientenkollektiven eingesetzt worden. Die verschiedenen PCR-Protokolle beruhen auf dem Nachweis verschiedener Genabschnitte der nukleären DNA (nDNA) und der in hoher Kopienzahl vorliegenden Kinetoplasten-DNA (kDNA). Zudem wurden unterschiedliche Methoden zur Stabilisierung und Verarbeitung von Proben publiziert einschließlich solcher unter einfachen Feldbedingungen, wie sie in den Hauptverbreitungsgebieten vorherrschen.

Ziel dieser Arbeit war es die wichtigsten dieser PCR-Methoden unter experimentellen Bedingungen zu vergleichen und eine Methode zu identifizieren, die eine hohe Sensitivität und eine hohe Spezifität aufweist und robust funktioniert. Anschließend sollte eine Validierung mit Proben aus einem Endemiegebiet erfolgen. Ein weiteres Ziel war dabei, Methoden der Nukleinsäuren-Isolierung und -Konservierung unter Feldbedingungen zu untersuchen und zu optimieren.

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden 4 verschiedene PCR-Methoden optimiert und unter experimentellen Bedingungen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Robustheit verglichen:

- (1) eine PCR mit den Primern TCZ1/TCZ2 zur Amplifikation eines konservierten nDNA-Abschnitts von 188 Basenpaaren (bp) einer repetitiven (ca. 700 Kopien/Zelle) Sequenz mit derzeit noch unklarer Funktion.
- (2) eine PCR mit den Primern BP1+BP2 zur Amplifikation eines hochkonservierten nDNA-Abschnitts von 692 bp des F29-Gens (Flagellin).
- (3) eine PCR mit den Primern 121/122 zur Amplifikation an zwei konstanten Regionen der kDNA, die eine variable kDNA-Region umschließen (330 bp).

- (4) eine nested PCR mit den Primerpaaren 121+89/90 und 91+122 zur Amplifikation eines 289 bp Abschnitts der kDNA (identische Teilregion der PCR-Methode Nr. 3)

Die höchste Sensitivität für *T. cruzi* zeigte unter experimentellen Bedingungen die nested PCR (Methode Nr. 4) mit einem spezifischen Amplifikationsprodukt bis herab zu einer Konzentration von 0,001 Parasiten/ μ l (1 Parasit/ml).

Die Spezifität der PCR-Protokolle TCZ1/2 (repetitive nDNA) und BP1/2 (F29-Flagellin) war hoch. Sie amplifizierten keine Genabschnitte von anderen Trypanosomatidae, mit Ausnahme eines deutlich differenten 615-620 bp-Amplifikats für *T. rangeli* beim BP1/2-Protokoll. Demgegenüber zeigten sowohl das 121/122-kDNA-Protokoll wie die kDNA-nested PCR nicht von *T. cruzi* differenzierbare Amplifikate mit *T. rangeli* und in der nested PCR auch mit *T. brucei brucei*, nicht jedoch bei verschiedenen *Leishmania*-Arten.

Hinsichtlich ihrer Robustheit erwiesen sich die 4 PCR-Protokolle als unterschiedlich stabil und reproduzierbar. Das TCZ1/2-Protokoll war nicht stabil und ergab Amplifikate nur in einem sehr engen Toleranzbereich der Arbeitsbedingungen. Die anderen drei Methoden erwiesen sich als robust und zeigten im optimalen Arbeitsbereich stets reproduzierbare Ergebnisse. Weiterhin wurde 6M Guanidinhydrochlorid (G-HCl) als Zusatz für die Stabilisierung von Blutproben untersucht. Im Vergleich zu PBS wurde die Sensitivität der PCR-Protokolle mit G-HCl verbessert. Beim Vergleich verschiedener Methoden zur DNA-Isolation zeigte der QIAGEN Blood Mini Kit eine etwas höhere Sensitivität als die Phenol-Chloroform-Isoamyl-Methode.

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurden Blutproben von 44 Patienten mit anamnestic diagnostizierter Chagaskrankheit in der Umgebung von Cochabamba, Bolivien, einem Hochendemiegebiet der Chagaskrankheit abgenommen. Diese wurden mit 6M Guanidinhydrochlorid stabilisiert und zur Untersuchung nach München gebracht. Die nested PCR zum Nachweis von kDNA erwies sich als sensitivste Methode zum Nachweis einer Parasitämie, bei 6 der 27 seropositiven Proben (22,2%) konnte ein *T. cruzi*-spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden. Das 121/122-kDNA-Protokoll amplifizierte bei 4 der 27 Proben eine *T. cruzi*-spezifische Sequenz (14,8%). Mit Ausnahme eines Falles waren alle PCR-positiven Patienten bisher nicht therapiert worden. Mit den beiden nDNA-Protokollen (TCZ1/2- und BP1/2- Protokoll) ergab sich bei keiner dieser Proben ein Amplifikat. Bei den serologisch negativen oder grenzwertigen Patientenproben konnten mit keinem der 4 PCR-Protokolle ein Amplifikat nachgewiesen werden. Zudem wurden noch 30 Blutproben von gesunden Erwachsenen aus Deutschland untersucht. Hierbei zeigten sich ebenfalls keine Amplifikate bei den 4 Protokollen.

Zusammengefaßt ergaben die Untersuchungen, daß die PCR-Protokolle zum Nachweis von kDNA am sensitivsten *Trypanosoma cruzi* im Blut nachweisen können; mit besonders hoher Sensitivität der nested PCR-Methode. Dies beruht wohl auf der hohen Kopienzahl der amplifizierten Zielsequenz in den kDNA-Minicircles (ca. 10.000 Kopien/Zelle) im Vergleich zu den untersuchten nDNA-Zielsequenzen. Allerdings werden von den kDNA-Protokollen auch andere Trypanosomen wie *T. rangeli* und *T. brucei brucei* (nur bei der nested PCR) miterfasst, im Gegensatz zu den hochkonservierten Zielsequenzen der untersuchten nDNA-Protokolle.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- ANTAS P. R., MERDRANO-MERCADO N., TORRICO F., UGARTE-FERNANDES R., GOMEZ F., CORREA OLIVERA R., CHAVES A. C. L., ROMANHA A. J., and ARAUJO-JORGE T. C. (1999): Early, intermediate and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61(2)**, 308-314
- AVILA H. A., SIGMAN D. S., COHEN L. M., MILLIKAN R. C., and SIMPSON L. (1991): Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **48**, 211-222
- BITTENCOURT A.L. (2000): Transmissão vertical da doença de Chagas. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, eds. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 16–20.
- BRITTO C., CARDOSO M. A., WINCKER P., MOREL C. M. (1993): A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) –based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88(1)**, 171-2
- BRITTO C., CARDOSO M. A., MONTEIRO VANNI C. M., HASSLOCHER-MORENO A., XAVIER S. S., OELEMANN W., SANTORO A., PIRMEZ C., MOREL C. M. and WINCKER P.(1994): Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in Human Blood Samples as a Tool for Diagnosis and Treatment Evaluation. *Parasitology* **110**, 241-14
- BRITTO C., CARDOSO M. A., RAVEL C., SANTORO A., BORGES PEREIRA J., COURA J. R., MOREL C. M. and WINCKER P. (1995): Parasite Detection and Strain Discrimination in Chronic Chagasic Patients from Northeastern Brazil Using PCR Amplification of Kinetoplast DNA and Nonradioactive Hybridization. *Experimental Parasitology* **81**, 462-471
- CAMARGO M. (1966): Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical Modification employing preserved Culture Forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide Test. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo* **8(5)**, 227-234
- CHIARAMONTE M. G., FRANK F. M., FURER G. M., TARANTO N. J., MARGNI R. A., MALCHIODI E. L. (1999): Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop.* **72(3)**, 295-308.
- CHOU Q., RUSSELL M., BIRCH D. E., RAYMOND J., BLOCH W. (1992): Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20(7)**, 1717-23.
- DANG C., JAYASENA S. D. (1996): Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *J. Mol. Biol.* **264(2)**, 268-78

- DEGRAVE W., FRAGOSO S. P., BRITTO C., VAN HEUVERSWYN H., KIDANE G., CARDOSO M. A., MUELLER R. U., SIMPSON L., and MOREL C. M. (1988): Peculiar Sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **27**, 63-70
- DORN P. L., ENGELKE D., RODAS A., ROSALES R., MELGAR S., BRAHNEY B., FLORES J., MONROY C. (1999): Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60(5)**, 740-745
- FELGNER P.,(1978): Stepless antibody determination with the stick-ELISA technique. Results expressed as multiple of normal activity (MONA). *Zentralbl. Bakteriol.* **242(1)**, 100-5
- GOMES M. L., MACEDO A. M., VAGO A. R., PENA S. D., GALVAO L. M., CHIARI E. (1998): *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol* **88(1)**, 28-33
- GOMES M., GALVAO L., MACEDO M., PENA S., and CHIARI E. (1999): Chagas' Disease Diagnosis: Comparative Analysis of Parasitologic, Molecular and Serologic Methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60(2)**, 205-210
- GONZALES A., PREDIGER E., HUECAS M. E., NOGUEIRA N., LIZARDI P. M. (1984): Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81 (1)**, 3356-60
- INNIS M. A., GALFAMD D. H., WHITE T. J., (1990): PCR Protocols. Academic Press Inc., San Diego
- JUNQUEIRA A., CHIARI E., WINCKER P. (1996): Comparison of the Polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **90**, 129-132
- KIRCHHOFF L., VOTAVA J., OCHS D., and MOSER D. (1996): Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1171-1175
- KNECHER L., ROJKIN L., CAPRIOTTI G., and LORENZO L. (1994): Chagas' disease Screening in Blood Bank employing Enzyme Immunoassay. *International Journal of Parasitology* **24 (2)**, 207-211
- LANAR D. E., LEVY L. S., MANNING J. E. (1981): Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3(5)**, 327-41
- MORGAN J. F., MORTON H. J., PARKER R. C. (1950): Nutrition of animal cells in tissue culture I. Initial studies on a synthetic Medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73 (1)**, 1-8

- MOSER D. R., KIRCHHOFF L. V., and DONELSON J. E. (1989): Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **27**(7), 1477-1482
- NUOVO G. J., GALLERY F., MACCONNELL P., BECKER J., BLOCH W. (1991): An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Pathol.* **139**(6), 1239-44.
- RIBEROS-DOS-SANTOS G., NISHIYA A. S., SABINO E. C., CHAMONE D. F., and SÁEZ-ALQUÉZAR A. (1999): An improved, PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **29** (7) 689-694
- RUSSOMANDO G., FIGUEREDO A., ALMIRÓN M., SAKAMOTO M. and MORITA K. (1992): Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Serum. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2864-2868
- RUSSOMANDO G., DE ARIAS A., ALMIRÓN M., FIGUEREDO A., FERREIRA M. and MORITA K. (1996): *Trypanosoma cruzi*: Polymerase Chain Reaction-Based Detection in Dried Feces of *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology* **83**, 62-66
- RUSSOMANDO G., TOMASSONE DE M., GUILLEN DE I., ACOSTA N., VERA N., ALMIRÓN M., CANDIA M., CALCENA M., FIGUEREDO A. (1998): Treatment of Congenital Chagas' Disease Diagnosed and Followed up by the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**(3), 487-491
- SALOMONE OA, BASQUIERA AL, SEMBAJ A, AGUERRI AM, REYES ME, OMELIANUK M, FERNANDEZ RA, ENDERS J, PALMA A, BARRAL JM, MADOERY RJ (2003): *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Infect Dis* **9**, 1558-1562
- SAUERTEIG E., WEINKE T., (2000): „Amerikanische Trypanosomiasis (Chagas-Krankheit)“. In: LANG W., LÖSCHER T. (Hrsg.): *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 3. Auflage. München: Thieme. 59-67
- SILBER A. M., BÚA J., PORCEL B. M., SEGURA E. L., and RUIZ A. M. (1997): *Trypanosoma cruzi*: Specific Detection of Parasites by PCR in Infected Humans and Vectors Using a Set of Primers (BP1/BP2) Targeted to a Nuclear DNA Sequence. *Experimental Parasitology* **85**, 225-232
- SOLARI A, ORTIZ S, SOTO A, ARANCIBIA C, CAMPILLAY R, CONTRERAS M, SALINAS P, ROJAS A, SCHENONE H (2001): Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother* **48**, 515-519
- STURM N. R., DEGRAVE W., MOREL C., SIMPSON L. (1988): Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 205-214

- VEXENAT ADE C., SANTANA J. M., TEIXEIRA A. R. (1996): Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **38**, 177-85
- VIRREIRA M, TORRICO F, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, SOLANO M, CARLIER Y, SVOBODA M. (2003): Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 574-582
- WINCKER P., BRITTO C., BORGES PEREIRA J., CARDOSO M. A., OELEMANN W., MOREL C. M. (1994): Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51 (6)**, 771-777
- WINCKER P., TELLERIA J., BOSSENO M. F., CARDOSO M. A., MARQUES P., YAKSIC N., AZNAR C., LIEGEARD P., HONTEBEYRIE M., NOIREAU F., MOREL C. M. and BRENIERE S. F. (1996): PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* **114**, 367-373
- WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF CHAGAS DISEASE (1991): „Epidemiology. Geographical distribution and prevalence of human infection.“ In: WHO Expert Committee: Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO technical report series – 811. Geneva: World Health Organisation. 27-31

VIII ANNEX

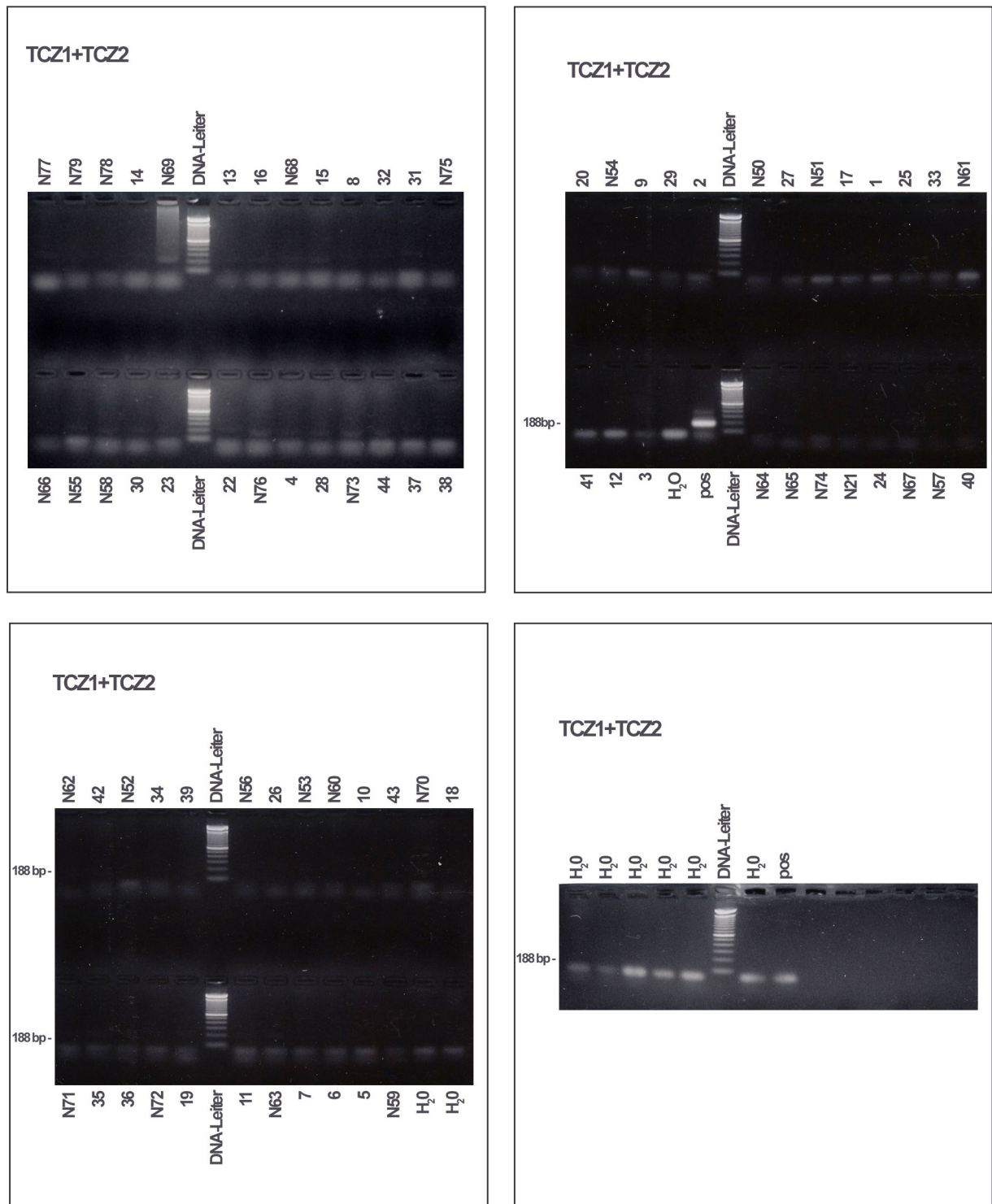


Abb. 18-21: Proben aus einem endemischen Gebiet (Cochabamba, Bolivien) Nr.1-44 und Proben aus nicht-endemischem Gebiet (Deutschland) Nr. N50-N79 wurden mit der PCR mit dem Primerpaar TCZ1+TCZ2 untersucht (siehe Kapitel IV.5). H₂O=Negativkontrolle, pos=Positivkontrolle.

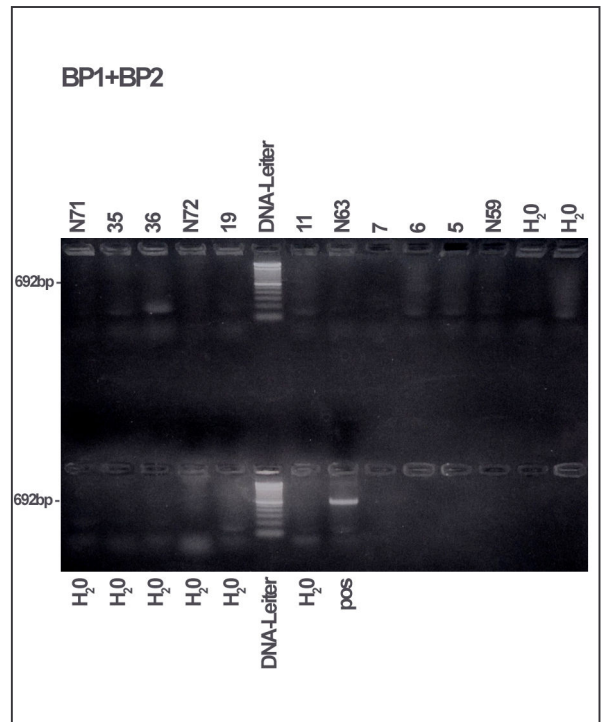
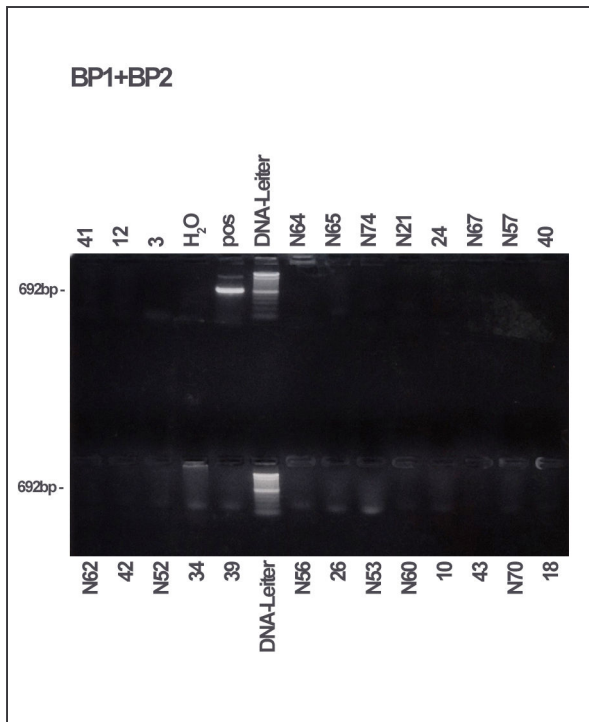
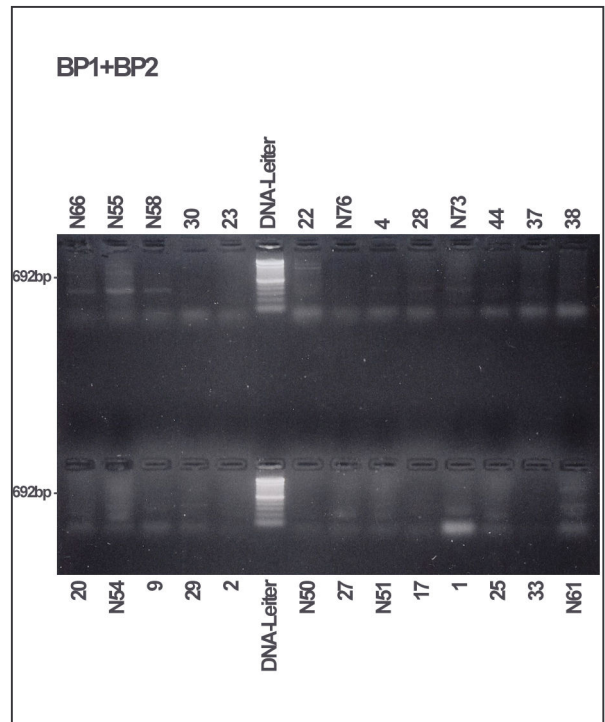
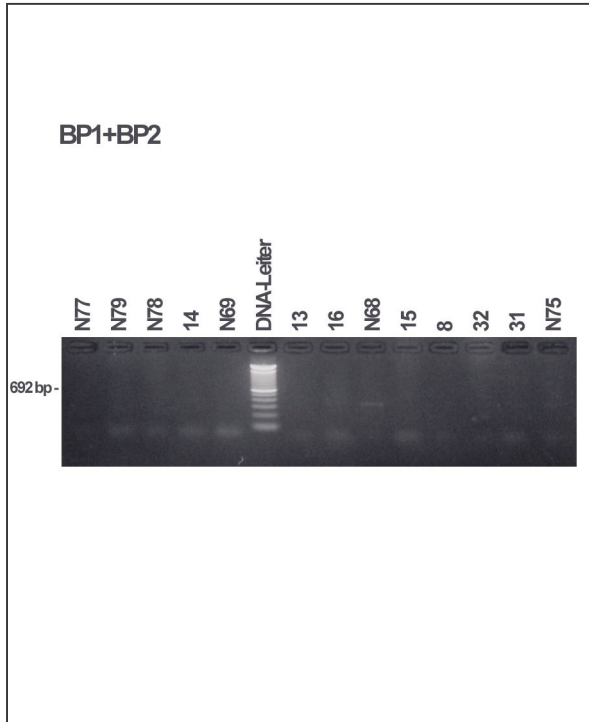


Abb. 22-25: Proben aus einem endemischen Gebiet (Cochabamba, Bolivien) Nr.1-44 und Proben aus nicht-endemischem Gebiet (Deutschland) Nr. N50-N79 wurden mit der PCR mit dem Primerpaar BP1+BP2 untersucht (siehe Kapitel IV.5). H₂O=Negativkontrolle, pos=Positivkontrolle.

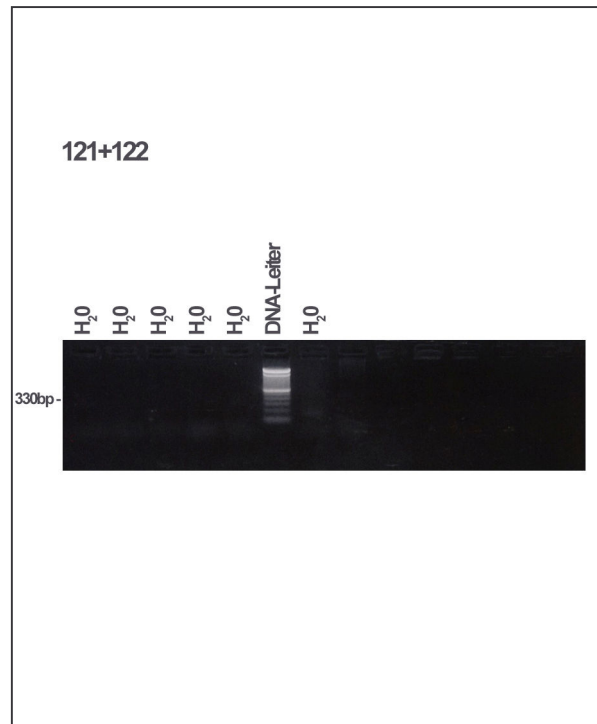
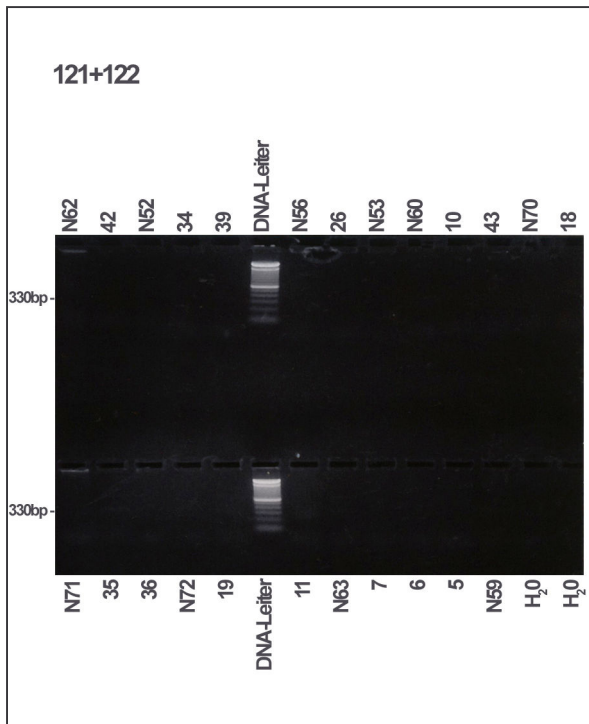
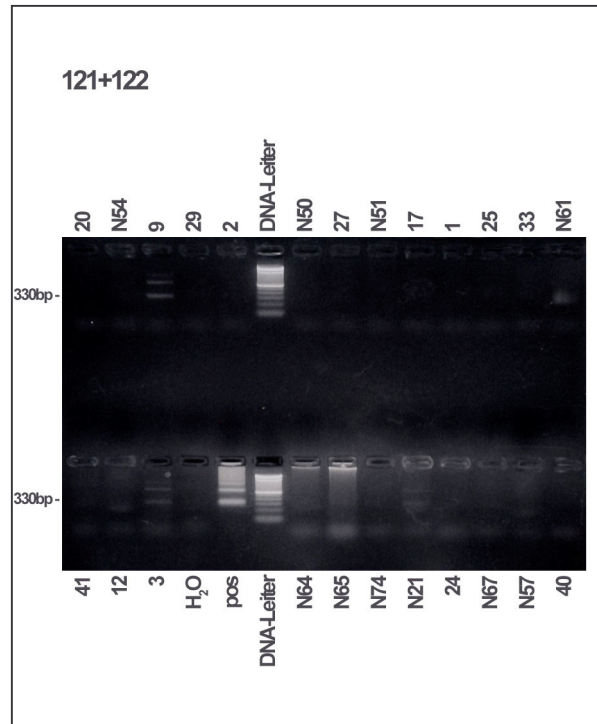
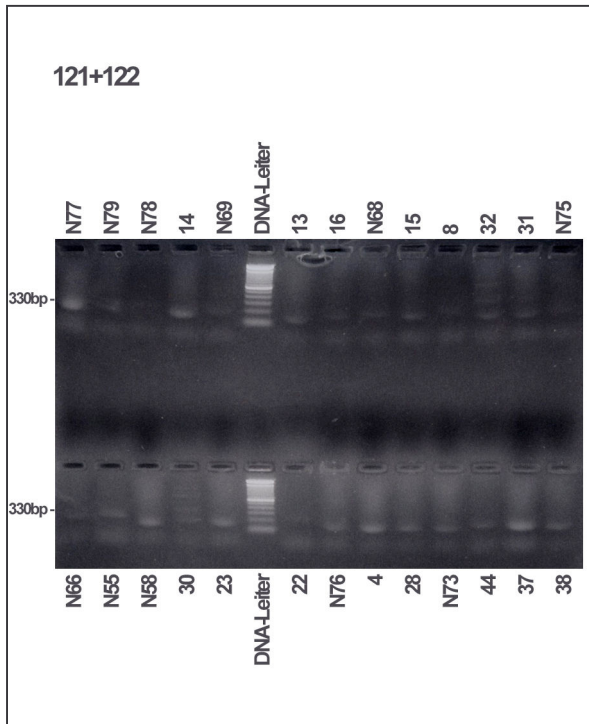


Abb. 26-29: Proben aus einem endemischen Gebiet (Cochabamba, Bolivien) Nr.1-44 und Proben aus nicht-endemischem Gebiet (Deutschland) Nr. N50-N79 wurden mit der PCR mit dem Primerpaar 121+122 untersucht (siehe Kapitel IV.5). H₂O=Negativkontrolle, pos=Positivkontrolle.

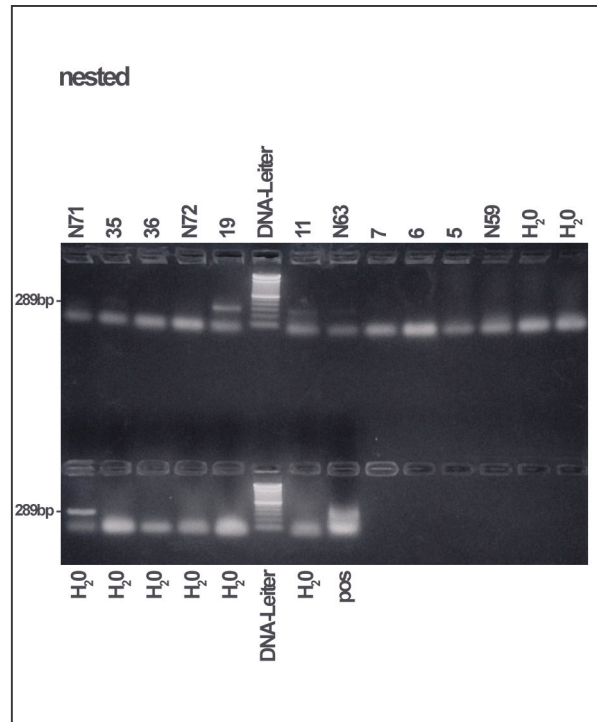
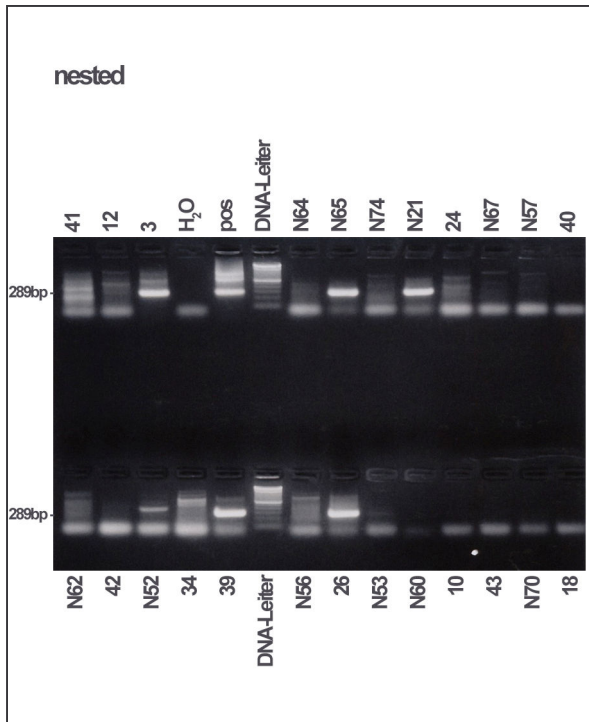
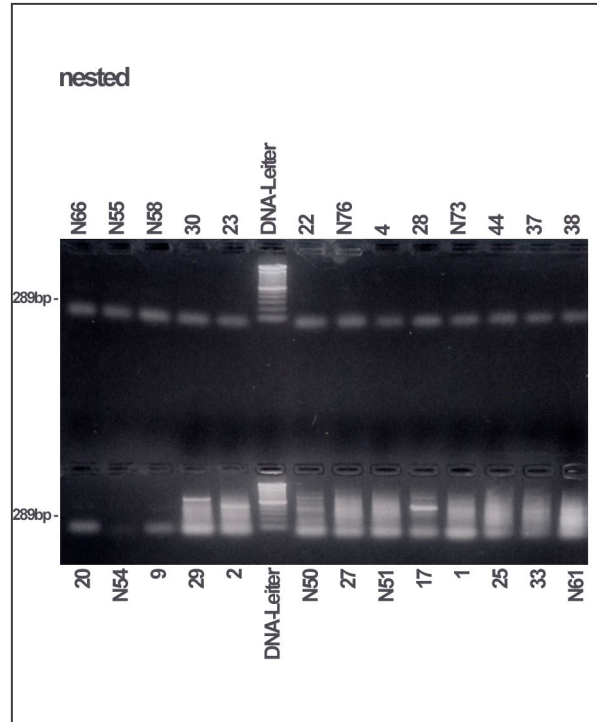
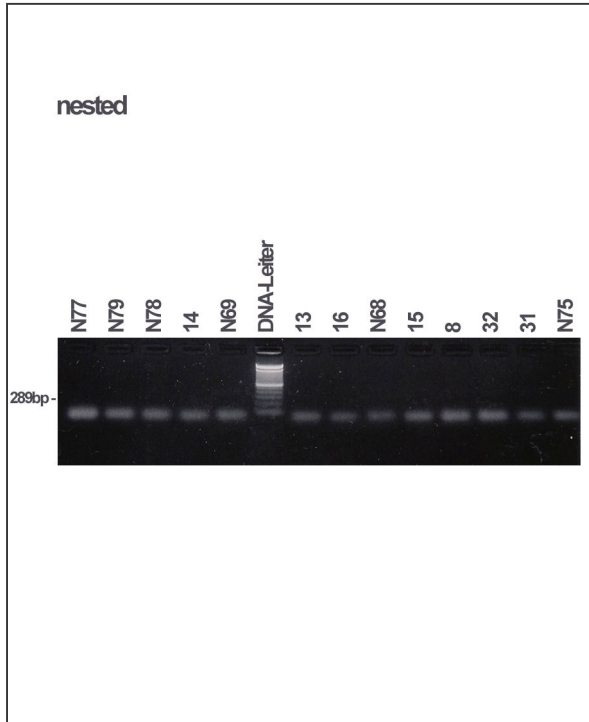


Abb. 30-33: Proben aus einem endemischen Gebiet (Cochabamba, Bolivien) Nr.1-44 und Proben aus nicht-endemischem Gebiet (Deutschland) Nr. N50-N79 wurden mit der nested PCR mit den Primerpaaren 121+89/90 und 91+122 untersucht (siehe Kapitel IV.5). H₂O=Negativkontrolle, pos=Positivkontrolle.

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Löscher bedanken. Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und Hinweise zur Durchführung und Weiterführung der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Rinder für die technische Einführung in die PCR-Methode und die freundliche Hilfe bei Problemlösungen.

Ich danke auch besonders Frau Erna Fleischmann für die großartige Hilfe beim Anzüchten der Kulturen sowie dem Decodieren der Blutproben für die Validierung.

Bei Frau Dr. Maria Eugenia Rodriguez möchte ich mich herzlich bedanken für die äußerst engagierte Hilfe in Cochabamba, Bolivien. Ohne sie wäre ein großer Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke hier auch Frau Dr. Miriam Calderon, die den Kontakt zur Caja Nacional de Seguridad Social in Cochabamba herstellte.

Frau Dr. Eichenlaub, Frau Angelika Thomschke, Frau Gabriele Peyerl-Hoffmann und Frau Esther Heinzmann danke ich für die vielseitige Hilfe im Labor.

Allen genannten und nicht genannten Mitarbeitern des Instituts danke ich für die wundervolle Arbeitsatmosphäre und die freundliche Hilfsbereitschaft.

CURRICULUM VITAE

Hubert, Jan Gordian

05.06.1974	geboren in München
1980-1993	Rudolf-Steiner-Schule München-Schwabing
Juli 1993	Abitur
Sept1993-Nov1994	Zivildienst (HPT Lebenshilfe e.V.)
Aug. 1995-Juli 1996	Schauspielschule East15 London
Okt. 1996-Sept.1999	Medizinstudium an der HU-Berlin
Aug. 1998	Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1999	1. Staatsexamen
Okt. 1999-Aug 2000	Medizinstudium in Lausanne (Université de Lausanne/UNIL) mit einem Stipendium von ERASMUS
Okt 2000-	Studium an der LMU-München
April 2002	2. Staatsexamen
April 2003	3. Staatsexamen
seit Sept. 2003	AiP in der Abteilung für Neurologie im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching

Praktika:	Allgemeinchirurgie KKH Wolfratshausen	4Wochen
	Pädiatrie CHUV-Lausanne	4 Wochen
	Neurochirurgie CHUV-Lausanne	2 Wochen
	Tropenmedizin Tropeninstitut München	4 Wochen
	Neurologie KH Bogenhausen	4 Wochen
	Neurochirurgie Großhadern München	8 Wochen
	Allgemeinchirurgie Altnagelvin Nordirland	8 Wochen
	Neurologie KM-Harlaching	16 Wochen
	Innere Medizin KM-Harlaching	16 Wochen