

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Entwicklung von Rekombinase-  
Polymerase-Amplifikations-Verfahren  
zum schnellen Nachweis  
von *Leishmania spp.***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Chiheb Louizi**

aus

Sfax, Tunesien

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in Prof. Dr. rer. nat. C. G. K. Lüder

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. T. Buhl

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. rer. nat. C. G. K. Lüder

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. T. Buhl

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 22.03.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Entwicklung von Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Verfahren zum schnellen Nachweis von *Leishmania spp.*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 20.02.2022

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Leishmanien .....	1
1.1.1 Geschichte.....	1
1.1.2 Ätiologie, Epidemiologie und Klassifikation .....	2
1.1.3 Krankheitsbilder.....	3
1.1.4 Vektor und Übertragungszyklus .....	6
1.1.5 Genetik und Zellbiologie .....	8
1.1.6 Therapieansätze .....	8
1.2 Nachweismethoden.....	11
1.3 Isothermale Nachweisverfahren und PCR.....	13
1.4 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation .....	15
1.5 Mobiles Kofferlabor .....	18
1.6 Zielsetzung .....	19
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	20
2.2 Chemikalien, Puffer und Enzyme.....	21
2.3 Computerprogramme .....	21
2.4 DNA-Standard-Sequenzen.....	22
2.5 Primer und Sonden.....	22
2.6 gDNA-Proben .....	24
2.7 Bestimmung der Nachweisgrenze anhand der Parasitenmenge .....	26
2.8 Patientenmaterial .....	26
2.9 RPA-Reaktionsablauf.....	27
2.10 Multiplex-RPA-Test von <i>Leishmania</i> 18S rRNA- und <i>Leishmania</i> kDNA-RPA.....	28
2.11 <i>Leishmania</i> Cpb-RPA-Test in Gegenwart von Block-Primern .....	28
2.12 PFIMI- und EcoO109I-Restriktionsenzyme .....	29
2.13 CRISPR/Cas .....	29
2.14 Semi-logarithmische- und Probit-Regressionsanalyse.....	30
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1 Ergebnisse der Primer-Kombinationen.....	32
3.2 Analytische Sensitivität.....	34
3.3 Nachweisgrenze von Parasiten mittels <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA.....	39

---

3.4	Spezifität der RPA-Nachweise .....	40
3.5	Differenzierung der verschiedenen <i>Leishmania spp.</i> durch <i>Leishmania</i> Cpb-RPA .....	43
3.6	Kreuzreaktionen mit anderen Pathogenen.....	44
3.7	Klinische Validierung des <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA-Nachweises mit archivierten Patienten-Proben.....	46
3.8	Multiplex-RPA-Test von <i>Leishmania</i> 18S rRNA- und <i>Leishmania</i> kDNA-RPA.....	48
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1	Vergleich zwischen Cpb-, 18S rRNA- und kDNA-Zielgenen von <i>Leishmania</i> .....	52
4.2	Vergleich zwischen <i>Leishmania</i> 18S rRNA- und <i>Leishmania</i> Cpb-RPA .....	53
4.3	Vergleich zwischen LAMP und RPA.....	53
4.4	Optimierung und Ausblick .....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie und Endemiegebiete von den wichtigsten <i>Leishmania</i> -Spezies.....	3
Abbildung 2: Klinische Manifestationen von unterschiedlichen Leishmaniosen .....	5
Abbildung 3: Lebenszyklus der Leishmanien.....	7
Abbildung 4: Amastigote Leishmanien in Makrophagen nach Giemsa-Färbung.....	13
Abbildung 5: Isothermale Nachweisverfahren .....	15
Abbildung 6: Rekombinase-Polymerase-Amplifikation .....	17
Abbildung 7: Sonde zum RPA-Nachweis von Leishmanien.....	18
Abbildung 8: Mobiles Kofflerlabor .....	19
Abbildung 9: Formeln zur Berechnung der Konzentration der DNA-Standards .....	22
Abbildung 10: Verschiedene Primer-Kombinationen für <i>Leishmania</i> Cpb-RPA.....	32
Abbildung 11: Verschiedene Primer-Kombinationen für <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA.....	33
Abbildung 12: Die Primer-Kombination FPy und RPy für <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA führte zu keiner Amplifikation von <i>T-brucei</i> -DNA.....	33
Abbildung 13: Fluoreszenzentwicklung in einem RPA-Lauf unter Verwendung von $10^6 - 10^0$ DNA-Molekülen/Reaktion des Cpb-DNA-Molekülstandards.....	35
Abbildung 14: Fluoreszenzentwicklung in einem RPA-Lauf unter Verwendung von $10^7 - 10^1$ DNA-Molekülen/Reaktion des 18S rRNA-DNA-Molekülstandards.....	36
Abbildung 15: Detektionszeit für den <i>Leishmania</i> Cpb-RPA-Test.....	37
Abbildung 16: Detektionszeit für den <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA-Test.....	37
Abbildung 17: Probit-Regressionsanalyse für den <i>Leishmania</i> Cpb-RPA-Test .....	38
Abbildung 18: Probit-Regressionsanalyse für den <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA-Test .....	38
Abbildung 19: Die Nachweisgrenze von <i>Leishmania</i> -Parasiten durch <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA.....	39
Abbildung 20: Cpb-RPA-Nachweis unterschiedlicher <i>Leishmania</i> -Spezies.....	41
Abbildung 21: 18S rRNA-RPA-Nachweis unterschiedlicher <i>Leishmania</i> -Spezies.....	42
Abbildung 22: Klinische Validierung des <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA-Tests unter Feldbedingungen .....	47
Abbildung 23: Multiplex-RPA-Nachweis von <i>Leishmania</i> 18S rRNA- und kDNA-DNA-Standards und DNA von verschiedenen <i>Leishmania</i> -Spezies.....	49
Abbildung S1: <i>Leishmania</i> Cpb-RPA nach Vorbehandlung der DNA mit dem Restriktionsenzym PFMI.....	65
Abbildung S2: <i>Leishmania</i> Cpb-RPA nach Vorbehandlung der DNA mit dem Restriktionsenzym EcoO109I .....	65
Abbildung S3: <i>Leishmania</i> Cpb-RPA nach Vorbehandlung von <i>L-tropica</i> -DNA mittels CRISPR/Cas.....	66

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapiemöglichkeiten für verschiedene <i>Leishmania</i> -Spezies.....	10
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	20
Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Enzyme.....	21
Tabelle 4: Verwendete Programme.....	21
Tabelle 5: Oligonukleotide für <i>Leishmania</i> Cpb-RPA.....	23
Tabelle 6: Oligonukleotide für <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA.....	24
Tabelle 7: Oligonukleotide für <i>Leishmania</i> kDNA-RPA.....	24
Tabelle 8: gDNA-Proben.....	25
Tabelle 9: Oligonukleotide für CRISPR/Cas.....	30
Tabelle 10: Darstellung der Detektionszeit des Signals (in Minuten) bei acht Läufen mit einer Konzentration von $10^3 - 10^0$ Cpb-DNA-Molekülen/Reaktion des molekularen DNA-Standards.....	35
Tabelle 11: Darstellung der Detektionszeit des Signals (in Minuten) bei acht Läufen mit einer Konzentration von $10^7 - 10^1$ 18S rRNA-DNA-Molekülen/Reaktion des molekularen DNA-Standards.....	36
Tabelle 12: Cpb- und 18S rRNA-RPA-Test mit unterschiedlichen <i>Leishmania</i> -Spezies.....	40
Tabelle 13: Liste der negativen Kreuzreaktionen der <i>Leishmania</i> Cpb- und <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA-Nachweise mit DNA bakterieller und parasitärer Infektionserreger.....	45
Tabelle 14: Klinische Validierung von <i>Leishmania</i> 18S rRNA- und von <i>Leishmania</i> kDNA-RPA-Tests unter Feldbedingungen.....	46
Tabelle 15: Vergleich der Detektionszeit des Signals zwischen Multiplex-, <i>Leishmania</i> 18S rRNA- und <i>Leishmania</i> kDNA-RPA (in Minuten).....	48
Tabelle S1: Restriktionsenzyme EcoO109I und PflMI und ihre potentiellen Schnittstellen im Amplikon des <i>Leishmania</i> Cpb-RPA-Tests.....	58
Tabelle S2: Design von CRISPR/Cas-Zielsequenzen zum spezifischen Nachweis von <i>L. tropica</i> durch Cpb-RPA.....	59
Tabelle S3: Alignment des Amplikons des <i>Leishmania</i> Cpb-RPAs mit den entsprechenden Sequenzen unterschiedlicher <i>Leishmania</i> -Spezies.....	60
Tabelle S4: <i>Mismatches</i> zwischen dem <i>Leishmania tropica</i> 18S rRNA-Amplikon und den homologen Sequenzen in <i>Trypanosoma spp.</i> .....	61
Tabelle S5: Alignment der <i>Leishmania</i> 18S rRNA-RPA-Zielsequenz (Amplikon des DNA-Standards) mit den Sequenzen unterschiedlicher <i>Leishmania</i> -Spezies, Primern und Sonde..	62
Tabelle S6: Accession-Nummern für <i>Leishmania</i> Cpb-Gene aus unterschiedlichen Spezies und Stämmen und Anzahl der <i>mismatches</i> innerhalb der Primer und der Sonde.....	63

## Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaar(e)
Cas	<i>CRISPR-associated protein</i>
cHDA	<i>Circular-helicase-dependent amplification</i>
CL	Kutane Leishmaniose
Cpb	<i>Cathepsin L-like cysteine proteinase B</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DCL	Diffuse kutane Leishmaniose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ERC	<i>Ethical Review Committee</i>
FP	<i>Forward primer</i>
gDNA	Genomische DNA
ITS1	<i>Internal transcribed spacer 1</i>
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i>
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
MCL	Mucokutane Leishmaniose
n. Chr.	Nach Christus
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>
P	Exo-Sonde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PKDL	Post-Kala-Azar dermale Leishmaniose
RDT	<i>Rapid diagnostic test</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RP	<i>Reverse primer</i>
RPA	Rekombinase-Polymerase-Amplifikation
rRNA	Ribosomale RNA
IMDA	<i>Isothermal multiple displacement amplification</i>
<i>spp.</i>	Spezies
SSB	<i>Single-strand binding protein</i>
THF	Tetrahydrofuran
VL	Viszerale Leishmaniose
WHO	World Health Organization



# 1 Einleitung

## 1.1 Leishmanien

### 1.1.1 Geschichte

Zwischen 400 und 900 n. Chr. wurden die Symptome der kutanen und mucokutanen Leishmaniose als eigene Entität beachtet (Lainson 1983). Bereits im 16. Jahrhundert wurden sie von Fernando de Oviedo (1535) und Pedro Pizarro (1571) als neue Krankheit beschrieben und ab Mitte des 18. Jahrhunderts wurden Berichte über die kutane Leishmaniose von Alexander Russel in Indien geschrieben (Grevelink und Lerner 1996). Die Sandmücke wurde von Cosme Bueno (1764) und Hipólito Ruíz (1777) als Überträger identifiziert (Chulay und Manson-Bahr 1984).

Danach wurden die Krankheitserreger zuerst u. a. von David Douglas Cunningham (1885), Piotr Fokich Borovsky (1898), William Boog Leishman (1900), Charles Donovan und James Homer Wright (1903) beschrieben. David Douglas Cunningham sah in der Hautbiopsie bei einem Patienten mit Orientbeule kleine Gebilde, die von ihm als Schleimpilze beschrieben wurden. Der Arzt Gustav Riehl hat festgestellt, dass dieser Erreger ausschließlich intrazellulär mit einer Größe von 0,9 – 1,1 µm vorkommt, James Homer Write hat letztendlich *Leishmania tropica* als Erreger der Orientbeule identifiziert. William Boog Leishman glaubte damals, dass die Leishmaniose von Trypanosomen verursacht wird, während Ronald Ross und Charles Donovan bald Leishmanien als neue Spezies erkannten. Der Nachweis der Erreger erfolgte durch William Boog Leishman und Charles Donovan am Anfang des 20. Jahrhunderts in Milz-Biopsien von Erkrankten. Deswegen nannte Ronald Ross diese Form *Leishmania donovani*, aber in Indien ist die VL als „Kala-Azar“ bekannt. Kala heißt auf Deutsch „schwarz“ und Azar heißt „Fieber“ (Donovan 1903; Leishman 1903; Ross 1903; Symmers 1960).

In Südamerika wurden die ersten Fälle der viszeralen Leishmaniose 1913 von Luis Migone dargestellt. Die Erkrankung war über Jahrhunderte hinweg aus der alten Welt durch infizierte Hunde eingeschleppt worden. Deswegen ist *L. chagasi*, der die südamerikanische viszerale Leishmaniose verursacht, nah verwandt mit *L. infantum* (Gothe 1997).

Die Erreger wurden von Oskar Theodor und Saul Adler im Jahr 1925 im Darm von Mücken nachgewiesen (Chulay und Manson-Bahr 1984).

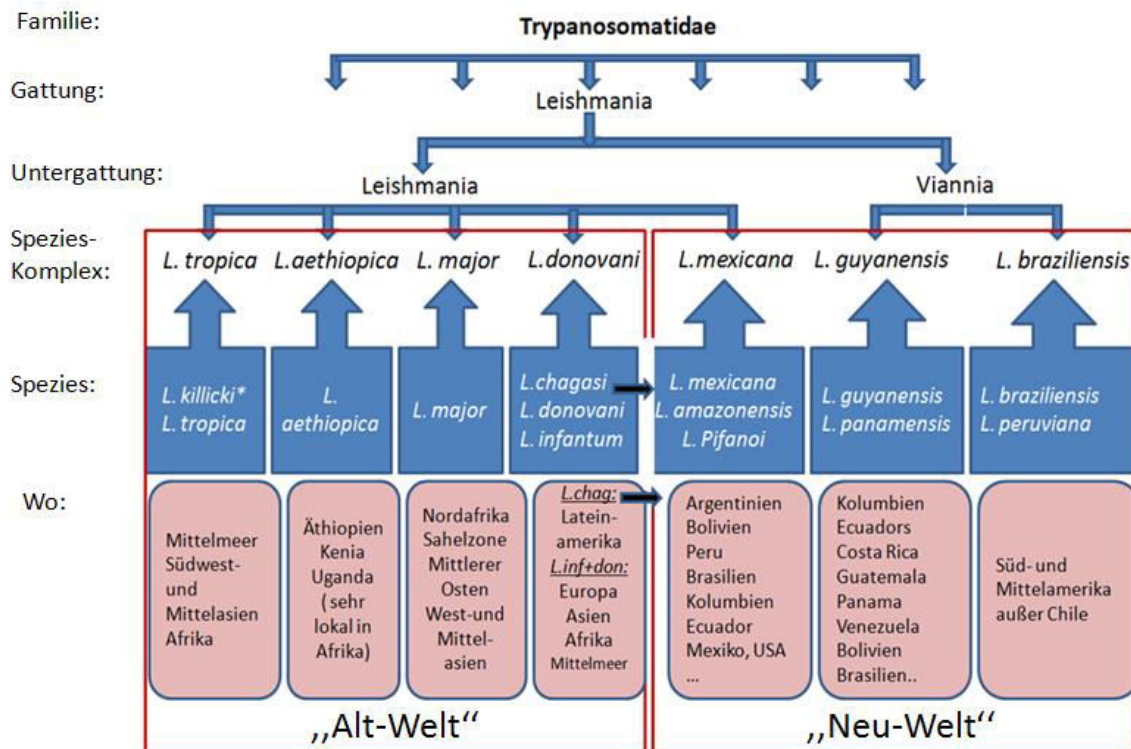
Im Jahr 1926 wurde die erste auf einer Immunreaktion basierende diagnostische Methode (sog. Montenegro-Skin-Test) entwickelt, um die kutane Leishmaniose nachzuweisen (Mauel und Behin 1982).

### 1.1.2 Ätiologie, Epidemiologie und Klassifikation

Die Leishmaniose ist eine Krankheit, die durch obligat intrazelluläre protozoische und begeißelte Parasiten der Gattung *Leishmania* (Familie *Trypanosomatidae*, Ordnung *Kinetoplastida*) hervorgerufen wird. Die Parasiten werden von Sandfliegen der Gattung *Phlebotomus* und *Lutzomyia* auf den Menschen oder andere Säuger übertragen (Elmahallawy et al. 2014). Sie kommen in zwei unterschiedlichen morphologischen Formen vor: die Promastigoten sind die geißeltragende Form von *Leishmania*, und sie kommen u. a. im Darm der Sandmücke vor. Bei der Blutmahlzeit der Mücke treten die in die Haut ein. Sie sind auch in der *in vitro*-Kultur zu finden. Ihr Zellkörper ist 5 – 15 µm lang und sie haben eine sog. Schlepp-Geißel (circa 10 µm lang), welche am vorderen Ende der Zelle aus einer Geißeltasche entspringt. Auf der anderen Seite sind die Amastigoten obligat intrazelluläre Formen, die hauptsächlich in Makrophagen der Säugerwirte parasitieren. Sie stellen mit einem Durchmesser von circa 2 – 5 µm und ihrer in der Geißeltasche versenkten kurzen Geißel die kleinsten bekannten Eukaryonten dar. Die Vermehrung erfolgt durch Längsteilung (Lang 1996; Leventhal und Cheadle 1985). Mehr als 18 verschiedene pathogene Spezies gehören zur Gattung *Leishmania* (Abbildung 1). Endemisch ist die Leishmaniose in fast 90 Ländern zu finden (Murray et al. 2005). Auf Grund der hohen Zahl an ungemeldeten Fällen und der Variation des Krankheitsbildes sind die Prävalenz sowie die Inzidenz schwer zu bestimmen.

Die Leishmaniose ist weit verbreitet und manifestiert sich in verschiedenen Krankheitsbildern je nach Spezies sowie Subspezies und der Immunitätslage des Erkrankten. Sie wird geografisch in zwei große Gruppen eingeteilt, auf der einen Seite die „Neu-Welt“ Leishmaniose, die in Amerika zu finden ist, und auf der anderen Seite die „Alt-Welt“ Leishmaniose, die in Asien, Afrika und in den Ländern des Mittelmeerraums vorkommt (Herwaldt 1999; Piscopo und Mallia Azzopardi 2007). Durch ein erhöhtes Reiseaufkommen und den Klimawandel können sich die Endemie-Gebiete immer weiter vergrößern; so können die Leishmanien auch in Deutschland durch das Vorkommen von geeigneten Mücken als Vektoren (Gattung: *Phlebotomus*) verschleppt werden (Koehler et al. 2002; Naucke und Pesson 2000; Bogdan et al. 2001).

Nach Schätzungen der WHO von 2010 sind jährlich weltweit zwei Millionen neue Fälle zu erwarten, 1,5 Millionen davon kutane Leishmaniosen und 0,5 Millionen viszerale Leishmaniosen. Mehr als 350 Millionen Menschen sind weltweit bedroht, an Leishmaniose zu erkranken, und es werden jährlich 50.000 Todesfälle durch viszerale Leishmaniose geschätzt.



**Abbildung 1: Taxonomie und Endemiegebiete von den wichtigsten *Leishmania*-Spezies.** Die wichtigsten *Leishmania*-Spezies wurden hinsichtlich Vorkommen, Ursprung (siehe Pfeile) und Gruppenzugehörigkeit dargestellt. Basierend auf (Herwaldt 1999; Piscopo und Mallia Azzopardi 2007; Murray et al. 2005).

### 1.1.3 Krankheitsbilder

Die Leishmaniose kann in vier klinischen Formen auftreten (Elmahallawy et al. 2014).

Die kutane Leishmaniose (cutaneous leishmaniasis, CL) ist die häufigste Leishmaniose, die durch *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* und *L. guayanensis* verursacht wird und die vor allem in Syrien, Peru, Saudi-Arabien, Afghanistan und Brasilien vorkommt (Desjeux 2004; Ready 2010). Circa fünf Wochen nach einem Mückenstich kommt es zur pathologischen Veränderung der Haut an dieser Stelle, die in eine Ulzeration übergehen kann. Obwohl die Geschwüre sehr vielgestaltig sein können, ist häufig ein erhabener Randwall und eine erythematöse Papel zu beobachten, die zu einem 1,5 bis 3,5 cm großes Ulkus werden kann (Abbildung 2.D). Die spontane Abheilung ist bis auf die Läsionen durch Spezies des *L. braziliensis*-Komplexes in 3 bis 15 Monaten möglich (Ameen 2007). Am Ende bleibt meist nur eine eingezogene hypopigmentierte Narbe. Wenn die Läsion geheilt ist, bildet der Körper des Betroffenen eine gute und langanhaltende Immunität (Peters und Sacks 2006).

In bis zu 10% der Fälle entwickelt sich nach mehreren Jahren durch Reaktivierung der Erreger die sog. Rezidivleishmaniose, die nur schwer therapierbar ist (Lang 1996; Grevelink und Lerner 1996). Wenn das Immunsystem supprimiert ist, kann die Krankheit ebenfalls wieder auf-

treten und in eine diffuse kutane Leishmaniose übergehen. Durch Immunsuppression können auch kutane Leishmanioseerreger die inneren Organe befallen und zum Tod des Patienten führen (Ready 2010).

Die mucokutane Leishmaniose (muco-cutaneous leishmaniasis, MCL) wird vor allem von *L. braziliensis* aber auch *L. panamensis* und *L. guyanensis* verursacht. Häufig entwickelt sich die MCL nach einer kutanen Leishmaniose. So erkrankt etwa die Hälfte der Patienten, die nach *L. braziliensis*-Infektion zunächst an CL erkrankten, nach circa zwei Jahren an MCL, nach zehn Jahren sogar über 85% (Grevelink und Lerner 1996). Diese Form der Leishmaniose kommt insbesondere in Lateinamerika vor und heilt in der Regel nicht spontan aus, daher besteht immer die Indikation für eine medikamentöse Therapie (Daneshbod et al. 2011; Silveira et al. 1999). Die MCL-Parasiten breiten sich über die Lymph- und Blutbahnen meistens in der Mund-, Rachen-, Lippen-, Kehlkopf- und Nasenschleimhaut aus (Abbildung 2.C). Dabei fängt die Erkrankung meistens mit der Bildung eines plasmazellulären und lymphozellulären Infiltrats an Nase und Lippe an, evtl. mit Nasenbluten sowie eingeschränkter Nasenatmung. Im weiteren Verlauf entwickelt sich ein Ulkus. Die Erreger können auch die Nasenscheidewand befallen und zerstören. So kann die so genannte "Tapir-nase" entstehen, bei der die Nase in sich zusammenfällt. Endarteriitis und Vernarbung sowie Thrombosierung kleiner Gefäße können im Verlauf auftreten. Selten kann es zu Veränderungen der Schleimhaut der Genitalien oder der Augen kommen. Bei ausbleibender Behandlung können im späten Stadium bakterielle Superinfektionen, Schluckstörungen sowie eine stark eingeschränkte Nasenatmung auftreten, die wiederum zu Aspirationspneumonien, Malnutritionssymptomen und auch zum Tod führen können (Grevelink und Lerner 1996).

Die viszerale Leishmaniose (visceral leishmaniasis, VL) oder „Kala-Azar“ wird vom *L. donovani*-Komplex hervorgerufen und betrifft vor allem die Bevölkerung in Bangladesch und Indien. Diese Spezies führt zu einem besonders schweren Krankheitsbild, da sich die Parasiten im ganzen Körper ausbreiten (Herwaldt 1999). Es kommt zum Befall und Schädigung innerer Organe wie Knochenmark, Leber und Milz (Abbildung 2.B). Diese Form kann nach einer Inkubationszeit von drei bis sechs Monaten zu vielen verschiedenen Symptomen führen, wie zum Beispiel Splenomegalie, Panzytopenie, Fieber, Gewichtsverlust und Schleimhautblutungen. Im weiteren Verlauf sind Ödeme, Muskelhypotrophie, Lymphknotenvergrößerung und Hautläsionen zu beobachten. Seltener können sekundär auch Polyarthrit, Vaskulitis, Glomerulonephritis und Iridozyklitis auftreten. Die viszerale Leishmaniose führt unbehandelt meistens zum Tode (Opitz 1996).

Bei der viszeralen Form kann sich bei unzureichender oder fehlender Therapie auch eine post-Kala-Azar dermale Leishmaniose (PKDL) entwickeln, die vor allem in Indien, Bangladesch aber auch in China und Ostafrika vorkommt. Dabei handelt es sich um fleckenförmige nicht pigmentierte knotige Erytheme. PKDL-Läsionen sehen Exanthenen sehr ähnlich (Kirk und Sati 1940; Chulay und Manson-Bahr 1984).

Die vierte Verlaufsform, die als diffuse kutane Leishmaniose (diffuse cutaneous leishmaniasis, DCL) bekannt ist, wird durch *L. amazonensis* und *L. aethiopica* verursacht (Elmahallawy et al. 2014). Sie tritt sehr selten auf und betrifft ausschließlich Patienten mit eingeschränkter Immunlage. Typischerweise bilden sich solitäre knoten- oder plaqueförmiger Läsionen (Abbildung 2.A) (Beaver et al. 1984).

Der Schweregrad und die Erscheinungsform hängen von dem Immunstatus des Infizierten und von der zugrundeliegenden Spezies ab (Molina et al. 1999).



**Abbildung 2: Klinische Manifestationen von unterschiedlichen Leishmaniosen.** **A.** Diffuse kutane Form: solitäre knotenförmige Läsionen auf dem Fußrücken eines Infizierten (Khandelwal et al. 2011); **B.** Viszerale Form: Hepatosplenomegalie (Lindoso et al. 2016); **C.** Mucokutane Form: „Tapimase“ durch Parasitenbefall und Schädigung der Nasenscheidewand (Tuon et al. 2014); **D.** Kutane Form: pathologische Veränderung der Haut (Tuon et al. 2014). Die Verwendung der Abbildungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung von *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* und *Dove Medical Press*.

### 1.1.4 Vektor und Übertragungszyklus

Die Übertragung von Leishmanien auf Menschen und andere Säuger erfolgt durch weibliche Sandmücken (englisch: *Sand flies*) der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia* (*Phlebotominae*, eine Subfamilie der *Psychodidae* = Schmetterlingsmücken). Nur die weiblichen Mücken nehmen Blut für die Nährstoffversorgung der Eier auf, ferner ernähren sich die weiblichen und männlichen Mücken von Pflanzensäften. Bei sehr hoher Luftfeuchtigkeit und Temperaturen zwischen 10°C und 40°C können die Mücken auch bis zu zwei Wochen ohne Nahrung überleben. Die Temperaturempfindlichkeit spielt dabei eine große Rolle für das Überleben, deswegen sind sie in der Regel in allen warmen Gebieten bis auf die Pazifischen Inseln und Neuseeland zu finden.

Es gibt circa 600 unterschiedliche Arten, aber nur 10% davon, das heißt etwa 60 Arten, sind an der Übertragung der Leishmaniose beteiligt. In den anderen vermehren sich die Leishmanien zwar im Darm, aber sie werden mit den Fäzes ausgeschieden. Alle Sandmücken sind schlank (circa 2 – 4 mm lang), haben V-förmige Flügel, eine Kopfkapsel und sind behaart (Chulay und Manson-Bahr 1984). Der Name rührt daher, dass sie häufig eine gelbbraune Farbe haben. Die Gattung *Phlebotomus* kommt v. a. in der ‘Alten Welt‘ vor und lebt vorwiegend in semiariden Savannengebieten, die Gattung *Lutzomyia* kommt vor allem in der ‘Neuen Welt‘ vor und bevorzugt feucht-schwüle, schattige Waldgebiete (Beaver et al. 1984; Manson-Bahr und Bell 1996). Einige andere Mückengruppen wie z. B. Gnitzen oder Kriebelmücken werden teilweise auch als Sandmücken bezeichnet, sind aber keine Sandmücken im eigentlichen Sinne. Die Sandmücken können auch andere Pathogene wie Flaviviren, Vesikuloviren, Orbiviren und Bartonellen übertragen.

Meistens existiert eine enge Parasit-Vektor-Beziehung, und nur bestimmte Sandmückenarten übertragen bestimmte Leishmanien-Spezies. Die wichtigste Abhängigkeitsphase ist dabei die Anheftung der Leishmanien an das Darmepithel der Sandmücken.

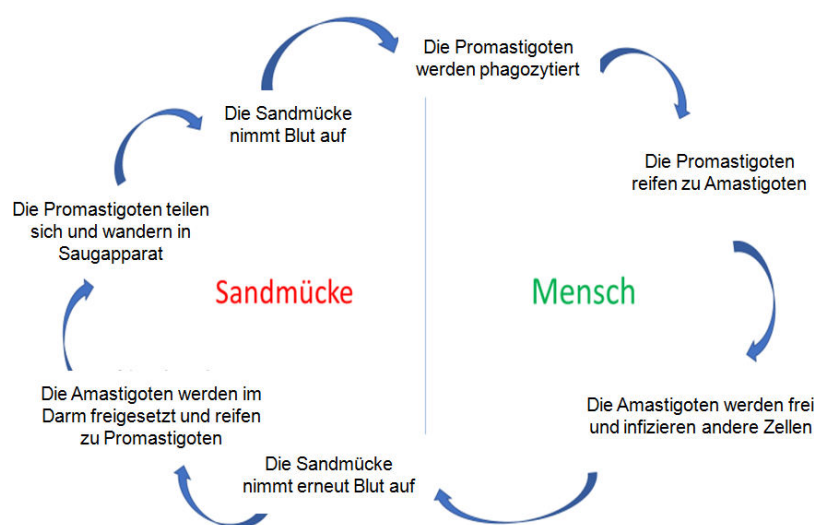
Die Leishmanien sind neben den Trypanosomen und den Malaria-Erreger die weltweit wichtigsten durch Vektoren-übertragene Parasiten mit kontinuierlich steigenden Fallzahlen. Dies liegt an verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der zunehmenden Armut in endemischen Gebieten, zunehmende Zahlen immunabwegeschwächter Patienten, z. B. durch HIV, vermehrte Resistenzen und dem Klimawandel (Walochnik und Aspöck 2010).

Je nach Ort der Verbreitung und der Spezies unterscheidet sich das tierische Reservoir der Leishmanien. Vor allem Steppen- und Waldnager, Ameisenbären, Faultiere, Gürteltiere und Ratten stellen das Reservoir der Erreger der kutanen und mucokutanen Leishmaniosen dar. Dagegen kommen die Erreger der viszeralen Leishmaniose besonders häufig in Hunden und

wilden Caniden vor. In Caniden und Nagern kommt es meist zu milden bzw. symptomlosen Verläufen (Chulay und Manson-Bahr 1984).

Leishmanien sind heteroxen, d. h. sie benötigen zwei unterschiedliche Wirte für ihren Lebenszyklus. Im Menschen und anderen Säugerwirten wie Hunden und Nagern einerseits und weiblichen Sandmücken als Vektoren andererseits durchlaufen sie unterschiedliche Entwicklungsphasen. Die weiblichen Sandmücken fliegen meistens in der Dunkelheit und werden durch Kohlendioxid im menschlichen Atem angelockt. Bevor sie sich zum Stechen vorbereiten, hüpfen sie in der Regel lange und unhörbar auf dem Wirt herum. Der Stich ist schmerzhaft und führt, auch wenn es nicht zur Übertragung eines Pathogens kommt, zu einer Schwellung und Rötung. Bei der Blutmahlzeit der weiblichen Sandmücke treten zwischen 1 und 1000 Leishmanien in Form von Promastigoten in die Haut ein, die vor allem von Makrophagen, Langerhanszellen, dendritischen Zellen und Granulozyten phagozytiert werden (Rittig und Bogdan 2000). Dort reifen sie zu Amastigoten, die danach freigesetzt werden und neue Zellen infizieren können. Wenn eine Sandmücke bei einer Blutmahlzeit freie Amastigote oder infizierte Wirtszellen aufnimmt, werden die Parasiten im Darm der Mücke freigesetzt und entwickeln sich innerhalb von 4 bis 25 Tagen über mehrere Zwischenstufen zu Promastigoten. Diese teilen sich, wandern in den Saugapparat ein und ermöglichen bei der nächsten Blutmahlzeit eine erneute Wirtsinfektion (Abbildung 3) (Bogdan und Röllinghoff 1998).

Selten kommt es zur Übertragung von *Leishmania*-Parasiten über Bluttransfusionen, sexuellen Kontakt, gemeinsamer Nutzung von Injektionsnadeln bei Drogenabhängigen oder auch über die Plazenta (Cruz et al. 2002; Morillas-Marquez et al. 2002).



**Abbildung 3: Lebenszyklus der Leishmanien.** Die Übertragung der *Leishmania*-Parasiten zwischen Sandmücke und Mensch und ihre Reifung bzw. Teilung sind dargestellt. Basierend auf *Centers for Disease Control and Prevention*.



### 1.1.5 Genetik und Zellbiologie

Auf der Zelloberfläche der Leishmanien bilden lipidverankerte Glykoproteine und Glykolipide eine sogenannte „Glykokalix“. Bei Promastigoten und Amastigoten unterscheidet sich die Zusammensetzung der Glykoproteine und Glykolipide. Zwischen den Glykoproteinen sind Membranproteine eingelagert, die die Interaktion mit Wirtszellen und die Aufnahme durch Phagozyten erleichtern. So ist u. a. das Glykoprotein 63 (GP63), eine Metalloprotease, das vor allem auf der Oberfläche von Promastigoten exprimiert wird, an der Aufnahme durch Makrophagen beteiligt. Lipophosphoglykane (LPG) hemmen die Produktion von aggressiven Sauerstoffradikalen und Stickoxiden. Für die Virulenz der Erreger spielen Cysteinproteasen eine wichtige Rolle, indem sie das Immunsystem des Wirts zum Vorteil des Parasiten manipulieren können (Pimenta et al. 1992; Beverley und Turco 1995).

Die 18S rRNA ist ein Teil der ribosomalen RNA. Sie ist eine Komponente der kleinen eukaryotischen ribosomalen Untereinheit 40S. Die Kinetoplasten-DNA (kDNA) ist eine zirkuläre DNA im Mitochondrium und ist an das Zytoskelett gebunden. Sie besteht aus einem Netzwerk miteinander verknüpfter *Maxicircles* und *Minicircles*. kDNA kodiert die Substrate für die RNA-Bearbeitung. Die Bearbeitung erfolgt durch Übertragung von Sequenzinformationen von den überwiegend in *Minicircles* kodierten gRNAs zu verschlüsselten Transkripten, die von *Maxicircles* kodiert werden (Smith et al. 2007; Lukes et al. 2007).

Es ist bisher unklar, ob sich Leishmanien und auch Trypanosomen sexuell vermehren. Neuere Forschungen zeigen aber, dass bei Leishmanien genetische Rekombinationen durchaus häufig vorkommen, unabhängig davon, ob die Vermehrung klonal ist (Walochnik und Aspöck 2010; Lukes et al. 2007).

### 1.1.6 Therapieansätze

Infektionen mit Leishmanien sollen grundsätzlich therapiert werden. Zwar heilt bei Immungesunden Patienten die kutane Leishmaniose nach Wochen bis Monaten spontan aus, sie sollte trotzdem zeitnah therapiert werden, um die Narbenbildung zu reduzieren und die Heilung zu beschleunigen (Murray et al. 2005). Meist kommen medikamentöse Therapien zum Einsatz, bei der kutanen Leishmaniose sind aber auch physikalische Verfahren beschrieben (Tabelle 1). In einigen Ausnahmen können auch plastische Operationen notwendig sein.

Die fünfwertigen Antimonpräparate (Pentostam<sup>R</sup> und Glucantime<sup>R</sup>) sind eine sehr alte Therapiemöglichkeit der verschiedenen Leishmaniosen. Sie zeigen eine sehr gute Wirksamkeit mit einer Ansprechrate von über 90% (Seifert 2011). Studien haben gezeigt, dass die Gabe von Antimonpräparaten innerhalb von Läsionen am wirksamsten ist (Ameen 2007). Sie hemmen



die Synthese der Purinnukleotidtriphosphate im Parasiten, sind jedoch auch für den Wirt sehr toxisch, vor allem bei langanhaltender Medikation bei chronischen Infektionsverläufen. Durch die häufig notwendige lange Anwendung entwickeln die Parasiten außerdem Resistenzen (Carter et al. 2006).

Das Antibiotikum Paromomycin kann mit den genannten Präparaten kombiniert werden, um eine schnellere Heilung zu erzielen (Jha et al. 1998; Thakur et al. 2000).

Amphotericin B ist ein weiteres gebräuchliches Mittel gegen Leishmanien. Es verändert die Membranpermabilität der Leishmanien und eine einmalige Gabe eliminiert in etwa 90% der Parasiten, gleichzeitig ist es jedoch mit zu hohen Kosten in den Endemiegebieten verbunden (Sundar und Chatterjee 2006). Um einen Einfluss auf die Membranpermabilität zu erreichen und die Resistenzen gegen Antimonpräparate zu vermeiden wird Amphotericin B inzwischen häufig verabreicht und sogar als erste Wahl in Europa und den USA verordnet (Alvar et al. 2006). Dieses Antibiotikum wird ebenfalls von Makrophagen aufgenommen, wodurch Antibiotikum und Erreger miteinander in Kontakt kommen können (Herwaldt 1999).

Eine weitere Möglichkeit, um Leishmaniose zu behandeln, ist die Verhinderung der Ergosterol-Synthese, das in der Membran von Leishmanien zu finden ist. Dies kann zum Beispiel durch den Einsatz von Azolen gelingen (Urbina 1997).

Miltefosin wird vor allem zur Therapie der viszeralen Leishmaniose erfolgreich eingesetzt. Es ist ein Alkylphosphocholin, das ursprünglich als Antitumor-Mittel entwickelt wurde. Es kann oral verabreicht werden und hat vergleichsweise geringere Nebenwirkungen als z. B. Antimonpräparate. Aufgrund einer Behandlungsdauer von 28 Tagen und der langen Halbwertszeit können sich jedoch Resistenzen entwickeln (Lux et al. 1996; Bryceson 2001).

In Tabelle 1 sind wichtige Therapiemöglichkeiten für die unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies zusammengefasst.

Zur Immunprophylaxe wurden Lebendvakzinen entwickelt, die aber wegen der geringen Spezifität für den Menschen nicht zugelassen sind. Die Entwicklung von Subunit-Vakzinen, u. a. auch gegen Speichelproteine der Schmetterlingsmücken wird weiter vorangetrieben (Kubar und Fragaki 2005; Kamhawi et al. 2000). Zur Expositionsprophylaxe sollte man in Endemiegebieten versuchen Moskitonetze zur Verfügung zu stellen, das Erregerreservoir zu vernichten und Aufenthalte nachts im Wald zu vermeiden (Grimaldi und Tesh 1993; Sypek und Wyler 1988; Garcia et al. 2005).

Tabelle 1: Therapiemöglichkeiten für verschiedene *Leishmania*-Spezies

Spezies	Regionen	Therapie	Quelle
<i>L. tropica</i>	Mittelmeer, Südwest- und Mittelasien, Afrika	<u>Topisch:</u> 1. periläsionales Antimon (ggf. in Kombination mit Kryotherapie) 2. Thermotheapie <u>Systemisch:</u> 1. Itraconazol 2. Ketoconazol 3. Fluconazol	(DTG 2010)
<i>L. major</i>	Nordafrika, Sa- helzone, Middle- rer Osten, West- und Mittelasien	<u>Topisch:</u> 1. periläsionales Antimon (ggf. in Kombination mit Kryotherapie) 2. Paromomycin 15% 3. Thermotheapie <u>Systemisch:</u> 1. Miltefosin 2. Fluconazol 3. Ketoconazol	(DTG 2010)
<i>L. aethiopica</i>	Sehr lokal in Afrika (Äthiopien, Ke- nia, Uganda)	1. Antimon 2. Pentamidin 3. Miltefosin	(DTG 2010)
<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i>	Europa, Asien, Afrika, Mittelmeer	<u>Systemisch:</u> 1. Antimon i. v. + Pentoxifyllin oder Liposomales Ampho B 2. Miltefosin	(DTG 2010; DTG 2016)
<i>L. chagasi</i>	Lateinamerika	<u>Systemisch:</u> 1. Liposomales Ampho B 2. Miltefosin	(DTG 2016)

Spezies	Regionen	Therapie	Quelle
<i>L. amazonensis</i>	Nordargentinien, Bolivien, Brasilien, Kolumbien, Ecuador, Französisch-Guayana, Peru, Surinam und Venezuela	<u>Topisch:</u> 1. periläsionales Antimon (ggf. in Kombination mit Kryotherapie) 2. Paromomycin 3. Thermotherapie <u>Systemisch:</u> 1. Ketoconazol 2. Antimon i.v.	(DTG 2010)
<i>L. mexicana</i>	Belize, Costa Rica, Guatemala, Mexiko, USA, Kolumbien und Ecuador.	Wie bei <i>L. amazonensis</i>	(DTG 2010)
<i>L. braziliensis</i>	Süd- und Mittelamerika außer Chile.	1. Antimon i. v. + Pentoxifyllin 2. Miltefosin (abhängig vom Endemiegebiet) 3. Pentamidin 4. Liposomales Ampho B 5. Itraconazol	(DTG 2010)

## 1.2 Nachweismethoden

Die Entwicklung neuer Nachweismethoden ist von großer Bedeutung, um schnell und sicher andere Krankheiten, die ähnliche Symptome wie Leishmaniosen verursachen, abzugrenzen. Als Material zum Nachweis der Parasiten wird klassischerweise bei der CL, DCL und PKDL eine Biopsie aus den Hautläsionen, wenn möglich dem Randwall der Läsionen entnommen. Zur Diagnostik der VL muss eine Blutabnahme oder Knochenmarkspunktion erfolgen. Bei der PKDL ist die Parasitenzahl in der Haut sehr gering, weswegen die Diagnose erschwert wird.

Derzeit basiert die Diagnose von *Leishmania spp.*-Infektionen auf dem klinischen Bild und dem Erregernachweis an Hand der folgenden Methoden.

Die Mikroskopie von Amastigoten ist eine einfache und kostengünstige Methode mit hoher Spezifität, die zudem mit einfachen technischen Mitteln möglich ist und weltweit angewendet wird. Die menschlichen Ausstrich- oder Quetschpräparate werden direkt nach Giemsa-Färbung mikroskopiert. Die multiplen Amastigoten in Makrophagen sind intrazellulär oder

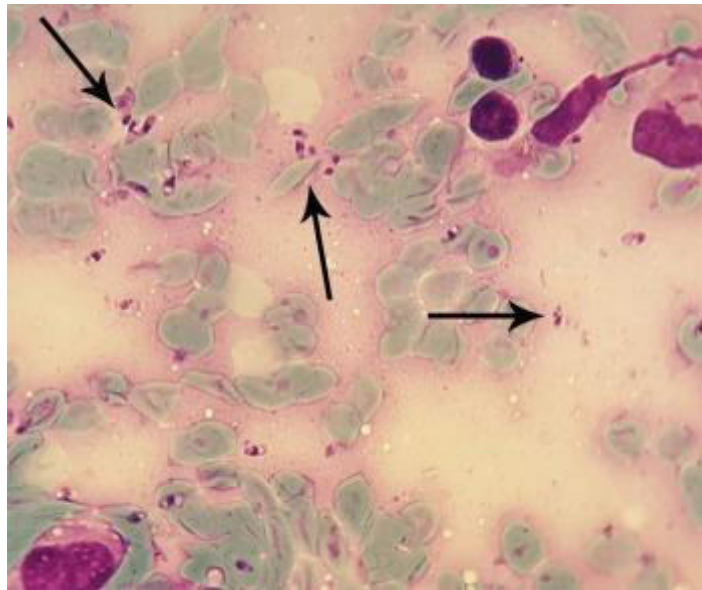
nach Ruptur der Zelle auch frei nachweisbar (Abbildung 4). Die Sensitivität dieser Methode liegt allerdings bei nur 30%, u. a. aufgrund der niedrigen Anzahl von Amastigoten in Läsionen von länger anhaltend Infizierten (Garcia et al. 2005).

Im Gegensatz dazu hat die Anzucht der Parasiten im Hamster für alle Leishmanien tatsächlich eine gute Sensitivität. Jedoch ist sie gegen Pipettierfehler anfällig, für *L. braziliensis* nicht geeignet und erfordert einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand.

Die Antikörper-Detektion durch den Immunfluoreszenztest (IFT) oder durch ELISA ist nur für die VL sinnvoll, da nur bei dieser Form in ausreichendem Umfang Antikörper gebildet werden. Dagegen bilden Patienten mit CL, MCL oder PKDL aufgrund der vorherrschenden zellulären Immunität wenig Antikörpern.

Der Intradermal-Test ist bei CL oder MCL möglich, nicht aber bei VL. Er beruht auf dem Nachweis der zellulären Immunität, die bei VL nur schlecht ausgeprägt ist. *Leishmania*-Antigene werden intradermal am Unterarm gespritzt. Die Einstichstelle wird nach circa drei Tagen überprüft. Wenn eine große Papel erscheint, ist der Test positiv. Die Positivität und Gültigkeit des Tests hängen von der Immunitätslage des Patienten und der Spezies ab. Der Nachteil des Testes ist, dass der Test auch positiv wird, wenn dieser Test früher schon einmal durchgeführt wurde. Die Sensitivität des Tests liegt bei ca. 95% und die Spezifität bei 96 – 100% (Mauel und Behin 1982; Oddone 1994; Nascimento et al. 1993).

Der mikroskopische Direktnachweis und auch der serologische Nachweis bei Verdacht auf VL sind zeitaufwendig und erfordern experimentelle Erfahrung. Deswegen wurden in den letzten Jahren vermehrt real-time PCR-Nachweise (*Polymerase Chain Reaction*) entwickelt, die weniger zeitaufwendig sind. Mit der Methode wird die DNA von Promastigoten oder Amastigoten nachgewiesen. Die PCR-Nachweise sind jedoch auf Labore mit relativ aufwendiger technischer Ausrüstung beschränkt. Gerade in den Regionen in denen *Leishmania*-Infektionen am häufigsten vorkommen, sind solche Labore jedoch selten. Für diese Endemiegebiete sollten neue oder verbesserte Methoden mit möglichst geringem technischem Aufwand durchführbar, aber dennoch sensitiv, spezifisch und kostengünstig sein.



**Abbildung 4: Amastigote Leishmanien in Makrophagen nach Giemsa-Färbung.** Mikroskopie einer Probe aus Wundabstrich (Hashemi et al. 2018). Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

### 1.3 Isothermale Nachweisverfahren und PCR

Trotz mehrerer erfolgreich evaluierter Methoden in der Diagnostik von Leishmanien geht die Tendenz immer mehr zur Molekulardiagnostik; deswegen wurden viele isothermale Nachweisverfahren und PCR für die Vervielfältigung von Nukleinsäuren entwickelt.

Die *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) dauert bei einer konstanten Temperatur von 60°C mehr als 60 Minuten. Sie erfordert vier bis sechs Primer, um sechs bis acht verschiedene Regionen auf dem Zielgen zu amplifizieren, was die Spezifität erhöht und die Reaktion beschleunigt (Nagamine et al. 2002). Mit Hilfe einer strangversetzenden *Bacillus stearothermophilus*-DNA-Polymerase werden DNA-Sequenzen amplifiziert. Die LAMP-Methode kann in sehr kurzer Zeit eine große DNA-Mengen synthetisieren. Infolgedessen werden weiße Präzipitate von Magnesiumpyrophosphat gebildet. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein dieses weißen Präzipitats ist entscheidend, ob die Nukleinsäure mit der LAMP-Methode amplifiziert wurde (Mori et al. 2001). Gelelektrophorese und Fluoreszenzsonden wurden auch zum Nachweis von LAMP-Produkten verwendet (Abbildung 5.A) (Mori et al. 2004). LAMP wird zum Nachweis von Infektionskrankheiten wie Tuberkulose und Schlafkrankheit eingesetzt (Geojith et al. 2011; Njiru et al. 2008).

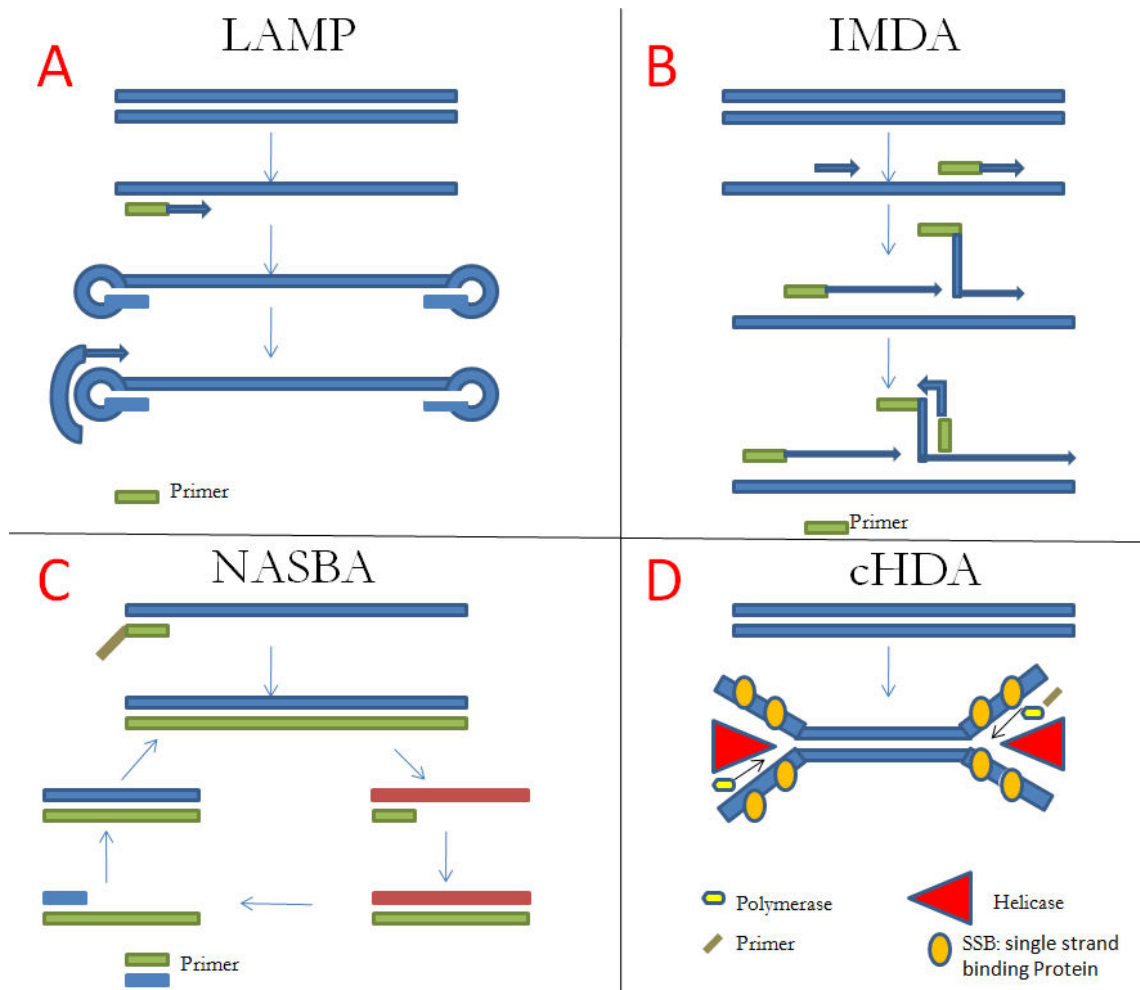
Besonders geeignet für die Vermehrung von langen Sequenzen mit einer geringen Fehlerhäufigkeit ist die *Isothermal multiple displacement amplification* (IMDA) oder auch *Strand-displacement amplification* (SDA). Diese Methode basiert auf der Replikation der Nukleinsäuresequenzen durch die Anlagerung von Hexamer-Primern (d. h. sechsbasige Primer) an die DNA und an-

schließende Polymerisierung (Blanco et al. 1989). Die doppelsträngige DNA wird durch thermische Denaturierung in zwei Einzelstränge aufgespalten, die Hexamer-Primer lagern sich an das Template und so kann die Polymerase die DNA replizieren, was bei jedem Primer initiiert wird und bis zum spontanen Abbruch andauert. So können mehrere Kopien des gesamten Genoms in kurzer Zeit synthetisiert werden (Abbildung 5.B) (Hosono et al. 2003; Lasken und Egholm 2003).

Andere Amplifikations-Methoden benötigen eine Transkription wie zum Beispiel die *Nucleic acid sequence-based amplification*(NASBA) oder die *Transcription-mediated-amplification*(TMA). NASBA basiert auf einer transkriptionsvermittelten Amplifikation. Sie eignet sich besonders für RNA-Analyten wie mRNA (messenger RNA), rRNA (ribosomale RNA) oder genomische RNA und ist sehr zeitaufwendig. An dieser homogenen isothermen Reaktion sind Enzyme wie Reverse Transkriptase(RT), RNase H und T7 DNA-abhängige RNA-Polymerase beteiligt (Abbildung 5.C) (Schneider et al. 2005; Compton 1991).

Die *Circular-helicase-dependent amplification*(cHDA) verwendet auch eine Polymerase, die doppelsträngige DNA wird mit Hilfe der Helicase aufgespalten, zwei Primer hybridisieren mit jedem Rand der DNA-Matrizen und bei einer Temperatur von 25°C kann die Polymerase die zirkulären DNA-Matrizen amplifizieren (Abbildung 5.D) (Lillis et al. 2014). Die Optimierung von Primern und manchmal Puffern ist jedoch erforderlich und wird durch PCR getestet. cHDA wird zum Nachweis z. B. von *Clostridium difficile* verwendet (Chow et al. 2008).

Im Vergleich dazu steht die PCR-Methode, die aus drei Schritten besteht. Dabei werden verschiedene Temperaturzyklen benötigt, um die DNA-Doppelstränge aufzutrennen, die Primer an die Einzelstrang-Ziel-DNA anzulagern und einen komplementären Strang zu bilden. Die DNA-Kopien vermehren sich exponentiell durch die mehrmalige Wiederholung des Zyklus. Eine Variation der PCR ist die real-time PCR., bei der während der Amplifikation die Menge des amplifizierten DNA-Abschnitts bestimmt wird (Wittwer et al. 2004).



**Abbildung 5: Isothermale Nachweisverfahren.** **A.** *Loop-mediated isothermal amplification*(LAMP). Basierend auf (Nagamine et al. 2002; Mori et al. 2001); **B.** *Isothermal multiple displacement amplification*(IMDA). Basierend auf (Hosono et al. 2003; Lasken und Egholm 2003); **C.** *Nucleic acid sequence-based amplification*(NASBA). Basierend auf (Schneider et al. 2005; Compton 1991); **D.** *Circular-helicase-dependent amplification*(cHDA). Basierend auf (Lillis et al. 2014).

## 1.4 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation

Die RPA-Reaktion ist eine Enzym-gesteuerte und isothermale Amplifikationsmethode, die ähnlich wie die herkömmliche PCR funktioniert, aber deutlich schneller und bei gleich bleibender Temperatur abläuft. Dadurch sind die unterschiedlichen Temperaturstufen mit sich wiederholenden Zyklen, wie bei der PCR, nicht nötig. Die Reaktion funktioniert optimal bei einer Temperatur von etwa 37 – 42°C. Außerdem sind die Reagenzien der RPA unabhängig von der Umgebungstemperatur und ohne Kühlketten transportier- und verwendbar.

Im ersten Schritt bildet die Rekombinase einen Komplex mit den Primern und platziert diese an ihre homologen Sequenzen an der doppelsträngigen Ziel-DNA. Somit ist nicht die komplette Denaturierung der DNA-Matrize nötig, damit die Primer an ihre komplementären

Zielsequenzen binden. Stattdessen setzt RPA Rekombinase-Primer-Komplexe ein, um doppelsträngige DNA zu scannen und den Strangaustausch an verwandten Stellen zu vereinfachen, wodurch das Auswerfen des Primers durch Verzweigungsmigration verhindert wird (Yonesaki et al. 1985; Shibata et al. 1979; Formosa und Alberts 1986; Harris und Griffith 1988; Piepenburg et al. 2006). Dadurch entsteht an diesen Stellen ein Einzelstrang, welcher durch die Bindung von Einzelstrang-bindenden-Proteinen (*single-strand binding protein*, SSB) stabilisiert wird. So kann letztendlich die strangverdrängende Polymerase an den Primer binden und das gewünschte Amplikon synthetisieren und amplifizieren (Abbildung 6).

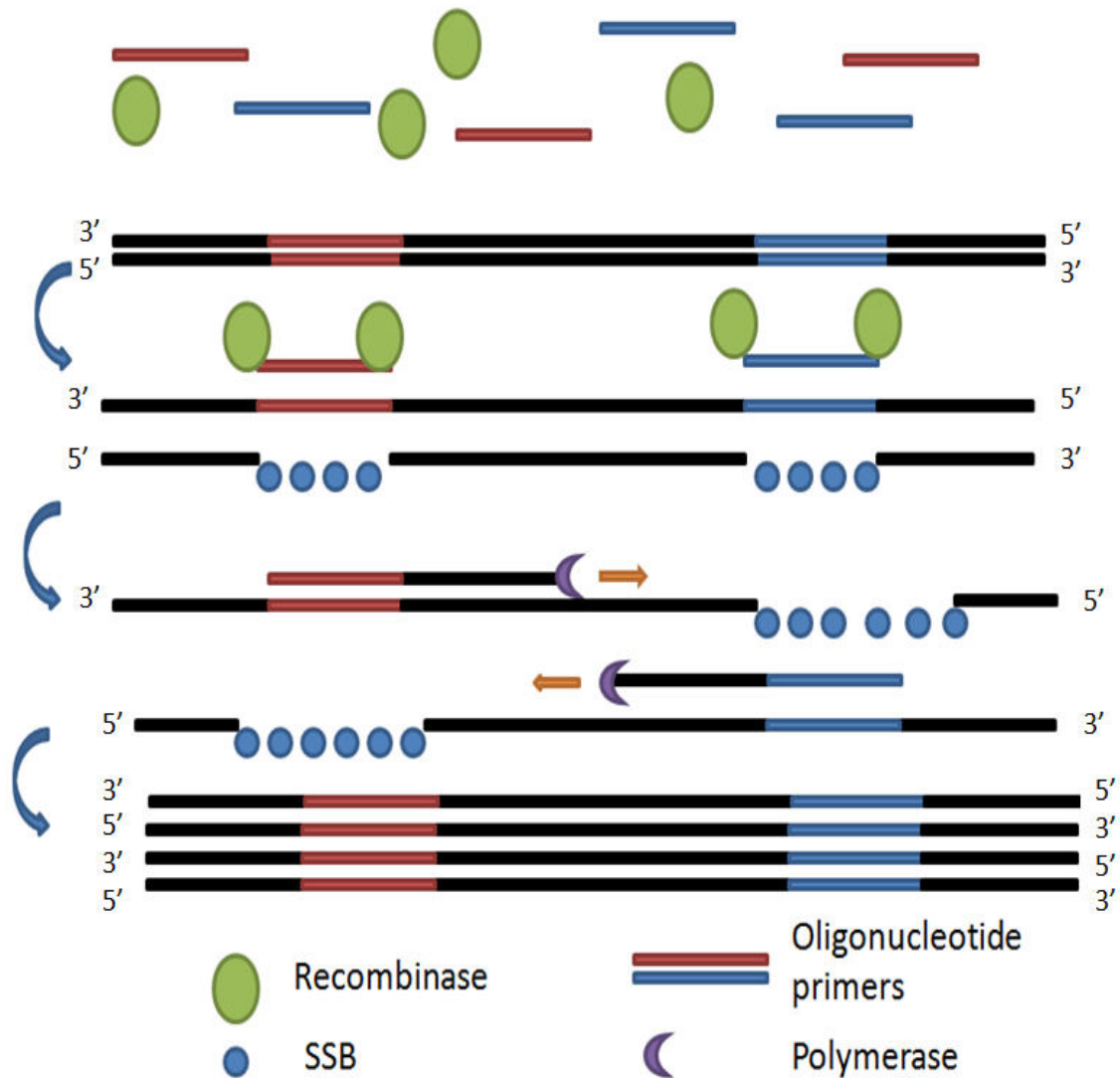
Die verwendeten Proteine sind zentrale Bestandteile von *in-vivo*-Prozessen, die für die Synthese, Rekombination und Reparatur von zellulärer DNA erforderlich sind. Sie sind seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Piepenburg et al. 2006; Bianco et al. 1998).

Um diesen Amplifikationsprozess in Echtzeit zu verfolgen, kann ein Fluoreszenzsondensystem eingesetzt werden. Die Sonde ist verantwortlich für die Signalsendung. Dabei erzeugt das Fluorophor ein Signal, das vom Quencher unterdrückt werden kann.

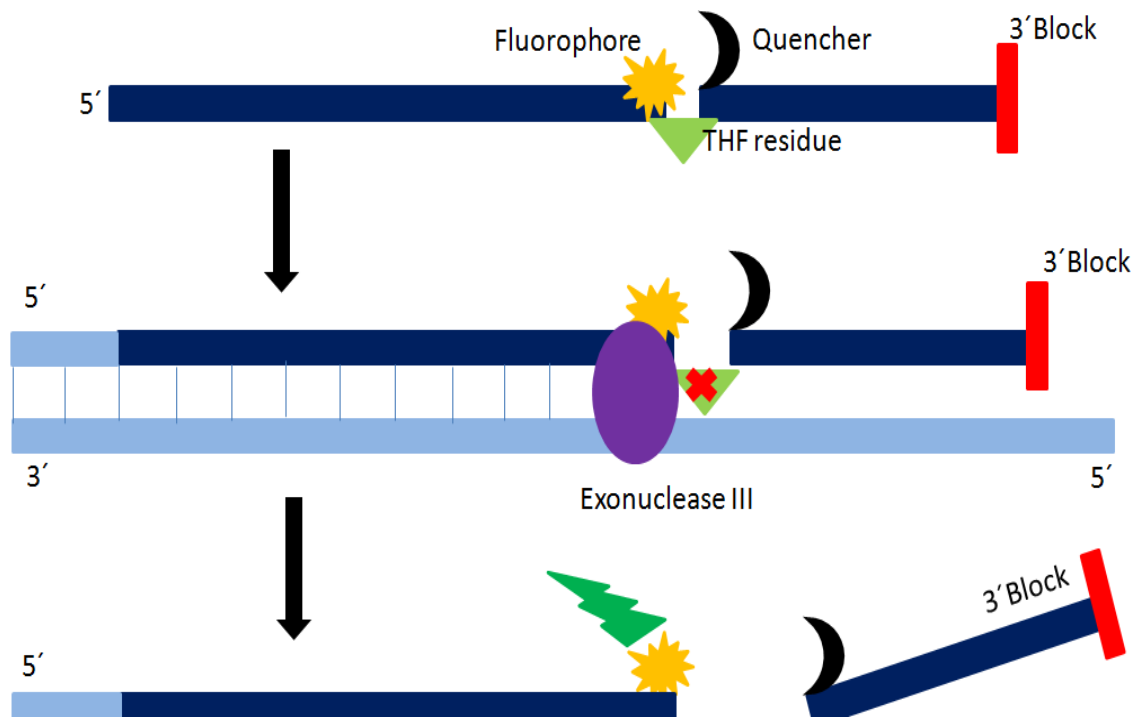
Die Unterdrückung des Fluoreszenzsignals durch Quencher wird aufgehoben, wenn die Sonde mit der Einzelstrang-DNA gekoppelt ist und so das Signal detektiert werden kann (Abbildung 7). Die zunehmende Fluoreszenz wird mittels eines Computerprogramms (Twista<sup>TM</sup>Studio) dargestellt und gibt einen Hinweis auf die Zunahme der Amplifikation.

RPA-Tests wurden zum Nachweis von *Leishmania donovani* (Sensitivität 100% und Spezifität 100%) und für einen *Ebola*-Ausbruch in Guinea (Sensitivität 91% und Spezifität 100%) von der WHO anerkannt (Mondal et al. 2016; Faye et al. 2015). Der Ebola-RPA wird z. B. in Guinea bei Ausbruchsgeschehen routinemäßig eingesetzt.





**Abbildung 6: Rekombinase-Polymerase-Amplifikation.** Die Rekombinase bildet einen Komplex mit den Primern und platziert diese an ihre homologen Sequenzen, dann bindet die strangverdrängende Polymerase an den Primer und synthetisiert das gewünschte Amplikon. Dadurch werden von einer doppelsträngigen Ziel-DNA viele Kopien gebildet. *Single-strand binding protein*(SSB) stabilisieren die neuen gebildeten Einzelstränge. Basierend auf (Piepenburg et al. 2006).



**Abbildung 7!:** Sonde zum RPA-Nachweis von Leishmanien. Der THF-Rest ist eine modifizierte Base. Das Fluorophor dient als Signal-Sender, im Gegensatz dazu unterdrückt der Quencher das Signal. Die Exonuclease ist im TwistAmp™-exo-Kit enthalten. Diese schneidet am THF, wenn die Sonde mit der Einzelstrang-DNA gekoppelt ist. So ist das kurze Fragment der Sonde aufgelöst und das Signal nicht mehr unterdrückt. Der 3' Block blockiert die Polymerase und lässt das Oligonukleotid nicht als Primer funktionieren.

## 1.5 Mobiles Kofferlabor

Um RPA-Tests an Orten mit schlechtem Zugang zu gut ausgestatteten Laboren zu ermöglichen, ist ein mobiles Kofferlabor einsetzbar (Abbildung 8). Dieses enthält alle für die RPA nötigen Utensilien und kann mit einer einfachen Autobatterie betrieben. Wenn auch eine DNA-Extraktion nötig ist, kann ein zusätzliches separates Kofferlabor verwendet werden, um Kontaminationen zu vermeiden (Mondal et al. 2016). Das mobile Kofferlabor wurde z. B. in Guinea und Senegal zum Ebola-Nachweis erfolgreich eingesetzt.

<sup>1</sup>Diese Abbildung verdanke ich Herrn Dr. J. Kissenkötter (Abteilung der Mikrobiologie und Tierhygiene, Georg-August-Universität Göttingen).



Abbildung 8: Mobiles Kofferlabor

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines isothermalen Diagnoseverfahrens basierend auf einem Rekombinase-Polymerase-Amplifikations (RPA)-Test zum Schnelldiagnose aller *Leishmania*-Spezies mit guter analytischer Sensitivität sowie Spezifität. Der Nachweis sollte innerhalb von 10 Minuten möglich sein und vor allem auch Leishmanien von Trypanosomen differenzieren können. Der RPA-Test könnte dann in einem mobilen Kofferlabor durchgeführt werden, wodurch archivierte DNA-Proben an Orten mit schlechtem Zugang zu gut ausgestatteten Laboren schnell und einfach kontrolliert und validiert werden könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien/Geräte	Hersteller
Abfallbehälter	Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland
Axxin-T16-ISO-Gerät	Bimedis GmbH, Salischtschyky, Ukraine
Desinfektionstücher	Merz Consumer Care, Frankfurt, Deutschland
Handschuhe	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Kühlschrank (5°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Labortücher (20,5 cm x 20 cm)	Kimberly Clark Europe Limited, Kings Hill, UK
LightCycler® 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Microplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mini-Spin-Zentrifuge	MCF 2360, LMS Co., Ltd., Südkorea
Mobiles Kofferlabor	ZARGES GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Gilson International, Limburg, Deutschland
Pipettenspitzen	BRAND, Wertheim, Deutschland
Nano Drop® ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
<i>Safe-Lock-Tubes</i> (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schutzbrillen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Solar Paneele</i>	Yeti 400-Set, GOALZERO, South Bluffdale, USA
ESEQuant Tube Scanner	QIAGEN Lake Constance, Stockach, Deutschland
Vernichtungsbeutel (300 mm x 200 mm)	LabLogistics Group GmbH, Meckenheim, Deutschland

<b>Verbrauchsmaterialien/Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Vortexer	Lab-Dancer, IKA®, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## 2.2 Chemikalien, Puffer und Enzyme

**Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Enzyme**

<b>Chemikalien/Puffer/Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumacetat	TwistDx, Cambridge, UK
AE Puffer	Biocompare, San Francisco, California, USA
Rehydratationspuffer	TwistDx, Cambridge, UK
NEBuffer™ 3.1	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
CutSmart® Buffer	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
PBS	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
TwistAmp™ exo Kit	TwistDx, Cambridge, UK
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PfIMI-Enzym	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
EcoO109I-Enzym	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Cas 12a (oder Cpf1)	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien

## 2.3 Computerprogramme

**Tabelle 4: Verwendete Programme**

<b>Programme</b>	<b>Ziel</b>
Geneious und MEGA7	DNA-Sequenzanalyse, Primer- und Sondendesign und Alignment
Twista™Studio	Evaluation und Aufzeichnung der Messungen des Tube Scanners
Statistica 9	Datenverarbeitung
Microsoft Office und Excel	Text- und Datenverarbeitung
Prism 4.0a	Datenverarbeitung

## 2.4 DNA-Standard-Sequenzen

Für den *Leishmania* Cpb-RPA wurde ein molekularer DNA-Standard (299 Bp lang) aus dem *Cathepsin L-like Cysteine Proteinase B* Gen (Cpb, GenBank *accession number*: DQ286773) synthetisiert. Für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurde ein 598 Bp langer DNA-Standard aus dem 18S ribosomale RNA Gen (18S rRNA, GenBank *accession number*: GQ332354 – GQ332363) synthetisiert (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland).

Für die Verwendung des Standards wurde dieser mit Hilfe folgender Gleichungen auf eine Konzentration von  $10^8$  Molekülen/ $\mu$ l eingestellt (Abbildung 9) (Zhong et al. 2011).

$$*\text{number of molecules} = \frac{6.023 \times 10^{23} \times \frac{\text{Standard(g)}}{\text{Volume}(\mu\text{l})}}{\text{number of nucleotides} \times 660}$$

$$*\text{Dilution range of } 10^8 = \frac{\text{number of molecules}}{10^8}$$

Abbildung 9: Formeln zur Berechnung der Konzentration der DNA-Standards

## 2.5 Primer und Sonden

Zuerst wurden *Forward*- und *Reverse* Primer und eine Sonde mit den MEGA7 und Geneious Programmen entwickelt. Dabei wurde auf die folgenden Kriterien geachtet: die Oligonukleotide sollten eine Länge von 30 bis 35 Nukleotide aufweisen, der GC-Gehalt sollte zwischen 30 – 70% liegen, und am 5'-Ende der Primer sollten sich wiederholende Guanine vermieden werden. Ein höherer Anteil an Cytosin am 5'-Ende und ein höherer Anteil an GC-Abfolgen am 3'-Ende verbessern dabei die Primer-Bindfähigkeit an die Doppelstrang-DNA. Außerdem sollte das gewählte Amplikon zwischen 100 und 300 Bp lang sein.

Um die RPA-Amplifikation analysieren zu können, ist der Einsatz einer Sonde nötig. Hierbei kann zwischen zwei unterschiedlichen Sonden gewählt werden. Die *formamidopyrimidine-ghycosylase*-Sonde (fpg-Sonde) wird in Kombination mit *Lateral-Flow*-Streifen verwendet und sorgt bei einer positiven Reaktion dafür, dass zwei Linien auf den Teststreifen sichtbar werden. Bei einer negativen Reaktion ist dagegen nur ein Streifen erkennbar. Eine *exo*-Sonde wird hingegen mit einem Fluorophor versehen, welches ein Fluoreszenzsignal abgibt und bei einer positiven Reaktion von einem Messgerät detektiert werden kann. Für die folgenden Versuche wurde eine *exo*-Sonde gewählt. Ein Tetrahydrofuran (THF) wurde 30 nt vom 5'-Ende aus hin-

zugefügt, welches auf der einen Seite mit dem dT-Quencher(dT-BHQ) und auf der anderen mit dem dT-Fluoreszenzfarbstoff(dT-FAM) begrenzt und markiert war. Am 3'-Ende wurde ein Phosphatrest als sogenannter 3'-Block angehängt. Er blockiert die Polymerase und dadurch die Amplifikation. Außerdem lässt er das Oligonukleotid nicht als Primer funktionieren, wenn das kurze Fragment der Sonde abgespalten ist.

In dieser Arbeit wurden acht Primer und eine Sonde für den 18S rRNA-RPA-Test, sechs Primer und eine Sonde für den Cpb-RPA-Test und zwei Primer und eine Sonde für den kDNA-RPA-Test von Tib MolBiol synthetisiert (Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7).

**Tabelle 5: Oligonukleotide für *Leishmania* Cpb-RPA**

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
<b>FP1</b>	CTTGCCGGCCACGGGCTGACGGCCCTGTGC
<b>FP2</b>	TCGGCAGCATCGAGTCGCAGTGGGCCCTTGC
<b>FP3</b>	GTGCTGGGCGTTCTCGGCGGTCGGCAGCAT
<b>RP1</b>	GAACGCCTGCAGCATCAGCCCGCCGCCGC
<b>RP2</b>	ATGTTTCGCAGCAGCCACTCGAACGCCTGCAGCA
<b>RP3</b>	TGTCCTCCGTGAACATGGTCCCGTTCATG
<b>P</b>	AGCATCAGCCCGCCGCCGCAACCATGTGTC (BHQ1-dT)(Tetrahydrofuran)(FAM-dT) GTCATCGCAGCTCA-Phosphat
<b>P:Sonde</b>	<b>FP und RP:</b> <i>Forward-</i> und <i>Reverse</i> Primer

Tabelle 6: Oligonukleotide für *Leishmania* 18S rRNA-RPA

Name	Sequenz (5' – 3')
FP1	TCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGATGATTAG
FP2	TACAGCGAAGGCATTTCTTCAAGGATACCTTCCTCA
FP3	GTCAGAGGTGAAATTTCTTAGACCGCACCAAGACG
FPy	TTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGC
RP1	GCCATAAGATCCCCAATTCATGGGTGTCATCG
RP2	GTGCTGACACAGGGTAAACCCTGCCGCAGGCCG
RP3	TGGTAAAAGCGGGCGCGGTGCTGACACAGGGTA
RPy	TGACACAGGGTAAACCCTGCCGCAGGCCGGCCCAT
P	TGTGGAGATCGAAGATGATTAGAGACCAT(BHQ1-dT)(Tetrahydrofuran)(FAM-dT) AGTCCACACTGCAA-Phosphat
P:Sonde	<b>FP und RP:</b> <i>Forward-</i> und <i>Reverse</i> Primer

Tabelle 7: Oligonukleotide für *Leishmania* kDNA-RPA

Name	Sequenz (5' – 3')
FP3	ATGGGCCAAAAACCCAAACTTTTCTGGTCCTC
RP3	CTCCACCCGACCCTATTTTACACCAACCCCCAGT
P	CGCCTCGGAGCCGAT(BHQ1-dT)(Tetrahydrofuran)(FAM-dT) TGGCATTTTTGGCTATTTTTTGAACGGGAT-Phosphat
P:Sonde	<b>FP und RP:</b> <i>Forward-</i> und <i>Reverse</i> Primer

## 2.6 gDNA-Proben

Im Folgenden aufgelistete gDNA-Proben wurden zur Validierung der RPA-Tests verwendet (Tabelle 8). Die DNAs wurden aus verschiedenen Stämmen bakterieller und parasitärer Pathogene isoliert und aus unterschiedlichen Quellen bezogen.



Tabelle 8: gDNA-Proben

gDNA-Proben	Stamm	Quelle
<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i>	Referenzstämme	Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland
<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	Referenzstämme	<i>American Type Culture Collection</i> , Manassas, USA
<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Referenzstämme	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
<i>L. tropica</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i> <i>L. braziliensis</i>	Referenzstämme	Carlos III-Institut, Zentrum für Mikrobiologie, Madrid, Spanien
<i>Nocardia asteroides</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Referenzstämme	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i> (DSMZ), Deutschland
<i>Plasmodium falciparum</i>	Referenzstamm	University of Ibadan, Nigeria
<i>Leptospira ballum</i>	Referenzstamm	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Deutschland
<i>Rickettsia africae</i> <i>Orientia tsutsugamushi</i>	Referenzstämme	Bernhard Nocht Institute, Hamburg, Deutschland
<i>Toxoplasma gondii</i>	Stamm NTE	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
<i>Trypanosoma brucei</i>	Stamm 427	Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg, Deutschland

## 2.7 Bestimmung der Nachweisgrenze anhand der Parasitenmenge

Um die minimal nachweisbare Leishmanien-Menge in dem *Leishmania* 18S rRNA-RPA zu bestimmen, wurden  $10^6$  *L. donovani*-Parasiten mit einer Mini-Spin-Zentrifuge 5 min bei 6000 U/min zentrifugiert, dann mit 1 ml PBS gemischt und nochmal mit einer Mini-Spin-Zentrifuge 5 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Davon wurden 20  $\mu$ l entnommen, um  $10^5$  Parasiten zu erhalten. Diese wurde dann seriell verdünnt (1:10), um  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  und  $10^0$  Parasiten zu erhalten. Die Extraktion der DNA aus den Parasiten wurde unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt. Mithilfe des Axxin-T16-ISO-Gerätes erfolgte ein RPA-Lauf mit 1  $\mu$ l DNA von  $10^3$  –  $10^0$  *L. donovani*-Parasiten.

## 2.8 Patientenmaterial

Die Patienten wurden in Endemiegebieten des indischen Subkontinents im Rahmen vorhergehender PCR Studien zur Diagnose der Leishmaniose rekrutiert. Sie waren im Alter zwischen 5 und 60 Jahren. Für Personen, die unter 18 Jahre alt waren, mussten Einwilligungserklärungen vom gesetzlichen Vertreter (Elternteil oder Erziehungsberechtigte) und die Zustimmung des teilnehmenden Minderjährigen vorliegen. Die Proben wurden aus Patienten mit VL, PKDL, CL und von gesunden Teilnehmern entnommen und archiviert. Daher handelt es sich nicht um eine prospektive Rekrutierung.

Durch ein unterschriebenes Einwilligungsverfahren bei der vorherigen Studie wurden die Patienten informiert und haben zugestimmt, dass die entnommenen Proben zu Forschungszwecken verwendet werden können. Die Einverständniserklärungen und der Einwilligungsprozess wurden vom Studienteam und dem PATH (Geldgeber für diese Studie mit der Unterstützung der *Gates Foundation*) überprüft. Die Dokumente wurden anonymisiert, es wurden keine persönlichen Daten im Rahmen dieser Studie aufgenommen.

In dieser Studie wurden 100 archivierte klinische Proben von 70 Leishmaniose-Patienten (25 VL-, 25 PKDL-, 20 CL-Proben) und 30 nicht infizierten Kontrollpatienten unter Verwendung des mobilen Kofferlabors getestet.

Die VL-Proben wurden von Patienten gewonnen, die länger als zwei Wochen an Fieber und Splenomegalie gelitten haben sowie eine positive rK39-RDT (*Rapid diagnostic test*) hatten. Der rK39-RDT ist ein immunochromatographischer Schnelltest basierend auf dem Nachweis von Antikörpern im Blut, wobei rK39 ein rekombinantes Protein mit einer repetitiven 39-Aminosäuresequenz ist. Die PKDL-Proben wurden von schon behandelten VL-Patienten

entnommen, wobei diese Patienten mindestens eine Hautläsion mit erhaltener Sensibilität der Haut gegenüber äußeren Reizen aufgewiesen haben und einen positiven rK39-RDT hatten. Die CL-Proben wurden von Patienten gewonnen, die eine chronisch rezidivierende Hautläsion zeigten sowie einen positiven real-time ITS1 (*internal transcribed spacer 1*)-PCR Test hatten. Die ITS1-PCR ist eine Nachweismethode von *Leishmania spp.*, wobei ITS1 eine Nukleotidsequenz zwischen den rRNA-Genen(rDNA) ist. Die Kontroll-Proben wurden von gesunden Probanden ohne VL, PKDL oder CL in der Vorgeschichte, klinisch gesund ohne Symptome einer schweren akuten oder chronischen Erkrankung und mit negativem rK39-RDT entnommen. Außerdem wurden während Operationen der Unfallchirurgie aus den Endmiegebieten Hautproben gewonnen. Diese wurden durch *Leishmania* real-time PCR Test negativ getestet. Die Vollblut-Proben wurden durch eine venöse Blutabnahme und die Haut-Proben wurden durch eine Hautstanze gewonnen, welche in die Haut geführt wurde und Gewebestücke entnommen wurden. Aus 200 µl Vollblut bzw. 25 mg Hautstanzenbiopsie wurde die DNA von Kollegen in den endemischen Gebieten unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits oder des DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die extrahierte DNA aus Blutproben von VL-Patienten wurde in AE Puffer bei -80°C und die extrahierte DNA aus Hautproben von CL-, PKDL-Patienten in AE Puffer bei -20°C gelagert.

Die Verwendung von menschlichen Biomaterialien im Rahmen dieser Studie wurde vom *Ethical Review Committee*(ERC), Dhaka, Bangladesch (Antragsnummer: PR-18023) und von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Antragsnummer: 26/9/2018).

## 2.9 RPA-Reaktionsablauf

Die RPA-Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl unter Verwendung eines TwistAmp™ exo Kits durchgeführt. Die 0,5 ml Reaktionsgefäße enthielten bereits getrocknete Reaktionspellet. Dazu wurden pro Reaktion 2,1 µl von jedem Primer (10 µM Stammlösungen) mit Endkonzentration von 420 nM, 0,6 µl FAM-markierte RPA-Sonde (10 µM Stammlösung) mit einer Endkonzentration von 120 nM, 29,5 µl Rehydrationspuffer und 8,2 µl H<sub>2</sub>O gegeben.

Im Deckel der Reaktionsröhrchen wurden 2,5 µl Magnesiumacetat mit einer Endkonzentration von 280 mM pipettiert. 5 µl vom Template wurden mit dem Vortexer gemischt, mit einer Mini-Spin-Zentrifuge zentrifugiert und in das Reaktionsgemisch gegeben.

Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert, die Lösung zehnmals mit einem Vortexer kräftig gemischt und anschließend erneut 20 Sekunden lang zentrifugiert, bevor sie im ESEQuant Tube Scanner bei 42°C inkubiert werden. Bei einem Experiment wurde statt eines ESEQuant

Tube Scanners ein Axxin-T16-ISO-Gerät verwendet, das ähnlich funktioniert und eine ähnliche Sensitivität aufweist. Nach etwa 230 Sekunden wurden die Reaktionsgefäße aus dem ESEQuant Tube Scanner- bzw. dem Axxin-T16-ISO-Gerät entnommen, mit einem Vortexer gemischt, zentrifugiert und dann zurückgesteckt um das Scannen für insgesamt 15 Minuten abzuschließen.

## 2.10 Multiplex-RPA-Test von *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* kDNA-RPA

Für einen Multiplextest wurde der in dieser Arbeit neu entwickelte *Leishmania* 18S RNA-RPA-Test mit dem von unserer Gruppe schon publizierten *Leishmania* kDNA-RPA-Test kombiniert. *Leishmania* kDNA-RPA detektiert das Zielgen kinetoplast minicircle DNA (kDNA, GenBank *accession number*: Y11401.1) von *L. donovani*, *L. major*, *L. aethiopica* und *L. infantum* aber nicht von *L. tropica*, *L. amazonensis* und *L. braziliensis* (Mondal et al. 2016).

Die Reaktionsgefäße enthielten bereits getrocknete Reaktionspellet. Dazu wurden für eine Reaktion je 2,1 µl von Primer FPy und RPy des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests und je 2,1 µl von FP3 und RP3 des *Leishmania* kDNA-RPA-Tests (10 µM) mit einer Endkonzentration von 420 nM, 0,6 µl FAM-markierte RPA-Sonde des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests und 0,6 µl FAM-markierte RPA-Sonde des *Leishmania* kDNA-RPA-Tests (10 µM) mit einer Endkonzentration von 120 nM, 29,5 µl Rehydrationspuffer und 3,4 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Der weitere Versuchsablauf war identisch wie der bereits oben Beschriebene.

## 2.11 *Leishmania* Cpb-RPA-Test in Gegenwart von Block-Primern

Block-Primer können eine Amplifikation verhindern. Der Block-Primer bindet dabei an die komplementären DNA-Einzelstrangnukleotide der Sonde oder die des richtigen Primers. Dadurch können Sonde oder Primer nicht mehr binden und es wird eine Amplifikation oder ein Signal verhindert. So wurde in dieser Arbeit versucht, verschiedene *Leishmania*-Spezies mittels *Leishmania* Cpb-RPA spezifisch nachzuweisen.

Es wurde ein Block-Primer entwickelt, der die Amplifikation von *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi* blockiert. Wenn die Amplifikation der drei *Leishmania*-Arten verhindert wird, könnte die Spezifität der Amplifikation von anderen *Leishmania*-Spezies erhöht werden. Prinzipiell könnte mit Hilfe weiterer Block-Primer dann die Amplifikation nur einer *Leishmania*-Art erreicht werden.

Die Reaktionsgefäße enthielten bereits getrocknete Reaktionspellets. Dazu wurden für eine Reaktion je 2,1 µl von Primer FP2 und RP1 des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests und 2,1 µl von Block-LD (CGCCGTTGCAG[Phosphat]) mit einer Endkonzentration von 420 nM, 0,6 µl FAM-markierte RPA-Sonde des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests mit einer Endkonzentration von 120 nM, 29,5 µl Rehydrationspuffer und 6,1 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie bereits oben beschrieben.

## 2.12 PflMI- und EcoO109I-Restriktionsenzyme

Mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen und einem anschließenden *Leishmania* Cpb-RPA-Test wurde untersucht, ob nur eine *Leishmania*-Art spezifisch nachgewiesen werden konnte.

Das Enzym PflMI erkennt eine spezifische Nukleotidsequenz bei *L. donavoni*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* und *L. mexicana* aber nicht bei *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* und *L. guyanensis* und schneidet daher DNA von *L. donavoni*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* und *L. mexicana* aber nicht DNA von *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* und *L. guyanensis* (Tabelle S1). Wenn nach Restriktionsverdau und anschließendem RPA-Test die Amplifikation von *L. donavoni*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* und *L. mexicana* verhindert wird, könnte prinzipiell mit Hilfe von weiteren Restriktionsenzymen dann die Amplifikation nur einer *Leishmania*-Art erreicht werden. Das Enzym EcoO109I erkennt eine spezifische Nukleotidsequenz von *L. tropica*, und es schneidet daher nur *L. tropica*-DNA (Tabelle S1). Wenn nach Restriktionsverdau und anschließendem RPA-Test bei allen Spezies außer *L. tropica* (EcoO109I) eine Amplifikation stattfindet, könnte der *Leishmania* Cpb-RPA spezifisch nur für *L. tropica* durchgeführt werden.

1 µg DNA der verschiedenen *Leishmania*-Arten wurde mit 1 µl Restriktionenzym, 5 µl 10 x NEBuffer™ 3.1 (PflMI) bzw. 10 x CutSmart® Buffer (EcoO109I) und 43 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Die Mischung wurde zunächst bei einer Temperatur von 37°C für 30 Minuten inkubiert und danach bei 65°C für 20 Minuten. Am Ende wurde ein RPA-Lauf mit und ohne vorherigen Restriktionsverdau der DNA durchgeführt.

## 2.13 CRISPR/Cas

Die CRISPR/Cas-Methode (CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, Cas: *CRISPR-associated protein*) ist eine Methode, um spezifische DNA-Sequenzen molekularbiologisch zu schneiden und zu modifizieren. Ihr liegt ein adaptiver antiviraler Abwehrmechanismus von Bakterien zugrunde. Mit dieser Methode können Nukleotide entfernt oder eingefügt werden, und das führt letztendlich zur Modifikation der Gene (Jinek et al. 2012). CRISPR/Cas

könnte zukünftig auch zur Therapie genetisch bedingter Erkrankungen verwendet werden (Wang et al. 2013; Sampson und Weiss 2014).

In dieser Studie wurde mit CRISPR/Cas 12a (oder Cpf1) und dem *Leishmania* Cpb-RPA-Test versucht, die verschiedenen *Leishmania*-Spezies spezifisch nachzuweisen, indem DNA-Sequenzen molekularbiologisch gezielt geschnitten wurden, um so eine Amplifikation zu verhindern. Wenn man die Unterschiede zwischen den Sequenzen der *Leishmania*-Spezies im Bereich des Amplikons betrachtet, kann folgende Überlegung angestellt werden: Wenn sowohl crRNA 1 und crRNA 2 *L-tropica*-DNA und nicht die DNA anderer *Leishmania spp.* schneiden und dadurch keine Amplifikation mit *L-tropica*-DNA stattfindet (negativer Test bzw. kein Signal), dann könnte der *Leishmania* Cpb-RPA spezifisch nur für *L. tropica* durchgeführt werden (Tabelle 9, Tabelle S2).

Zunächst wurden zwei RNPs(Ribonukleoprotein)-Komplexe vorbereitet, indem 2 µl Cas12a (Cpf1) mit einer Endkonzentration von 126 pmol mit 1,6 µl crRNA 1 (RNP-Komplex 1) bzw. crRNA 2 (RNP-Komplex 2) mit Endkonzentration von 160 pmol gemischt wurden. Dazu wurde pro RNP-Komplex 1,4 µl PBS gegeben. Das Gesamtvolumen von 5 µl pro RNP-Komplex galt dabei für eine einzelne Reaktion. Die RNP-Komplexe wurden bei Raumtemperatur für 10 bis 20 Minuten inkubiert.

Danach wurde 1 µl von RNP-Komplex 1 (crRNA 1) bzw. RNP-Komplex 2 (crRNA 2), 1 µl von *L-tropica*-DNA mit einer Endkonzentration von 126 pmol, 1 µl PBS und 7 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Das Gesamtvolumen von 10 µl RNP-Komplex 1- bzw. RNP-Komplex 2-behandelter DNA (CRISPR 1 bzw. CRISPR 2) wurde bei 37°C für 60 min inkubiert. Am Ende wurde ein RPA-Lauf mit CRISPR 1 (RNP-Komplex 1 behandelte *L-tropica*-DNA), CRISPR 2 (RNP-Komplex 2 behandelte *L-tropica*-DNA) und *L-tropica*-DNA durchgeführt.

**Tabelle 9: Oligonukleotide für CRISPR/Cas**

Name	Sequenz (5' – 3')
crRNA 1	CAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAA
crRNA 2	TTGCCGGCCACGGGCTGACGGCCCTGT

## 2.14 Semi-logarithmische- und Probit-Regressionsanalyse

Bei der semi-logarithmischen Analyse wurde in mehreren Versuchsläufen die Detektionszeit bei verschiedenen DNA-Konzentrationen bestimmt. Die semi-logarithmische Regressionsana-

lyse wurde mit Prism 4.0a (Graphpad Software Inc., San Diego, Kalifornien) und Microsoft Excel durchgeführt.

Da RPA-Tests binäre Ergebnisse produzieren (positiv oder negativ), wurde für die statistische Auswertung auch das Probit-Modell gewählt (McCulloch und Searle 2001).

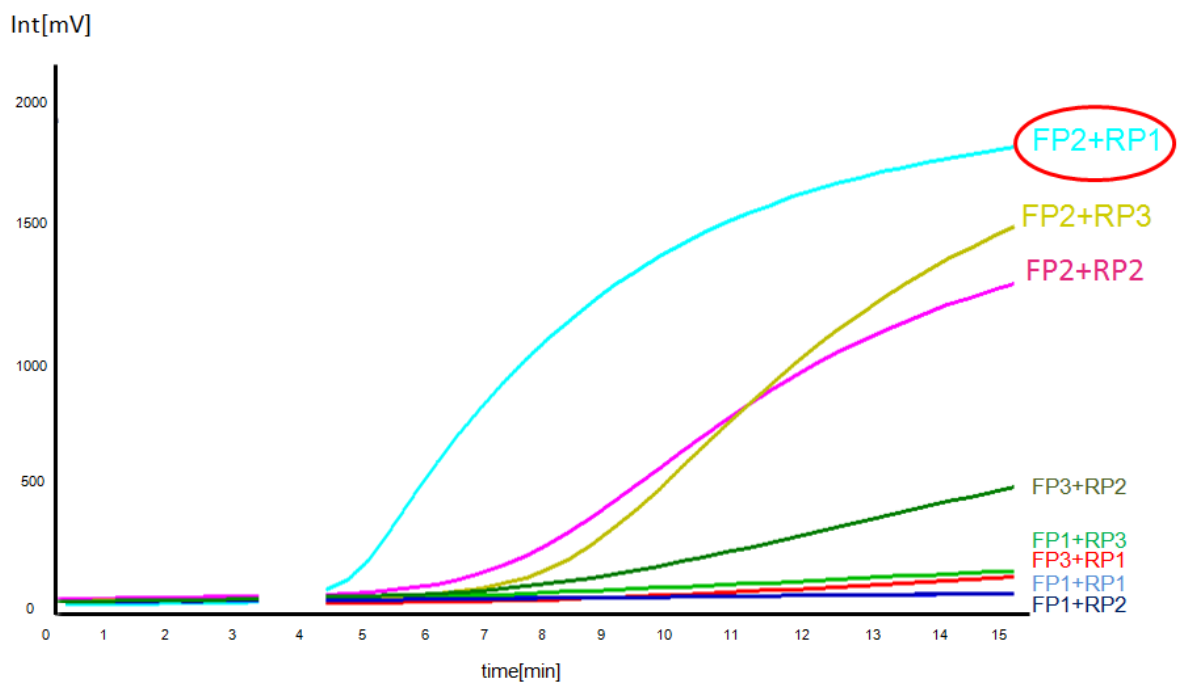
Im Probit-Modell wird eine S-förmige Kurve erstellt. Diese ist eine Verteilungsfunktion einer Gauß'schen Normalverteilung  $\varphi$  durch den Zusammenhang zwischen der Anzahl der eingesetzten Moleküle und dem Anteil der positiven Tests. Die Kurve hat die Funktion  $P = \varphi(a \cdot x + b)$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis des Testes ist, a zeigt die Steigung der Kurve an und b stellt die Verschiebung der Kurve auf der Abszissenachse dar. Auf Grundlage der modellierten Kurve wird in einem zweiten Schritt ein Erwartungswert geschätzt, bei dem 95% der RPA-Läufe positiv sind. Dies zeigte die Anzahl der DNA-Moleküle an, die ein Test auf Grundlage der durchgeführten Messungen in 95% der RPA-Läufe nachweist. Die Probit-Regressionsanalyse wurde mit Statistica 9 (StatSoft, Hamburg, Deutschland) und Microsoft Excel durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Primer-Kombinationen

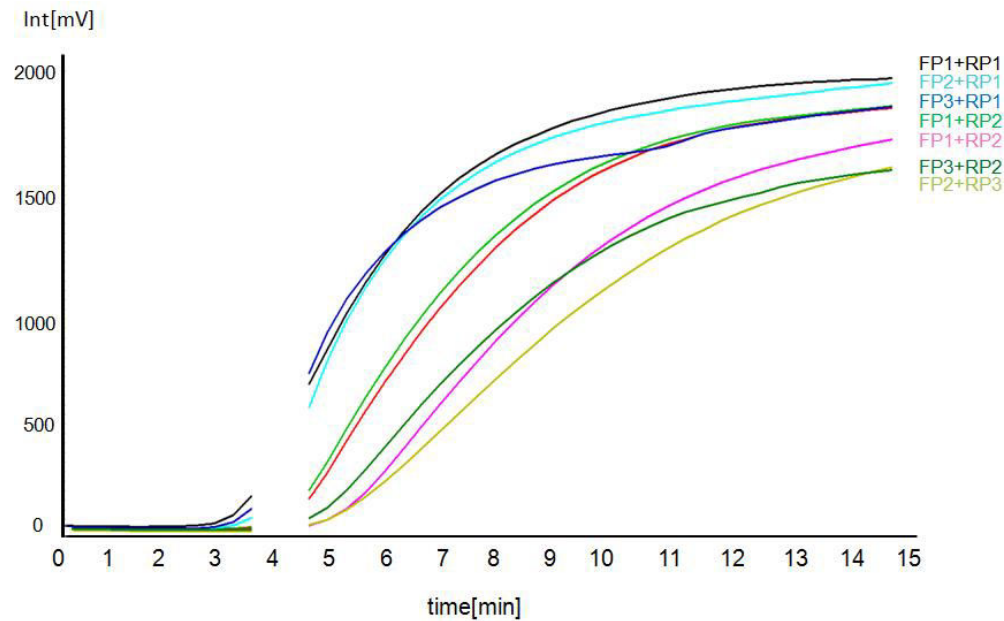
Um die besten Primer-Kombinationen des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests und des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests zu finden, wurde eine Amplifikation von DNA-Standards mit verschiedenen Primerpaaren getestet.

Für den *Leishmania* Cpb-RPA lieferte die Kombination von FP2 und RP1 die besten Ergebnisse (Abbildung 10). Für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA zeigten viele Primerpaare gute Ergebnisse, aber die Kombination von FPy und RPy wurde ausgesucht, weil diese im Vergleich zu anderen Kombinationen nicht auch die Trypanosomen-DNA amplifizierte (Abbildung 11 und Abbildung 12). Trypanosomen haben ähnliche DNA-Sequenzen wie Leishmanien.

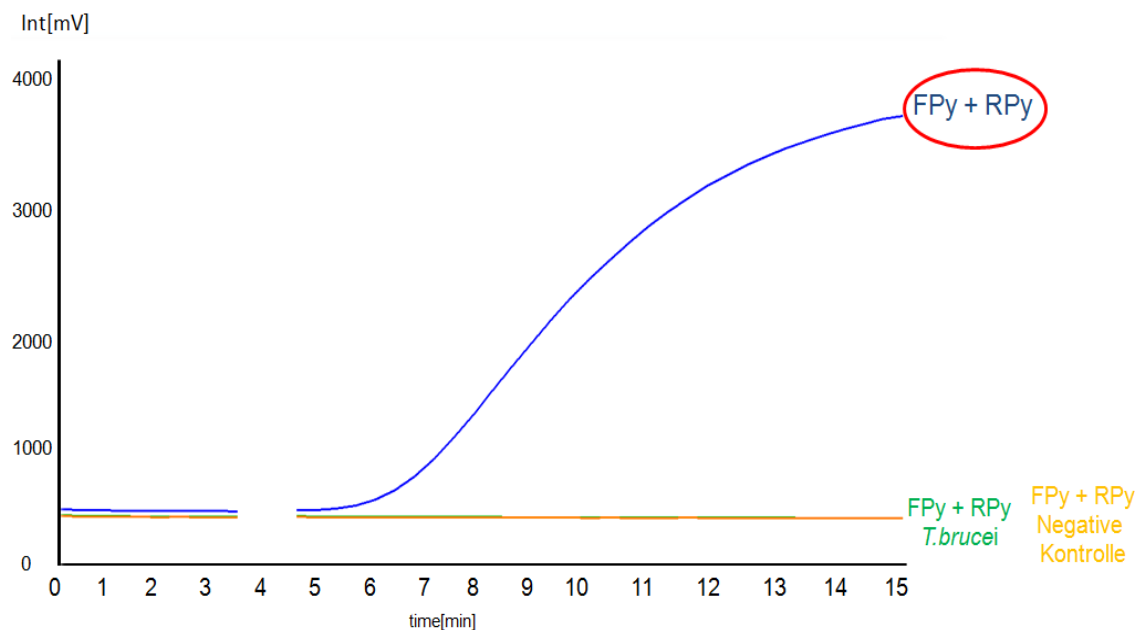


**Abbildung 10: Verschiedene Primer-Kombinationen für *Leishmania* Cpb-RPA.** Acht Primer-Kombinationen wurden mit einem RPA-Lauf unter Anwesenheit von  $10^5$  DNA-Molekülen/Reaktion des Cpb-DNA-Molekülstandards getestet. Das optimale Primerpaar FP2 und RP1 wurde für die weiteren Messungen verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit gleichen Ergebnissen durchgeführt.





**Abbildung 11: Verschiedene Primer-Kombinationen für *Leishmania* 18S rRNA-RPA.** Sieben Primer-Kombinationen wurden mit einem RPA-Lauf unter Anwesenheit von  $10^5$  DNA-Molekülen/Reaktion des 18S rRNA-DNA-Molekülstandards getestet. Viele Primerpaare zeigten gute Ergebnisse. Zwischen 4 und 5 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit gleichen Ergebnissen durchgeführt.



**Abbildung 12: Die Primer-Kombination FPy und RPy für *Leishmania* 18S rRNA-RPA führte zu keiner Amplifikation von *T.brucei*-DNA.** Die Primer-Kombination von FPy und RPy wurde mit einem RPA-Lauf unter Anwesenheit von  $10^5$  DNA-Molekülen/Reaktion des *Leishmania* 18S rRNA-DNA-Molekülstandards, *T. brucei* gDNA und  $H_2O$  für die negative Kontrolle getestet. Das Primerpaar FPy und RPy wurde für die weiteren Messungen verwendet. Zwischen 4 und 5 min wurde keine Fluoreszenzaufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit gleichen Ergebnissen durchgeführt.

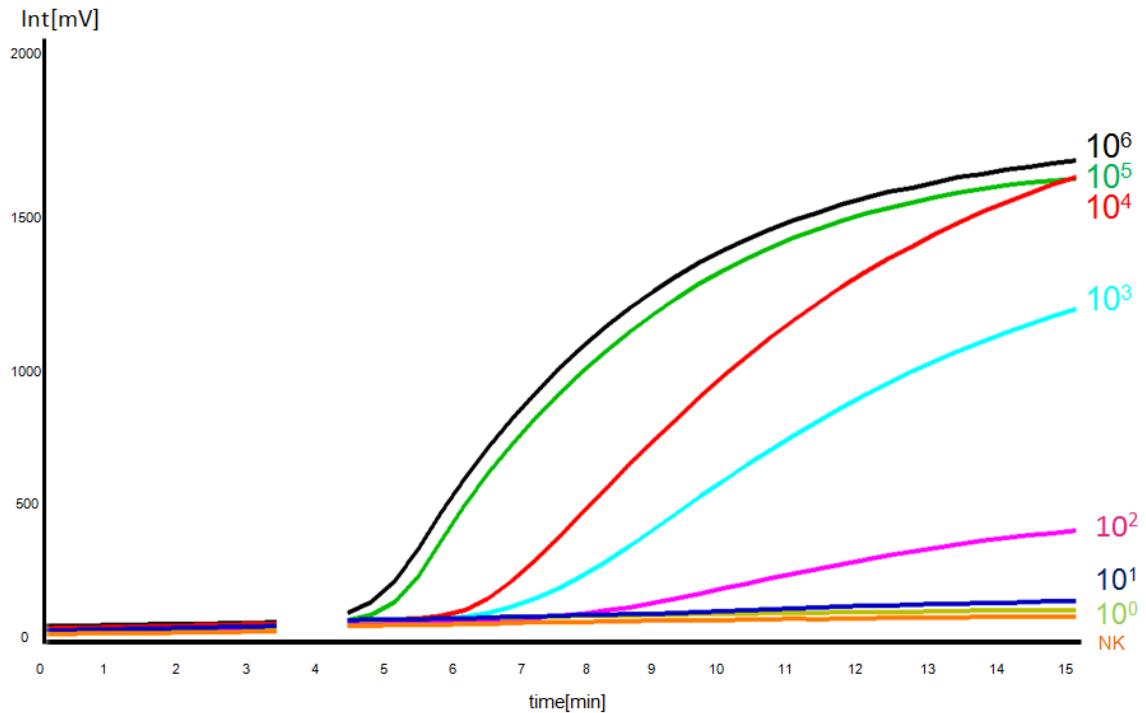
### 3.2 Analytische Sensitivität

Um die analytische Sensitivität des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests und des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen mit Konzentrationen zwischen  $10^7$  bzw.  $10^6$  und  $10^1$  bzw.  $10^0$  Molekülen/Reaktion des molekularen DNA-Standards achtmal getestet (Abbildung 13, Abbildung 14, Tabelle 10 und Tabelle 11). Für den *Leishmania* Cpb-RPA-Test wurde bei bis zu  $10^2$  DNA-Molekülen/Reaktion ein Signal detektiert und für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Test bei bis zu  $10^1$  DNA-Molekülen/Reaktion.

Für die Darstellung der analytischen Sensitivität des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests und des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests wurden eine semi-logarithmische- und eine Probit-Regressionsanalyse durchgeführt, indem die Zeit bis zum Erreichen des RPA-Thresholds bzw. die Nachweisgrenze gegen die Anzahl der detektierten Moleküle mit Prism 4.0a und Statistica 9 aufgetragen wurden.

Für den *Leishmania* Cpb-RPA wurden  $10^3 - 10^2$  DNA-Moleküle/Reaktion in acht von acht Läufen und  $10^1$  DNA-Moleküle/Reaktion in vier von acht Läufen nachgewiesen (Tabelle 10 und Abbildung 15). Die Nachweisgrenze betrug rechnerisch in 95% der Reaktionen 17 DNA-Moleküle/Reaktion (Abbildung 17).

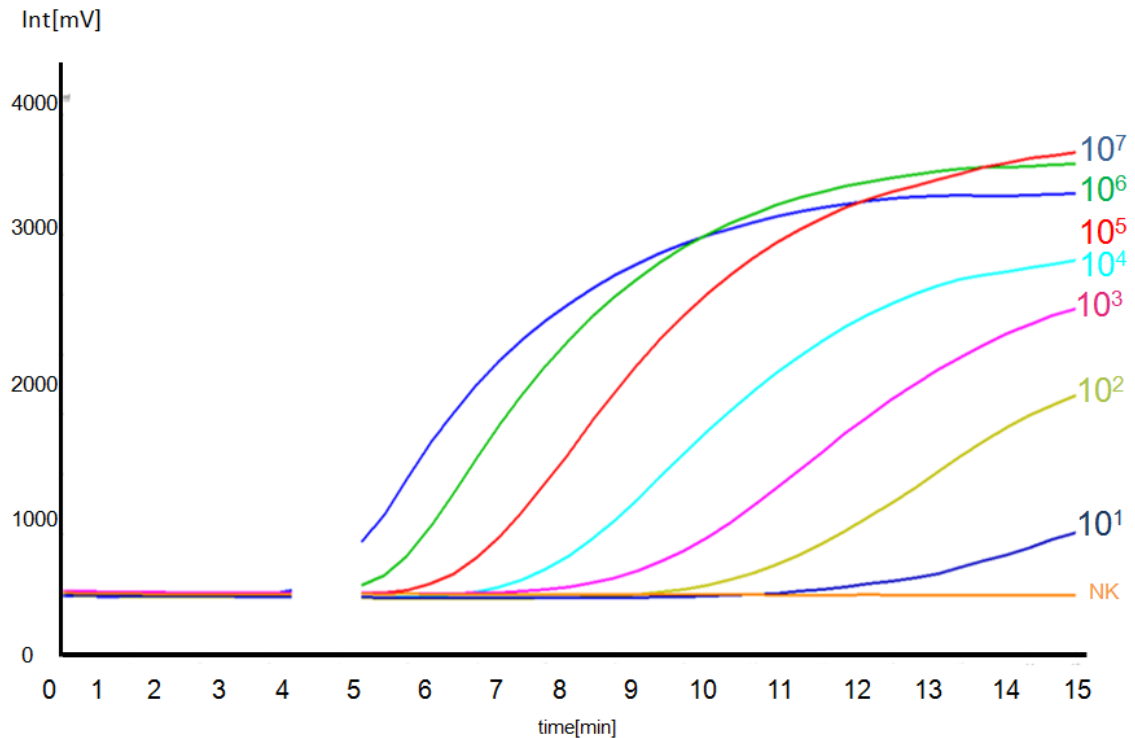
Für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurden  $10^7 - 10^2$  DNA-Moleküle/Reaktion in acht von acht Läufen und  $10^1$  DNA-Moleküle/Reaktion in sieben von acht Läufen nachgewiesen (Tabelle 11 und Abbildung 16). Die Nachweisgrenze betrug rechnerisch in 95% der Reaktionen zwölf DNA-Moleküle/Reaktion (Abbildung 18).



**Abbildung 13: Fluoreszenzentwicklung in einem RPA-Lauf unter Verwendung von  $10^6$ – $10^0$  DNA-Molekülen/Reaktion des Cpb-DNA-Molekülstandards.** Der RPA-Lauf wurde unter Anwesenheit von  $10^6$ – $10^0$  DNA-Molekülen/Reaktion des Cpb-DNA-Molekülstandards durchgeführt. Bei bis zu  $10^2$  DNA-Molekülen/Reaktion wurde ein Signal detektiert. Für die negative Kontrolle (NK) wurde  $H_2O$  verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

**Tabelle 10: Darstellung der Detektionszeit des Signals (in Minuten) bei acht Läufen mit einer Konzentration von  $10^3$ – $10^0$  Cpb-DNA-Molekülen/Reaktion des molekularen DNA-Standards**

Konzentration (DNA-Moleküle/Reaktion)	1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf	4. Lauf	5. Lauf	6. Lauf	7. Lauf	8. Lauf
$10^0$	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
$10^1$	neg	neg	7	neg	7,7	6,7	neg	9,3
$10^2$	7	6	6,3	6,3	7	6,3	6,3	6,7
$10^3$	6	5,3	5,7	6	5,7	5,7	5,7	5,7



**Abbildung 14: Fluoreszenzentwicklung in einem RPA-Lauf unter Verwendung von  $10^7$  –  $10^1$  DNA-Molekülen/Reaktion des 18S rRNA-DNA-Molekülstandards.** Der RPA-Lauf wurde unter Anwesenheit von  $10^7$  –  $10^1$  DNA-Molekülen/Reaktion des 18S rRNA-DNA-Molekülstandards durchgeführt. Bei bis zu  $10^1$  DNA-Molekülen/Reaktion wurde ein Signal detektiert. Für die negative Kontrolle (NK) wurde  $H_2O$  verwendet. Zwischen 4 und 5 min wurde keine Fluoreszenzaufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

**Tabelle 11: Darstellung der Detektionszeit des Signals (in Minuten) bei acht Läufen mit einer Konzentration von  $10^7$  –  $10^1$  18S rRNA-DNA-Molekülen/Reaktion des molekularen DNA-Standards**

Konzentration (DNA- Moleküle/Reaktion)	1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf	4. Lauf	5. Lauf	6. Lauf	7. Lauf	8. Lauf
$10^1$	8,7	9,3	10	11,3	10	10	11	neg
$10^2$	7,7	7,7	7,7	8,3	8,7	8,7	8,7	9
$10^3$	6	6,7	6,3	6,7	7	6,7	6,7	6,7
$10^4$	5,7	5,7	5,7	5,7	6	6	5,7	6
$10^5$	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
$10^6$	3,3	5,3	3,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
$10^7$	2,7	3	2,7	3	3	3	3	3

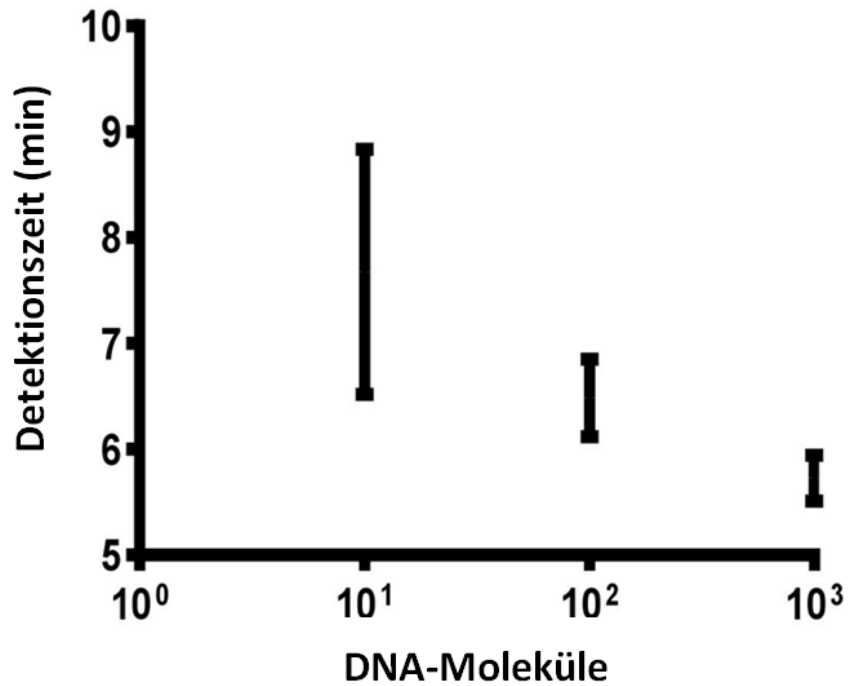


Abbildung 15: Detektionszeit für den *Leishmania* Cpb-RPA-Test. Zur Bestimmung der Detektionszeit wurde mit Hilfe von Prism Software eine semi-logarithmische Regression aus den Ergebnissen von acht Durchläufen mit Konzentrationen zwischen  $10^3$  –  $10^0$  Cpb-DNA-Molekülen/Reaktion berechnet.

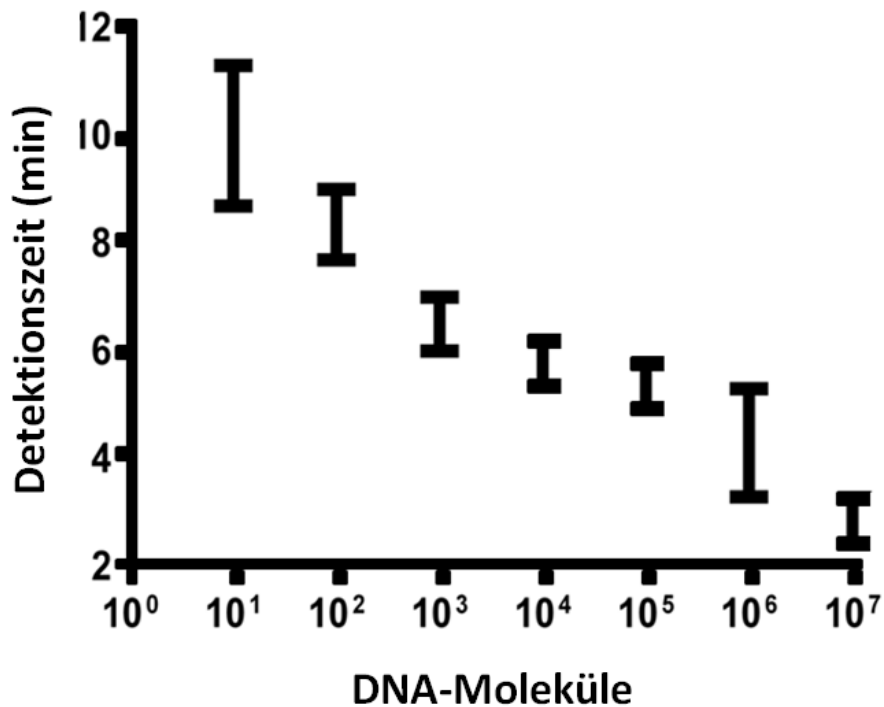


Abbildung 16: Detektionszeit für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Test. Zur Bestimmung der Detektionszeit wurde mit Hilfe von Prism Software eine semi-logarithmische Regression aus den Ergebnissen von acht Durchläufen mit Konzentrationen zwischen  $10^7$  –  $10^1$  18S rRNA-DNA-Molekülen/Reaktion berechnet.

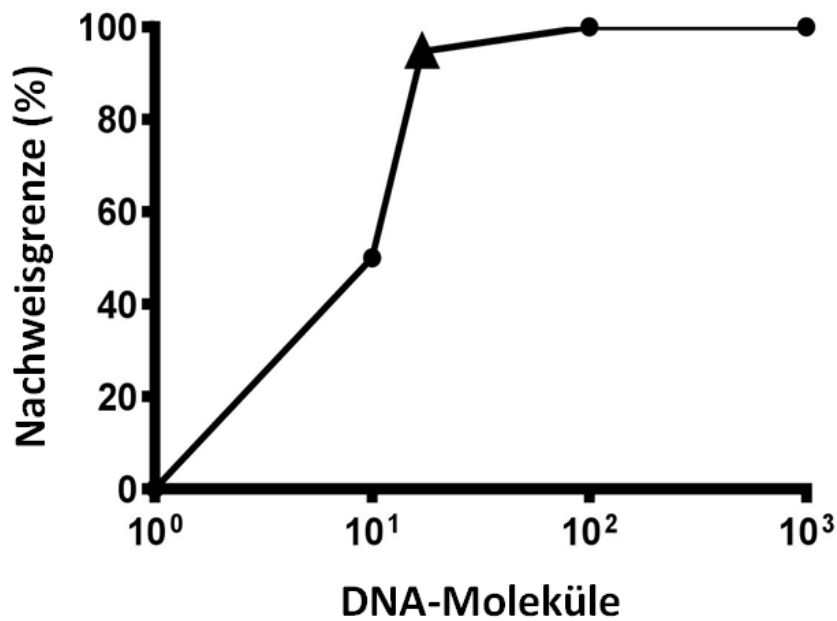


Abbildung 17: Probit-Regressionsanalyse für den *Leishmania* Cpb-RPA-Test. Auf Grundlage der Daten von acht RPA-Läufen mit Konzentrationen zwischen  $10^3$  –  $10^0$  Cpb-DNA-Molekülen/Reaktion wurde die Nachweisgrenze in 95% der Reaktionen (17 DNA-Moleküle) berechnet. Sie ist durch ein Dreieck dargestellt.

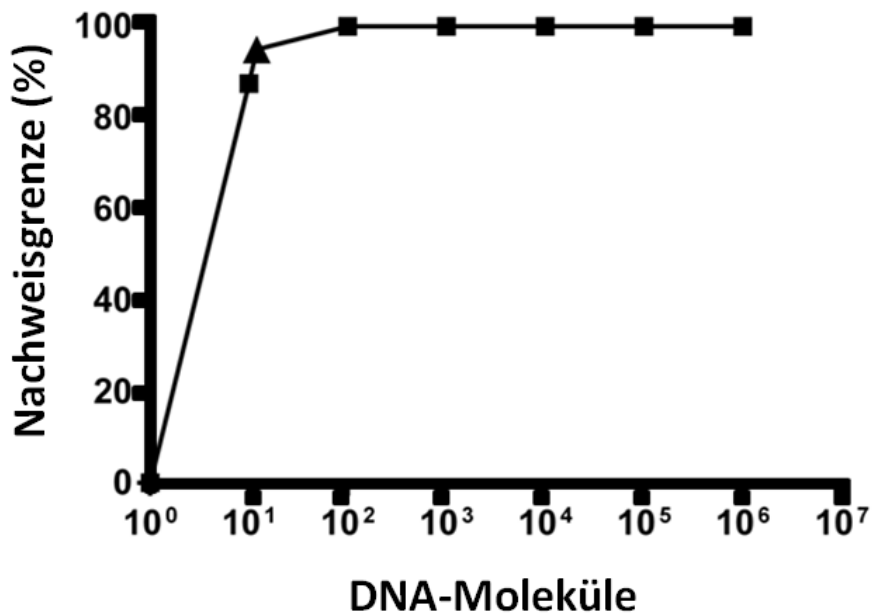
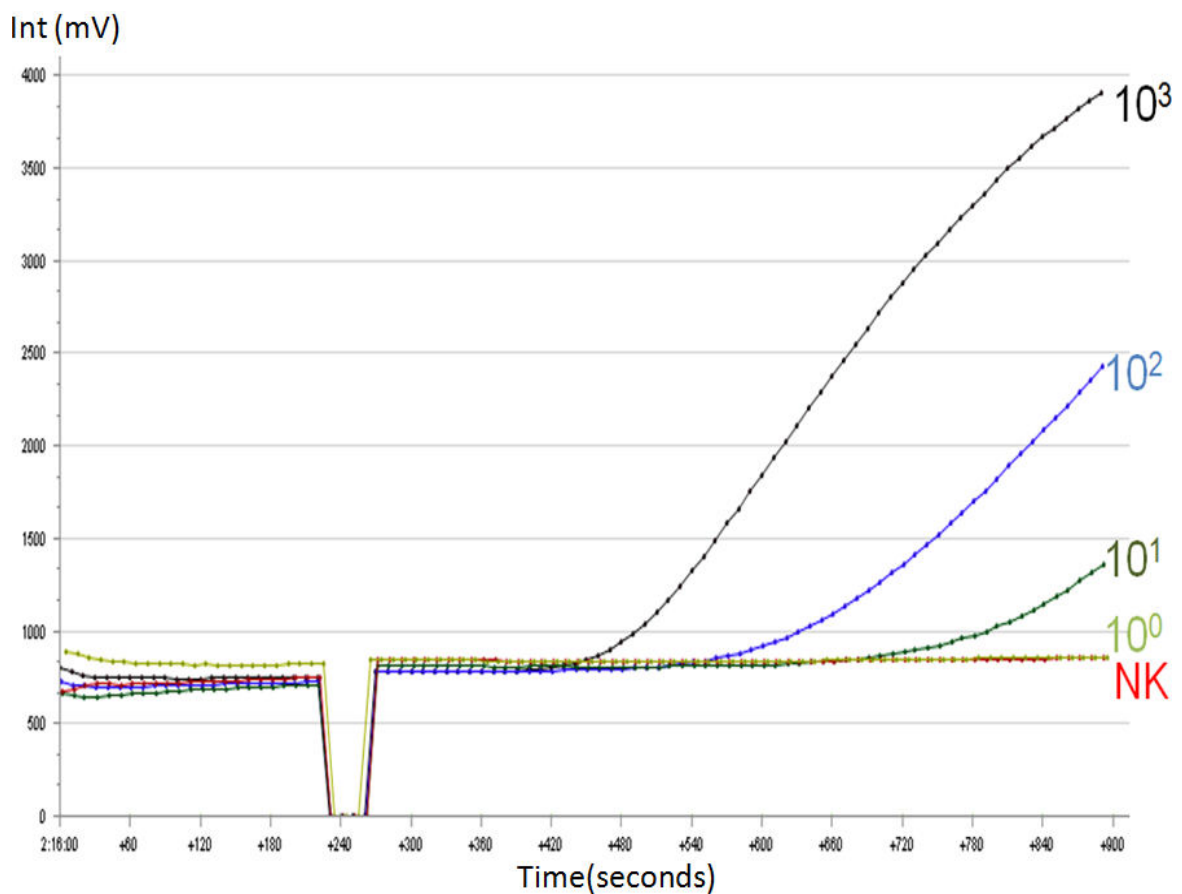


Abbildung 18: Probit-Regressionsanalyse für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Test. Auf Grundlage der Daten von acht RPA-Läufen mit Konzentrationen zwischen  $10^7$  –  $10^1$  18S rRNA-DNA-Molekülen/Reaktion wurde die Nachweisgrenze in 95% der Reaktionen (zwölf DNA-Moleküle) berechnet. Sie ist durch ein Dreieck dargestellt.

### 3.3 Nachweisgrenze von Parasiten mittels *Leishmania* 18S rRNA-RPA

Klinisch ist es wichtig, die Nachweisgrenze von Parasiten zu kennen. Deswegen wurde nach der Berechnung der Nachweisgrenze des *Leishmania* 18S rRNA-RPAs anhand von DNA-Molekülen, die Nachweisgrenze des Tests anhand von unterschiedlichen Parasitenmengen mit Hilfe des Axxin-T16-ISO-Gerätes bestimmt (siehe 2.7). Die Sensitivität des Axxin-T16-ISO-Gerätes ist mit der des ESEQuant-Tube-Scanner-Gerätes vergleichbar. Für diesen Versuch wurde die genomische DNA unterschiedlicher Mengen von *L. donovani* verwendet.

Bei 1000 Parasiten wurde eine Reaktionszeit von etwa 8 min benötigt um ein Signal zu detektieren, bei 100 Parasiten eine Reaktionszeit von 9 min und bei zehn Parasiten eine Reaktionszeit von 12 min. Ein Parasit ( $10^0$ ) reichte für ein positives Signal nicht aus (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Die Nachweisgrenze von *Leishmania*-Parasiten durch *Leishmania* 18S rRNA-RPA. Mit Hilfe des Axxin-T16-ISO-Gerätes erfolgte ein RPA-Lauf mit  $10^3$  –  $10^0$  *L. donovani*-Parasiten. Für die negative Kontrolle (NK) wurde  $H_2O$  verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

### 3.4 Spezifität der RPA-Nachweise

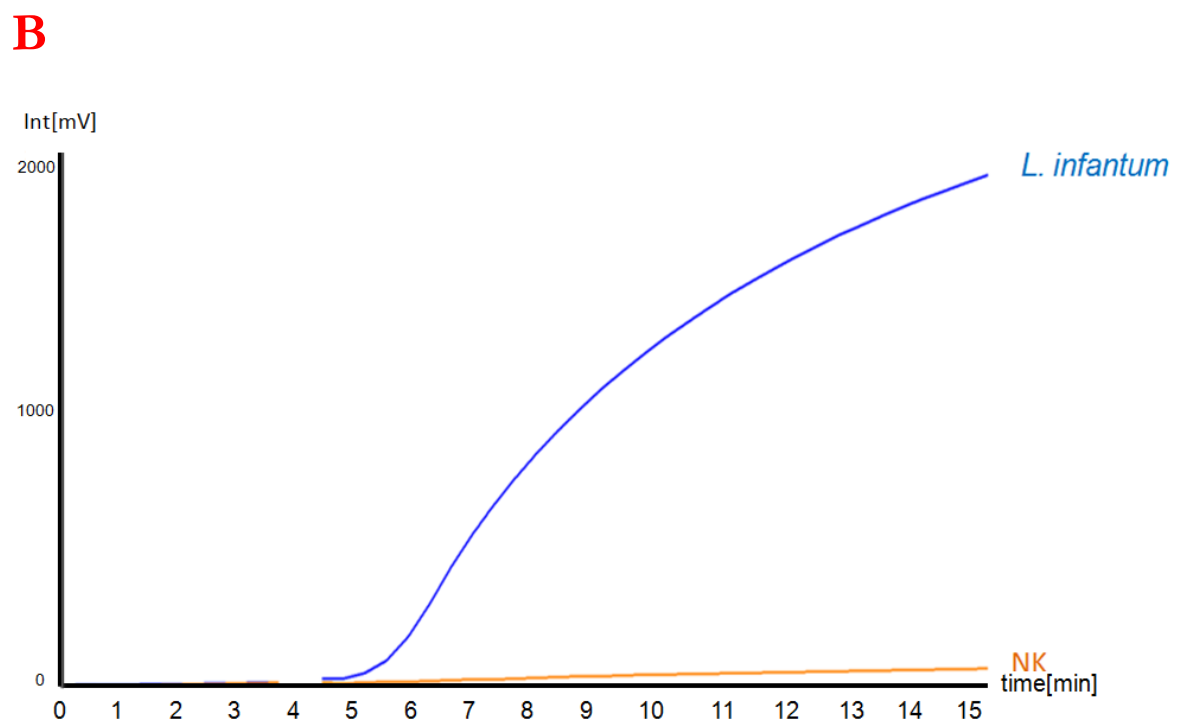
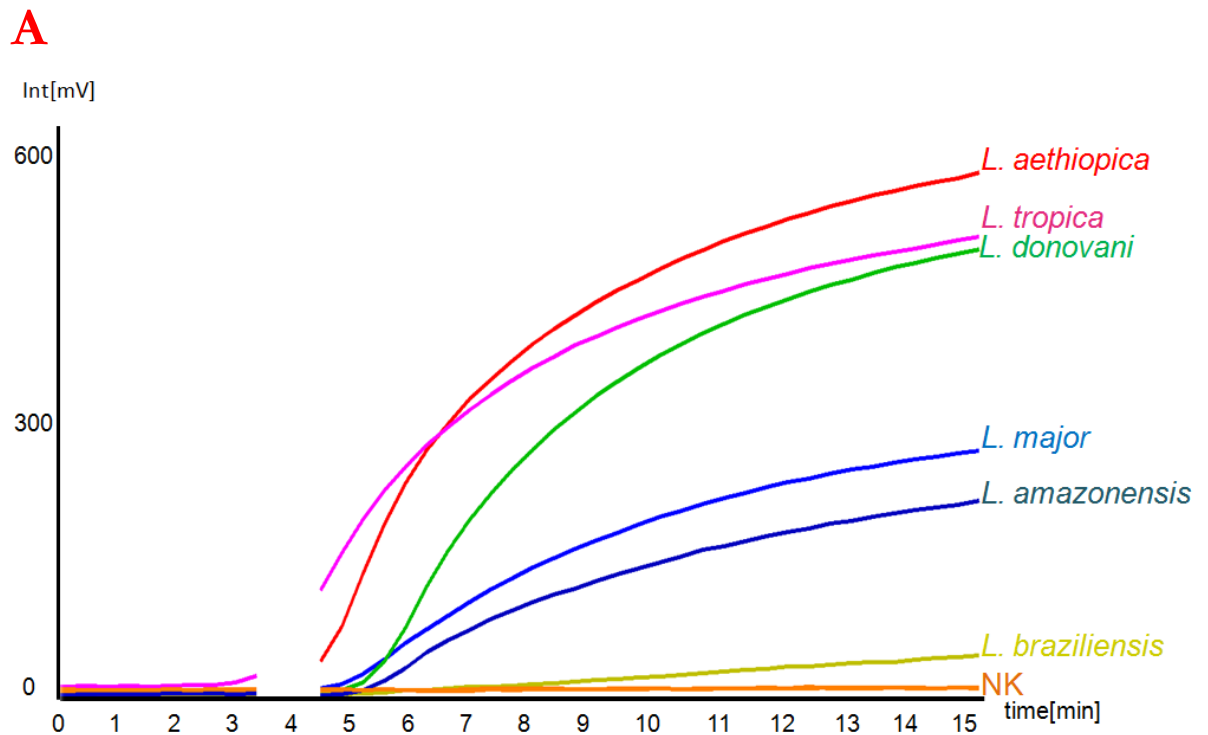
Um die Spezifität der RPA-Nachweise zu bestimmen, wurde genomische DNA verschiedener *Leishmania*-Arten mit einer Konzentration zwischen 40 und 100 ng/ $\mu$ l amplifiziert. Der *Leishmania* Cpb-RPA-Test war bei *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. aethiopica*, *L. tropica* und *L. amazonensis* positiv, aber bei *L. braziliensis* nur schwach positiv (Abbildung 20 und Tabelle 12). Der Nachweis von verschiedenen *Leishmania*-Arten mit den gleichen Primern und Sonden liegt daran, dass die RPA-Primer und die Sonde in der Lage sind, Zielgene auch mit fünf bis neun *mismatches* innerhalb der einzelnen Oligonukleotide zu amplifizieren und nachzuweisen. Bei *L. braziliensis* wurden je nach Parasitenstamm bis zu sechs *mismatches* für FP2, bis zu sechs *mismatches* für RP1 und bis zu zwölf *mismatches* für die Sonde gefunden (Tabelle S6). Eine BLAST-Suche der Primer und Sonde des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests ergab eine Ähnlichkeit zwischen 87% und 100% für FP2, zwischen 93% und 100% für RP1 und zwischen 87% und 100% für die RPA-Sonde zu den Sequenzen der unterschiedlichen *Leishmania*-Arten (Tabelle S6).

Mit dem *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Test wurden alle getesteten *Leishmania*-Spezies nachgewiesen (Abbildung 21 und Tabelle 12). Hier waren keine *mismatches* in der Zielsequenz der unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies im Vergleich zu Primern und Sonde bzw. zum 18S rRNA-DNA-Standard aus *L. tropica* zu finden (Tabelle S5).

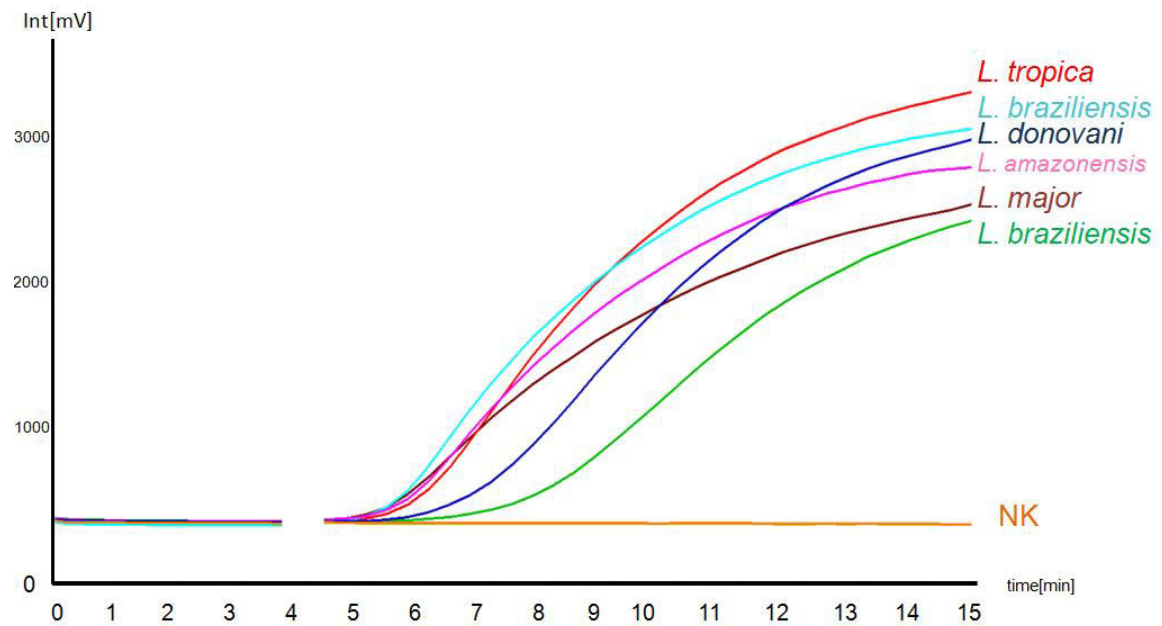
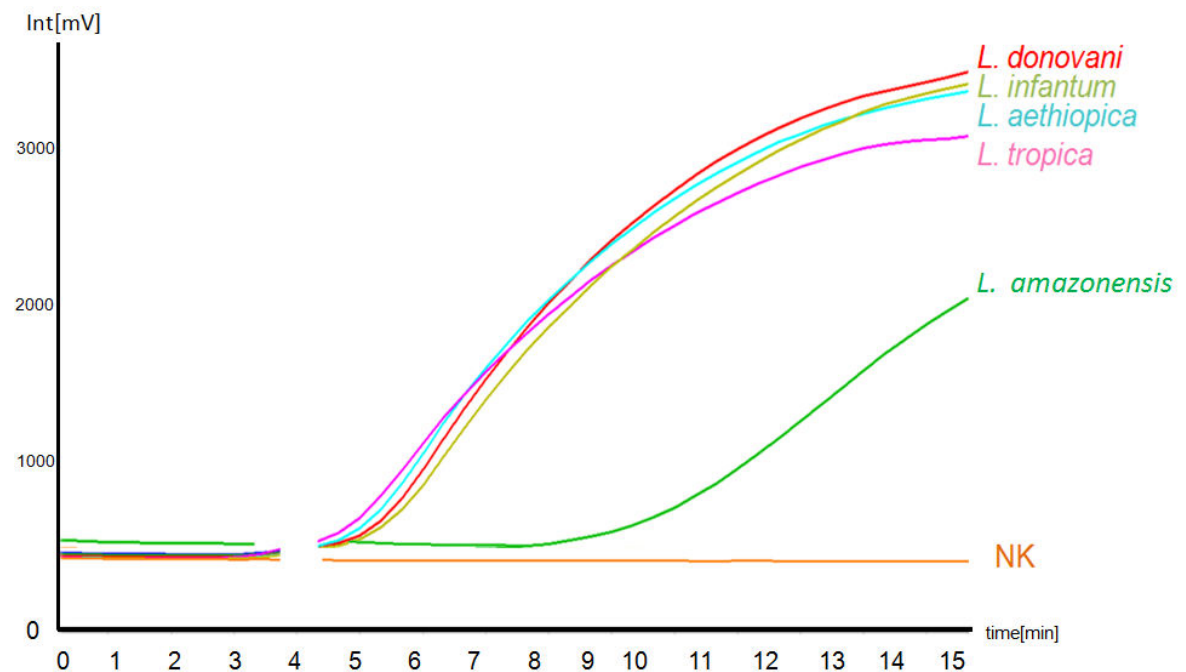
Tabelle 12: Cpb- und 18S rRNA-RPA-Test mit unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies

Spezies	Anzahl unterschiedlicher Stämme der jeweiligen Art	RPA	
		Cpb	18S rRNA
<i>L. tropica</i>	5	+	+
<i>L. donovani</i>	5	+	+
<i>L. major</i>	4	+	+
<i>L. aethiopica</i>	5	+	+
<i>L. amazonensis</i>	1	+	+
<i>L. infantum</i>	1	+	+
<i>L. braziliensis</i>	5	-	+





**Abbildung 20: Cpb-RPA-Nachweis unterschiedlicher *Leishmania*-Spezies.** **A.** Positive Nachweise für *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. major* und *L. amazonensis* aber nicht für *L. braziliensis*. **B.** Positiver Nachweis für *L. infantum*. Verschiedene *Leishmania spp.* gDNA mit einer Konzentration von 40 – 100 ng/μl wurden getestet. Für die negative Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

**A****B**

**Abbildung 21: 18S rRNA-RPA-Nachweis unterschiedlicher *Leishmania*-Spezies.** **A.** Positive Nachweise für *L. tropica*, *L. donovani*, *L. major*, *L. amazonensis* und *L. braziliensis*. **B.** Positive Nachweise für *L. infantum*, *L. aethiopica*, *L. donovani* und *L. amazonensis*. Verschiedene *Leishmania* spp. gDNA mit einer Konzentration von 40 – 100 ng/ $\mu$ l wurden getestet. Für die negative Kontrolle (NK) wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Zwischen 4 und 5 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

### 3.5 Differenzierung der verschiedenen *Leishmania* spp. durch *Leishmania* Cpb-RPA

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, mithilfe des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests die Differenzierung der unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies zu ermöglichen. Die klinische Manifestation und auch der Therapieerfolg sind von der Erkennung der genauen Spezies der Leishmanien vor allem bei den mucokutanen Verlaufsformen abhängig. Deswegen wurde versucht, für den *Leishmania* Cpb-RPA Methoden zu entwickeln, um die einzelnen Arten differenzieren zu können.

Methode 1: Block-Primer wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um verschiedene *Leishmania*-Spezies mittels *Leishmania* Cpb-RPA spezifisch nachzuweisen. Dazu wurde zunächst ein Block-Primer (Block-LD) entwickelt, der spezifisch die Amplifikation von *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi* verhindern sollte (siehe 2.11). Prinzipiell könnte mit Hilfe weiterer Block-Primer dann die Amplifikation nur einer *Leishmania*-Art erreicht werden. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass trotz Block-LD ein Signal bei *L. donovani* und *L. infantum* detektiert werden konnte (nicht gezeigte Ergebnisse). Das erklärt sich aus den wenigen *mismatches* zwischen den Sequenzen des Amplikons bei den unterschiedlichen Leishmanien (Tabelle S3).

Methode 2: Mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen wurde außerdem versucht, eine *Leishmania*-Art spezifisch nachzuweisen. Das Enzym PflMI schneidet DNA von *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. amazonensis* und *L. mexicana*, aber nicht DNA von *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* und *L. guyanensis* und das Enzym EcoO109I schneidet nur *L. tropica*-DNA (Tabelle S1). Ein RPA-Lauf wurde mit *L. major*-, *L. aethiopica*-, *L. amazonensis* gDNA und mit *L. major*-, *L. aethiopica*-, *L. amazonensis* gDNA nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym PflMI durchgeführt (siehe 2.12). Der Restriktionsverdau führte zu einer deutlichen Hemmung des Signals bei DNA von *L. aethiopica*, obwohl *L. aethiopica*-DNA nicht geschnitten werden sollte. Es führte außerdem nur zu einer schwachen Hemmung des Signals bei DNA von *L. amazonensis*, obwohl *L. amazonensis*-DNA geschnitten werden sollte. Das Signal bei *L. major* gDNA war nach Restriktionsverdau deutlich gehemmt, aber nicht aufgehoben (Abbildung S1). Ein weiterer RPA-Lauf wurde mit *L. tropica* gDNA und mit *L. tropica* gDNA nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym EcoO109I durchgeführt. Der Restriktionsverdau führte zwar auch hier zu einer deutlichen Hemmung des Signals, aber eine Amplifikation hatte dennoch stattgefunden (Abbildung S2). Diese Ergebnisse und weitere waren nicht zufriedenstellend, denn trotz einer Erhöhung der Konzentration der Restriktionsenzyme konnte die Amplifikation von Target-DNA nicht spezifisch und komplett gehemmt werden.

Methode 3: Schließlich wurde versucht, die verschiedenen *Leishmania*-Spezies mit Hilfe des zunehmend eingesetzten CRISPR/Cas 12a (oder Cpf1) spezifisch nachzuweisen. Prinzipiell könnte mit Hilfe dieser „Genschere“ die Amplifikation nur einer *Leishmania*-Art erreicht werden. In einem Pilotexperiment wurde versucht, mit crRNA 1 und crRNA 2 spezifisch DNA von *L. tropica* zu schneiden (Tabelle S2). Dadurch sollte eine Amplifikation von *L. tropica*-DNA verhindert werden und *L. tropica* spezifisch mittels *Leishmania* Cpb-RPA nachgewiesen werden (siehe 2.13). Die beiden CRISPR/Cas RNP-Komplexe führten allerdings nur zu einer minimalen Hemmung des *Leishmania* Cpb-RPAs Signals im Vergleich zu unbehandelter DNA von *L. tropica* (Abbildung S3).

### 3.6 Kreuzreaktionen mit anderen Pathogenen

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der oben genannten RPAs mit anderen Pathogenen wurden 14 Nicht-*Leishmania*-Proben mit einer Menge von mehr als  $10^7$  DNA-Moleküle/ Reaktion getestet. Da *Leishmania spp.* und *Trypanosoma spp.* aus der gleichen Familie der *Trypanosomatidae* stammen, haben sie zum Teil viele Sequenzähnlichkeiten. Bei vielen vorhergehenden molekularen Nachweismethoden führte dies zu Problemen in der Differenzierung zwischen Leishmanien und Trypanosomen. Daher wurde auch gDNA von *T. brucei* auf eine mögliche Amplifikation mit dem *Leishmania* Cpb- und *Leishmania* 18S rRNA-RPA getestet.

Mit dem *Leishmania* Cpb-RPA-Test wurde *T. brucei* nicht detektiert. Auch beim *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurde *T. brucei* nicht nachgewiesen (Tabelle 13). Ein Sequenzvergleich der *Leishmania* 18S rRNA Zielsequenz mit den homologen Sequenzen in *T. brucei* zeigte vor allem im Bereich der Primer FPy und RPy ein hohes Maß an Sequenzunterschieden und erklärt damit die fehlende Kreuzreaktivität (Tabelle S4). Die homologen Sequenzen in *T. cruzi* zeigten sogar über den gesamten Amplikonbereich große Sequenzunterschiede zu der *Leishmania* Zielsequenz, so dass eine Amplifikation der 18S rRNA von *T. cruzi* weitgehend ausgeschlossen werden konnte (Tabelle S4). Die fehlende Sequenzähnlichkeit der Primer FPy und RPy mit den homologen Sequenzen in *T. brucei* und *T. cruzi* war auch einer der Gründe für deren Auswahl am Anfang dieses Projektes gewesen.

Auch die gDNAs aus einer Reihe von bakteriellen und anderen parasitären Infektionserregern wurden mit den hier verwendeten Primer-Kombinationen der *Leishmania* Cpb- und *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests nicht nachgewiesen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Liste der negativen Kreuzreaktionen der *Leishmania* Cpb- und *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Nachweise mit DNA bakterieller und parasitärer Infektionserreger

---

Erreger
<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Leptospira ballum</i>
<i>Rickettsia africae</i>
<i>Orientia tsutsugamushi</i>
<i>Toxoplasma gondi</i>
<i>Trypanosoma brucei</i>

---

### 3.7 Klinische Validierung des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Nachweises mit archivierten Patienten-Proben

Für die Validierung des RPA-Tests mit klinischen Patienten-Proben wurde der *Leishmania* 18S rRNA-RPA gewählt, weil dieser die besten präklinischen Ergebnisse gezeigt hatte. Nach der Einwilligung der Ethikkommission wurde die Performance des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests im Feld mit 100 archivierten DNA-Proben von 70 Leishmaniose-Patienten und 30 nicht infizierten Kontrollpatienten unter Verwendung des mobilen Kofferlabors getestet (siehe 2.8). Alle 30 Proben nicht infizierter Kontrollpatienten waren negativ. Nur eine von 25 Proben viszeraler Leishmaniose (VL)-Patienten war positiv, fünf von 25 Proben von post-Kala-Azar dermale Leishmaniose (PKDL)-Patienten waren positiv, und 19 von 20 Proben von Patienten mit kutaner Leishmaniose (CL) waren positiv (Abbildung 22). Die Sensitivität des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests für die Kutane Leishmaniose (CL) betrug unter Feldbedingungen damit 95%, für die viszerale Leishmaniose (VL) 4% und für die post-Kala-Azar dermale Leishmaniose (PKDL) 20%.

Wenn die klinischen Validierungen von *Leishmania* 18S rRNA- und von *Leishmania* kDNA-RPA-Test zusammen herangezogen werden, könnten VL, PKDL und CL im Feld mit zwei RPA-Tests theoretisch spezifisch und mit sehr hoher Sensitivität nachgewiesen werden (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Klinische Validierung von *Leishmania* 18S rRNA- und von *Leishmania* kDNA-RPA-Tests unter Feldbedingungen**

	VL, PKDL, CL	VL	PKDL	CL
RPA	Spezifität	Sensitivität	Sensitivität	Sensitivität
18S rRNA	100% (30/30)	4% (1/25)	20% (5/25)	95% (19/20)
kDNA	100% (53/53)	100% (23/23)	100% (20/20)	60% (12/20)

Nummer	Probe	18S rRNA	Detektionzeit (min)	Nummer	Probe	18S rRNA	Detektionzeit (min)
001	VL	–	–	051	CL	Positiv	12,7
002	VL	–	–	052	CL	–	–
003	VL	–	–	053	CL	Positiv	6,7
004	VL	–	–	054	CL	Positiv	7
005	VL	–	–	055	CL	Positiv	6,7
006	VL	–	–	056	CL	Positiv	10,3
007	VL	–	–	057	CL	Positiv	6,7
008	VL	–	–	058	CL	Positiv	5,7
009	VL	–	–	059	CL	Positiv	9,3
010	VL	–	–	060	CL	Positiv	9,3
011	VL	Positiv	7,83	061	CL	Positiv	7
012	VL	–	–	062	CL	Positiv	6
013	VL	–	–	063	CL	Positiv	6
014	VL	–	–	064	CL	Positiv	6
015	VL	–	–	065	CL	Positiv	6,7
016	VL	–	–	066	CL	Positiv	8,7
017	VL	–	–	067	CL	Positiv	7
018	VL	–	–	068	CL	Positiv	6
019	VL	–	–	069	CL	Positiv	5,3
020	VL	–	–	070	CL	Positiv	6,3
021	VL	–	–	071	Kontrolle	–	–
022	VL	–	–	072	Kontrolle	–	–
023	VL	–	–	073	Kontrolle	–	–
024	VL	–	–	074	Kontrolle	–	–
025	VL	–	–	075	Kontrolle	–	–
026	PKDL	–	–	076	Kontrolle	–	–
027	PKDL	–	–	077	Kontrolle	–	–
028	PKDL	–	–	078	Kontrolle	–	–
029	PKDL	–	–	079	Kontrolle	–	–
030	PKDL	–	–	080	Kontrolle	–	–
031	PKDL	–	–	081	Kontrolle	–	–
032	PKDL	Positiv	11,5	082	Kontrolle	–	–
033	PKDL	–	–	083	Kontrolle	–	–
034	PKDL	–	–	084	Kontrolle	–	–
035	PKDL	–	–	085	Kontrolle	–	–
036	PKDL	–	–	086	Kontrolle	–	–
037	PKDL	–	–	087	Kontrolle	–	–
038	PKDL	Positiv	8,68	088	Kontrolle	–	–
039	PKDL	–	–	089	Kontrolle	–	–
040	PKDL	Positiv	6,55	090	Kontrolle	–	–
041	PKDL	Positiv	7	091	Kontrolle	–	–
042	PKDL	Positiv	9,57	092	Kontrolle	–	–
043	PKDL	–	–	093	Kontrolle	–	–
044	PKDL	–	–	094	Kontrolle	–	–
045	PKDL	–	–	095	Kontrolle	–	–
046	PKDL	–	–	096	Kontrolle	–	–
047	PKDL	–	–	097	Kontrolle	–	–
048	PKDL	–	–	098	Kontrolle	–	–
049	PKDL	–	–	099	Kontrolle	–	–
050	PKDL	–	–	100	Kontrolle	–	–

Abbildung 22: Klinische Validierung des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests unter Feldbedingungen

### 3.8 Multiplex-RPA-Test von *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* kDNA-RPA

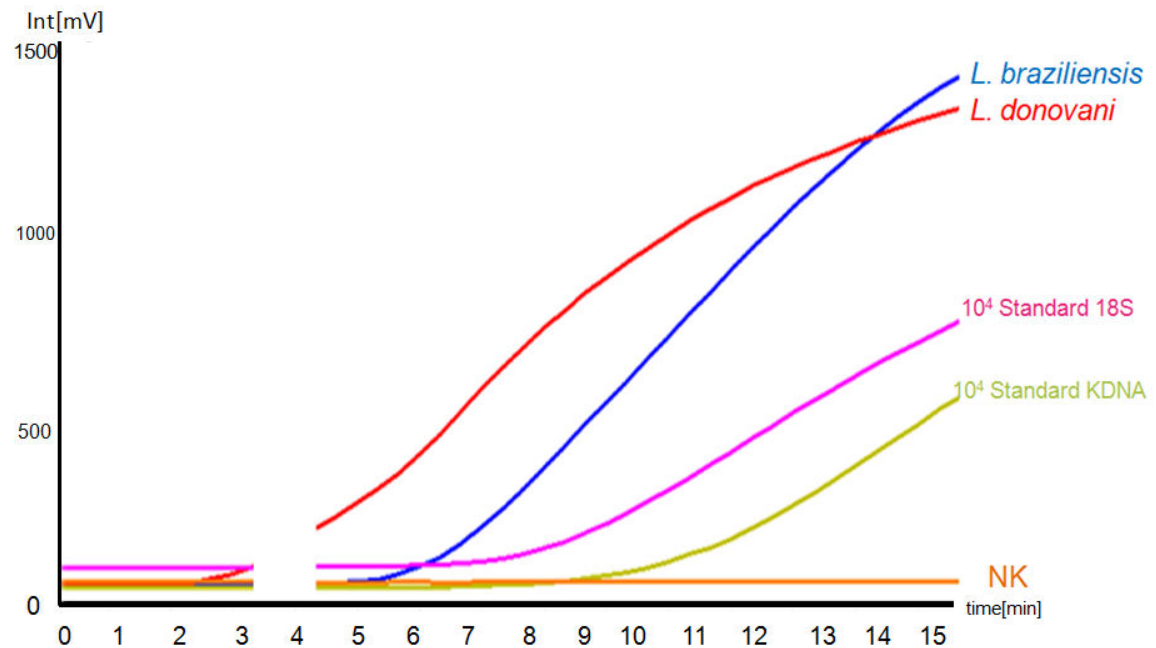
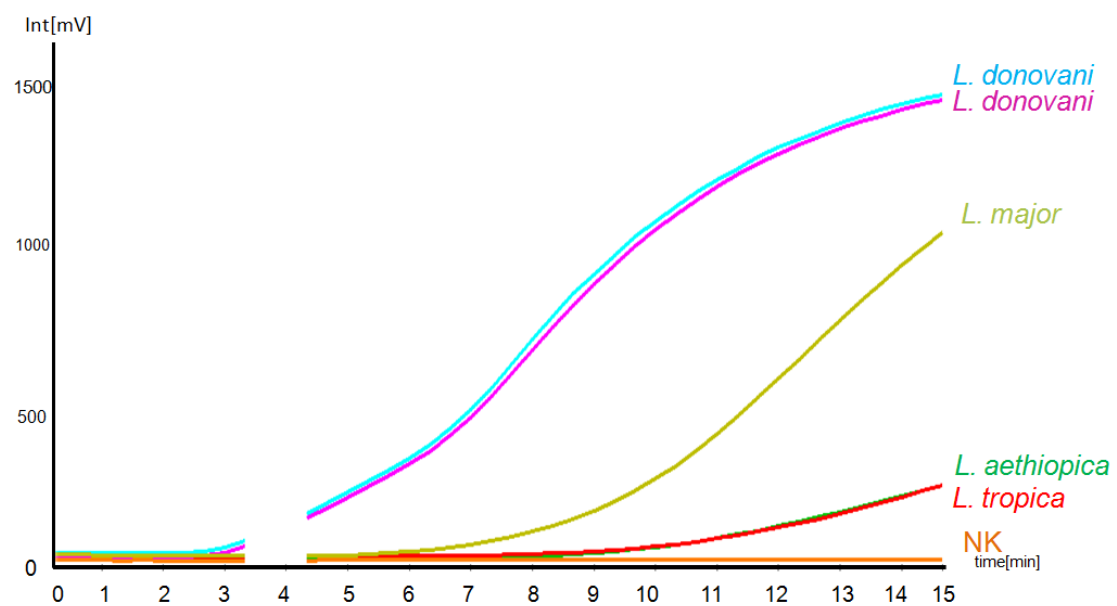
Da die Ergebnisse des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests im Feld nur bei Patienten mit CL zufriedenstellend waren, wurde untersucht, inwieweit ein Multiplex-RPA-Test die Sensitivität auch bei Proben von nicht-CL-Leishmaniosen erhöhen kann. In einer bereits publizierten Arbeit unserer Gruppe wurden *L. donovani*, *L. infantum*, aber auch andere *Leishmania*-Spezies anhand eines kDNA-RPA-Tests sehr gut unter Feldbedingungen nachgewiesen. Daher wurden Primer und Sonden von beiden Tests (18S rRNA- und kDNA-RPA) gemischt und zunächst DNA-Standards der kDNA- und 18S rRNA-Gene in derselben Reaktion nachgewiesen (siehe 2.10). Die Ergebnisse waren mit der analytischen Sensitivität der Einzelnachweise von DNA in den *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* kDNA-RPA-Tests zu vergleichen. Auch wurden keine großen Unterschiede in der Detektionszeit des Signals zwischen Multiplex- und Einzel-RPAs festgestellt (Tabelle 15).

Um die Kombinationsergebnisse zu sichern wurde der Multiplex-Test mit DNA von *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. major*, *L. aethiopica* und *L. tropica* getestet. Alle hier getesteten *Leishmania* spp. wurden mit dem Multiplex-RPA nachgewiesen (Abbildung 23).

**Tabelle 15: Vergleich der Detektionszeit des Signals zwischen Multiplex-, *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* kDNA-RPA (in Minuten)**

RPA	18S rRNA-DNA-Molekülstandard		kDNA-DNA-Molekülstandard	
	10 <sup>4</sup> DNA-Moleküle/Reaktion	10 <sup>3</sup> DNA-Moleküle/Reaktion	10 <sup>4</sup> DNA-Moleküle/Reaktion	10 <sup>3</sup> DNA-Moleküle/Reaktion
<b>Multiplex</b>	7	8,5	7	8
<b>18S rRNA</b>	6	7		
<b>kDNA</b>			7	9



**A****B**

**Abbildung 23: Multiplex-RPA-Nachweis von *Leishmania* 18S rRNA- und kDNA-DNA-Standards und DNA von verschiedenen *Leishmania*-Spezies. A.** 18S rRNA- und kDNA-DNA-Standard, *L. braziliensis* und *L. donovani*. **B.** *L. major*, *L. donovani*, *L. aethiopica* und *L. tropica*. *Leishmania* spp. gDNA mit einer Konzentration von 40 – 100 ng/ $\mu$ l und  $10^4$  DNA-Molekülen/Reaktion des 18S rRNA-DNA-Molekülstandards und des kDNA-DNA-Molekülstandards wurden mit dem Multiplex-RPA nachgewiesen. Für die negative Kontrolle (NK) wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenzaufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

## 4 Diskussion

Leishmanien können, je nach Spezies die kutane, mucokutane, viszerale, oder die post-Kala-Azar dermale Leishmaniose verursachen. Die kutane Leishmaniose (CL) führt zur pathologischen Veränderung der Haut, die mucokutane Leishmaniose (MCL) zur Bildung eines plasmazellulären und lymphozellulären Infiltrats an Nase und/oder Lippe. Die viszerale Leishmaniose (VL) führt zum Befall und Schädigung innerer Organe wie Knochenmark, Leber und Milz und die post-Kala-Azar dermale Leishmaniose (PKDL) zu fleckenförmigen nicht pigmentierten und knotigen Erythemen (Elmahallawy et al. 2014). Bei der kutanen Leishmaniose vermehren sich die Leishmanien in den Makrophagen der Haut und bei der viszeralen Leishmaniose in den Makrophagen der Milz, dem Knochenmark und der Leber (Rittig und Bogdan 2000). Die Leishmaniose ist in den Subtropen, Tropen und in den Mittelmeeranrainerstaaten endemisch (Murray et al. 2005).

Der Klimawandel, die Globalisierung, sowie die vermehrten indirekten Verbindungen der verschiedenen Länder durch Reisende und ihre Haustiere stellen Risikofaktoren für die Verbreitung der Krankheit in Deutschland und anderen Ländern dar. Auch das Wachstum der Bevölkerung und die ökologischen Veränderungen auf der Erde spielen dabei eine große Rolle. Die genannten Faktoren haben auch einen großen Einfluss auf die Verbreitung und Vermehrung von Vektoren (zum Beispiel: Mücken, Zecken und Milben) und führen so zu veränderten Infektionsverbreitungen bei Menschen und Tieren. Daher hat die Entwicklung von neuen Diagnostik- und Behandlungsmethoden weltweit einen sehr hohen Stellenwert zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten, unter anderem auch von Leishmaniosen.

Um *Leishmania* nachzuweisen, wurde früher insbesondere die direkte Kultivierung oder der mikroskopische Nachweis der Parasiten verwendet (Wortmann et al. 2005). Diese Methoden sind jedoch sehr zeitaufwendig und erfordern experimentelle Erfahrung. Deswegen wurden mehrere real-time PCR-Tests entwickelt, die heutzutage über eine gute Sensitivität verfügen und daher in experimentellen und klinischen Studien häufig angewandt werden (van der Meide et al. 2008; Aviles et al. 1999). Jedoch setzen diese eine technisch anspruchsvolle Ausstattung eines Labors voraus. In den Regionen, in denen die Leishmaniose am häufigsten auftritt, sind solch gut ausgestatteten Laboratorien jedoch kaum zu finden. Als molekulardiagnostische Methoden gibt es neben der real-time PCR auch mehrere isothermale Amplifikationsmethoden. Der Nachteil aller molekularen Nachweismethoden ist, dass genetische Variabilitäten

möglicherweise Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität dieser Methoden haben (Yang und Rothman 2004).

Als Alternative zur PCR wird ein Rekombinase-Polymerase-Amplifikations (RPA)-Test für die schnelle und effiziente Erkennung von *Leishmania spp.* angesehen, der auch unter einfachen technischen Bedingungen in den am meisten betroffenen Regionen angewendet werden kann. Nach erfolgreicher Entwicklung kann dieser Test in einem mobilen Kofferlabor weltweit, auch an Orten mit schlechtem Zugang zu gut ausgestatteten Laboratorien durchgeführt werden. Da mit Hilfe des Tests innerhalb von 15 Minuten sensitive und spezifische Ergebnisse über eine *Leishmania*-Infektion möglich sind, können auch Ausbruchsgeschehen kontrolliert, validiert und verfolgt werden.

In der vorliegenden Orientierungsstudie wurden zwei RPA-Tests (Cpb- und 18S rRNA-RPA) entwickelt, die unter Laborbedingungen einen schnellen, spezifischen und sensitiven Nachweis von *Leishmania spp.* ermöglicht haben. Mit dem *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurden alle getesteten Leishmanien nachgewiesen. Mit dem *Leishmania* Cpb-RPA wurden alle getesteten Leishmanien (u. a. auch *L. amazonensis*) ausgenommen *L. braziliensis* nachgewiesen, obwohl *L. amazonensis* mehr Sequenzunterschiede im Bereich des Amplikons im Vergleich zu *L. braziliensis* aufweist (Tabelle S3 und Tabelle S6). Die Position der *mismatches* kann dabei möglicherweise eine Rolle spielen. Ein weiteres Ziel war die verschiedenen *Leishmania*-Spezies voneinander mithilfe des *Leishmania* Cpb-RPAs zu differenzieren, weil der Erfolg der Therapie gelegentlich von der Erkennung der genauen Spezies der Leishmanien abhängig ist (Choi und Lerner 2002; Reithinger und Dujardin 2007). Dies war trotz Anwendung unterschiedlicher Methoden nicht erfolgreich. Nach der erfolgreichen Etablierung der RPA-Tests unter Laborbedingungen wurde der *Leishmania* 18S-rRNA-RPA für die klinische Validierung ausgesucht. Unter Feldbedingungen war der *Leishmania* 18S-rRNA-RPA-Test nur für die CL-Proben zufriedenstellend (Sensitivität 95% und Spezifität 100%), nicht jedoch für die VL- und PKDL-Proben. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Proben nicht das entsprechende Zielgen enthielten bzw. die DNA-Sequenzen im Feld durch genetische Variabilitäten beeinflusst waren (Yang und Rothman 2004). Da der *Leishmania* 18S rRNA-RPA lediglich für CL-Proben im Feld geeignet war, wurde ein Multiplex-RPA für den Nachweis aller Leishmaniosen durch den Zusatz von *Leishmania* kDNA-RPA (Mondal et al. 2016) unter Laborbedingungen erfolgreich getestet.

#### 4.1 Vergleich zwischen Cpb-, 18S rRNA- und kDNA-Zielgenen von *Leishmania*

Zum Nachweis von *Leishmania spp.* wurden verschiedene PCRs basierend auf verschiedenen Zielgenen entwickelt (Chaouch et al. 2013). In dieser Arbeit wurden drei Zielgene (Cpb-, 18S rRNA- und kDNA-Gen) benutzt.

Das Cpb-Gen, sowie das 18S rRNA-Gen können im Gegensatz zum kDNA-Gen alle *Leishmania*-Arten nachweisen, weswegen sie als zuverlässige Zielgene für den Nachweis aller *Leishmania spp.* geeignet zu sein schienen (Kuru et al. 2011; Sakanari et al. 1997). Mit dem *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurden tatsächlich alle vorhandenen *Leishmania spp.* positiv getestet. Bei Anwendung des *Leishmania* Cpb-RPAs wurde von den getesteten *Leishmania spp.* nur *L. braziliensis* nicht detektiert.

Das Cpb-Gen ist ein Hauptantigen von *Leishmania*-Parasiten, welches mit sehr hoher Sensitivität in Leishmanien nachgewiesen wurde. Es weist eine hohe Kopienzahl im Genom der Leishmanien (über 100 pro Leishmaniengenom) auf, sowie Polymorphismen zwischen verschiedenen *Leishmania*-Spezies. Bereits im Vorfeld wurde gezeigt, dass das Cpb-Gen gut zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen *Leishmania*-Arten mit einer sehr hohen Sensitivität geeignet ist (Kuru et al. 2011; Laurent et al. 2009; Quispe-Tintaya et al. 2005; Antinori et al. 2009; Garcia et al. 2005; Quispe Tintaya et al. 2004). Mit den früheren PCRs, die auf das Cpb-Gen abzielten, konnte aber nur zwischen *Leishmania*-Komplexen unterschieden werden (Hide und Bañuls 2006). In dieser Studie wurde mit verschiedenen Methoden (Block-Primer, Restriktionsenzymen und CRISPR/Cas 12a) für *Leishmania* Cpb-RPA erfolglos versucht, die Differenzierung der unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies zu ermöglichen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Sequenzen von *Leishmania spp.* im Bereich des Amplikons ähnlich sind und nur wenige *mismatches* haben.

Das 18S-rRNA-Gen zeigt repetitive Sequenzen, die exakte Kopienzahl im Genom ist allerdings nicht bekannt. Außerdem kann die Kopienanzahl zwischen den einzelnen Spezies variieren. Je nach Literatur schwankt sie zwischen 100 und 200 pro Leishmaniengenom (Leon et al. 1978; Requena et al. 1997; Villalba und Ramirez 1982). Es ist in allen *Leishmania*-Arten nachweisbar, jedoch ist es nicht für eine bestimmte *Leishmania*-Art spezifisch (Foulet et al. 2007).

Das kDNA-Gen hat sich als Zielgen bewährt, da es häufig eine hohe Sensitivität bei der Diagnose von Leishmaniosen gezeigt hat und in einer hohen Kopienzahl (10.000 – 20.000 pro Leishmaniengenom) vorliegt (Rodgers et al. 1997). Jedoch gelingt es mit seiner Hilfe nur Leishmanien auf Ebene der Gattung oder Untergattung zu differenzieren. Auch werden nicht alle *Leishmania*-Spezies mit dem Test nachgewiesen, und eine Spezies-spezifische Diagnose ist nicht möglich (Mondal et al. 2016; Alonso et al. 2010; Antinori et al. 2009).

## 4.2 Vergleich zwischen *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* Cpb-RPA

Um *Leishmania* spp. nachzuweisen, wurden zwei verschiedene RPA-Tests (*Leishmania* Cpb- und *Leishmania* 18S rRNA-RPA) basierend auf dem Cpb- und dem 18S rRNA-Gen etabliert. Beide RPA-Methoden konnten *Leishmania*-DNA-Standards mit hoher Sensitivität nachweisen. So wurden jeweils mehrere RPA-Durchläufe mit den jeweiligen molekularen DNA-Standards in verschiedenen Konzentrationen zum Nachweis von *Leishmania* spp. getestet. Für den *Leishmania* Cpb-RPA-Test wurde bei bis zu 100 DNA-Molekülen/Reaktion ein Signal detektiert. Für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Test wurde bei bis zu zehn DNA-Molekülen/Reaktion ein Signal detektiert bzw. bei zehn Parasiten eine Reaktionszeit von zwölf Minuten benötigt, um ein Signal zu detektieren. Zusammenfassend waren bis zu 17 Molekülen bei *Leishmania* Cpb-RPA und bis zu zwölf Molekülen bei *Leishmania* 18S rRNA-RPA ausreichend, um die Diagnose zu stellen. Dies lässt insgesamt auf eine sehr gute analytische Sensitivität schließen.

Problematisch beim *Leishmania* Cpb-RPA war, dass *L. braziliensis* nicht nachgewiesen werden konnte. Jedoch gelang es mit der Hilfe des *Leishmania* 18S rRNA-RPAs alle getesteten Leishmanien in sehr kurzer Zeit zu detektieren.

Um die Spezifität der Tests zu evaluieren, wurde deren Kreuzreaktivität mit DNA mehrerer Nicht-*Leishmania*-Pathogene getestet. Dabei konnten keine Kreuzreaktionen festgestellt werden. Selbst die DNA von Trypanosomen, die mit den Leishmanien nahe verwandt sind und daher über viele ähnliche DNA-Sequenzen verfügen und häufig Schwierigkeiten in der *Leishmania*-Diagnostik bereiten, wurde nicht amplifiziert.

Nur *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurde klinisch validiert. Diese ergab gute Spezifität (100%) und gute Sensitivität nur bei den CL-Proben (95%) und nicht bei den PKDL- und VL-Proben.

## 4.3 Vergleich zwischen LAMP und RPA

Zum Nachweis von *Leishmania*-Infektionen wurden auch mehrere *Loop-mediated-isothermal-amplification*(LAMP)-Methoden entwickelt (León et al. 2018; Nzelu et al. 2019). Für die Durchführung der RPA sind nur zwei Primer für die Amplifikation notwendig, bei der LAMP werden hingegen vier bis sechs Primer benötigt, was im Gegensatz zur RPA einen langen Sequenzabschnitt als Template für die Primer erforderlich macht. Ein weiterer Vorteil des RPAs ist, dass der ESEQuant Tube Scanner für die Detektion kostengünstiger ist. Zudem ist er sehr klein (7,4 cm x 17,8 cm x 18,8 cm) und verfügt im Vergleich zu anderen Detektionsgeräten über ein geringes Eigengewicht (1 kg mit Laptop).

Des Weiteren benötigt der RPA-Test nur 15 Minuten bei einer gleichzeitig höheren Sensitivität um *Leishmania* nachzuweisen, was bei LAMP im Mittel drei Mal länger dauert.

Insgesamt weisen LAMP und RPA ähnliche Sensitivitätsgrenzen für den Nachweis von *Leishmania*-Spezies auf (Garcia et al. 2005; Antinori et al. 2009; Quispe-Tintaya et al. 2005; Laurent et al. 2009; Kuru et al. 2011; Antinori et al. 2009; Alonso et al. 2010). Basierend auf den Ergebnissen lässt sich zusammenfassend sagen, dass ein RPA-Test schneller und einfacher durchzuführen ist als ein LAMP-Test. Außerdem ist der RPA-Test in einem Kofferlabor weltweit möglich, auch an Orten mit schlechtem Zugang zu besser ausgestatteten Laboratorien.

Im Rahmen des *Ebola*-Ausbruchs in Guinea wird zum Beispiel das mobile Kofferlabor routinemäßig erfolgreich eingesetzt (Faye et al. 2015).

#### 4.4 Optimierung und Ausblick

Das Ziel dieser Studie, *Leishmania spp.*, mit einer guten Sensitivität und Spezifität nachzuweisen, wurde für die DNA-Standards und für die gDNA-Proben von verschiedenen *Leishmania spp.* unter Laborbedingungen erreicht. Im Feld waren die Sensitivität und die Spezifität jedoch nur für CL und nicht für VL und PKDL zufriedenstellend. Das könnte daran liegen, dass die *Leishmania*-DNA-Sequenzen im Bereich des Amplikons im indischen Subkontinent durch genetische Veränderungen möglicherweise viele *mismatches* aufweisen. Durch eine Sequenzierung der DNA-Proben könnte diese Überlegung überprüft werden. Der unbefriedigende Nachweis von VL- und PKDL-Patienten könnte aber auch an den unterschiedlichen Patientenmaterialien liegen. Bei CL wurden Hautbiopsien direkt aus dem erkrankten Gewebe verwendet, bei VL aber Blutproben, wo die Parasitendichte vermutlich eher gering ist. Außerdem enthält Blut Inhibitoren der Amplifikation.

Ein Multiplex-RPA (18S-rRNA- und kDNA-RPA) wurde für den Nachweis aller Leishmaniosen mit den DNA-Standards und verschiedenen *Leishmania* gDNA-Proben erfolgreich überprüft. Die Sensitivität und die Spezifität des Multiplex-RPA müssen jedoch unter Feldbedingungen noch getestet werden.

Obwohl eine genauere Differenzierung der unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies durch das RPA-Verfahren zeitaufwendig und kostenintensiv ist, wurde versucht, den *Leishmania* Cpb-RPA mit verschiedenen Methoden (CRISPR, Restriktionsenzyme und Blockprimer) zu optimieren, da die klinische Manifestation und auch der Therapieerfolg von der Erkennung der genauen Spezies der Leishmanien insbesondere bei der mucokutanen Verlaufsform abhängig

ist (Choi und Lerner 2002; Reithinger und Dujardin 2007). Jedoch waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend.

Eventuell könnten zukünftig *Zinc-finger nucleases*(ZFN), *Transcription activator-like effector nucleases*(TALEN) oder die Sequenzierung zum Ziel führen. Die *Zinc-finger nuclease* und die *Transcription activator-like effector nuclease* sind künstliche Restriktionsenzyme, die präzise und Sequenzspezifisch die DNA schneiden (Boch 2011; Cathomen und Joung 2008). Wenn eine Amplifikation nach Restriktionsverdau und anschließendem RPA-Test bei einer *Leishmania*-Spezies nicht stattfindet, dann ist der RPA-Test nur für diese *Leishmania*-Art spezifisch. Die Sequenzierung bestimmt spezifisch die Reihenfolge der Nukleotide einer *Leishmania*-Sequenz und so könnten die verschiedenen *Leishmania*-Spezies spezifisch nachgewiesen werden. Diese Methoden würden einen erhöhten Materialverbrauch erfordern. Außerdem war unser Ziel, eine schnelle Nachweismethode zu entwickeln. Die Dauer des Tests würde sich mit den genannten Methoden um bis zu zwei Stunden verlängern. Deswegen wurden diese weiteren Methoden für die Speziendifferenzierung hier nicht weiter verfolgt.

Eine Optimierung der RPA-Methode könnte auch durch Einbau von modifizierten dNTPs in die Sonde versucht werden. Die dNTPs können durch Basenmodifikation an C2-Position des Purins mit einem Aminorest, oder an C5-Position des Pyrimidins mit einem hydrophoben Methylrest versehen werden, um die Affinität zur Anlagerung an die Komplementärsequenz zu verstärken, und so eine Verkürzung der Sonden zu ermöglichen. Dadurch wird das Primer- und Sondendesign einfacher. Solche dNTPs wurden erfolgreich für Sonden und Primer der real-time PCR eingesetzt (Kutyavin 2008). Deswegen könnten sie bei der RPA auch gut funktionieren.

Zusammenfassend verfügt die RPA insgesamt über eine hohe Sensitivität und Spezifität. Somit ist sie eine erfolgsversprechende isothermale Amplifikationsmethode und könnte für viele weitere Infektionserreger überall mit Hilfe des mobilen Kofferlabors, in kurzer Zeit angewandt werden.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Entwicklung einer Rekombinase-Polymerase-Amplifikations (RPA) Methode zum isothermalen, Nukleinsäure basierten *Point-of-Care*-Nachweis von *Leishmania*-Spezies. Die Leishmaniose ist endemisch in den Subtropen und Tropen, aber auch den Mittelmeeranrainerstaaten. Auch in Deutschland steigen die Fälle von Leishmaniose durch ein erhöhtes Reiseaufkommen. Aus diesem Grund nimmt die Weiterentwicklung von Nachweismethoden einen wichtigen Stellenwert ein.

Die neu entwickelte Methode weist bei einer Testdauer von nur 15 Minuten (bei einer konstanten Temperatur von ca. 37 – 42°C) eine hohe Sensitivität sowie Spezifität auf. Als Zielgene wurden das 18S rRNA-Gen für *Leishmania* 18S rRNA-RPA und das Cpb-Gen für *Leishmania* Cpb-RPA amplifiziert. Um die sensitivsten Primer und Sonden-Kombination zu ermitteln, wurden molekulare Standards ( $10^7$  –  $10^0$  DNA-Moleküle/Reaktion) der Zielsequenzen hergestellt. Mit Hilfe der Amplifikation definierter DNA-Proben wurden zunächst die analytische Sensitivität, die Spezifität, die Anwendbarkeit auf verschiedene *Leishmania*-Spezies und die Kreuzreaktivität mit anderen Pathogenen (zum Beispiel: *Streptokokken*, *Listerien*, *Trypanosomen*, *Plasmodien*) bestimmt.

Mit dem *Leishmania* Cpb-RPA waren unter Laborbedingungen sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität sehr gut, dennoch konnte trotz verschiedener Versuche *L. braziliensis* nicht detektiert werden. Mit dem *Leishmania* 18S rRNA-RPA wurden alle *Leishmania*-Spezies unter Laborbedingungen mit sehr guter Sensitivität und Spezifität detektiert. Das Detektionslimit war für beide RPA-Tests unter 20 DNA-Molekülen/Reaktion. Eine Reaktionszeit von 12 Minuten wurde für den Nachweis von zehn Parasiten bei dem *Leishmania* 18S rRNA-RPA benötigt. In Bezug auch die Kreuzreaktivität der Tests waren alle untersuchten Nicht-*Leishmania*-Pathogene negativ.

Trotz Anwendung verschiedene Methoden (Block-Primer, Restriktionsenzymen und CRISPR/Cas 12a) konnten die unterschiedlichen *Leishmania*-Spezies mithilfe des *Leishmania* Cpb-RPAs nicht erfolgreich differenziert werden.

Weiterhin wurde die Performance des *Leishmania* 18S rRNA-RPA-Tests im Feld mit positiven und negativen archivierten klinischen Proben aus dem Blut und aus Hautbiopsien von Leishmaniose-Patienten überprüft. Die klinische Validierung dieses Tests unter Feldbedingungen zeigte eine sehr gute Sensitivität sowie Spezifität für die kutane Leishmaniose, jedoch nicht für die viszerale und post-Kala-Azar dermale Leishmaniose. Ein *Leishmania* kDNA-RPA-Test basierend auf dem kDNA-Gen wurde bereits von unserer Gruppe entwickelt und publiziert.



Hier wurden die viszerale und post-Kala-Azar dermale Leishmaniose mit sehr guter Sensitivität und Spezifität nachgewiesen.

Die Kombination aus *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* kDNA-RPA in einem Multiplex-RPA ist mit der analytischen Sensitivität des *Leishmania* 18S rRNA- und *Leishmania* kDNA-RPA-Tests unter Laborbedingungen zu vergleichen.

Letztendlich kann die RPA in einem mobilen Kofferlabor weltweit an Orten mit schlechtem Zugang zu gut ausgestatteten Laboren genutzt werden. Auf diese Art und Weise kann eine mögliche *Leishmania* Ausbreitung kontrolliert werden.

Die Vorzüge der RPA Methode liegen in der Geschwindigkeit des Nachweises. Gleichzeitig spielt sie für die zukünftige molekulargenetische Diagnostik auf Grund des einfachen technischen *Point-of-Care*-Einsatzes eine wichtige Rolle.

## 6 Anhang

Tabelle S1: Restriktionsenzyme EcoO109I und PflMI und ihre potentiellen Schnittstellen im Amplikon des *Leishmania* Cpb-RPA-Tests

Name	EcoO109I	PflMI	Sequence
<i>L. tropica</i>	5' TCGGCAGCATCGAGTCGCAGT <b>GGCCCC</b> TGCCGGCCACGGGCTGA	<b>CGGCCCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAAAGACAATGGTTGCGGCGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC</b> 3'	
<i>L. major</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCC <b>ET</b> TGCCGG <b>CCACAAGCTGG</b> TGAGGCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATCACGTGGACAATGGTTGCGGCGGCGGGCTGATGCTGCAGGCATTC		
<i>L. aethiopica</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCC <b>ET</b> TGCCGGCCACCGGCTGA	<b>CGGCCCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACATGGACAGTGGTTGCGGCGGCGGGCTGATGACGCAGGCGTTC</b>	
<i>L. infantum</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCC <b>ET</b> TGCCGG <b>CCACGGCTTGG</b> TGAGCCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAAAGACAATGGTTGCAACGGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC		
<i>L. chagasi</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCC <b>ET</b> TGCCGG <b>CCACGGCTTGG</b> TGAGCCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAAAGACAATGGTTGCAACGGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC		
<i>L. donovani</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCC <b>ET</b> TGCCGG <b>CCACGGCTTGG</b> TGAGCCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAAAGACAATGGTTGCAACGGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC		
<i>L. amazonensis</i>	TTGGCAACATCGAAGGTCAGTGGGC <b>TG</b> CAAGCGG <b>CCACTCGTTGG</b> TTTCAGTGCAGAACAGATGCTCGTGTGCTGCGACAAAGTTCGATGAAGGGTGCAACGGGCGGGCTGATGGACCAGGCAATG		
<i>L. mexicana</i>	TCGGCAACATCGAGGGGCAGTGG <b>TAC</b> CT TGCCGG <b>CCACGAGCTGG</b> TGAGCCTGTCGGAGCAGCAACTGGTGAGCTGCGATGACATGAACGATGGCTGCGACGGCGGACTGATGCTGCAGGCGTTC		
<i>L. braziliensis</i>	TCGGCAACATAGAGTCGAAGTGG <b>TAC</b> CT TGCCACCCACTCGCTGA	<b>TC</b> TCCTTGTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCGTTT	
<i>L. panamensis</i>	TCGGCAACATAGAGTCGCAGTGG <b>TAC</b> CT TACCACCCACTCGCTGA	<b>AT</b> TACCCTGTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCATTC	
<i>L. guyanensis</i>	TCGGCAACATAGAGTCGCAGTGG <b>TAC</b> CT TACCACCCACTCGCTGA	<b>AT</b> TACCCTGTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCATTC	

Zwei Schnittstellen der Restriktionsenzyme PflMI und EcoO109I wurden auf dem Amplikon des *Cathepsin L-like Cysteine Proteinase B* Gens von *L. tropica* (Cpb, GenBank accession number: DQ286773) identifiziert. Accession-Nummern der Referenzsequenzen: *L. major*: AJ319727; *L. aethiopica*: DQ071678; *L. infantum*: JN302673; *L. chagasi*: AF217087; *L. donovani*: GQ302673; *L. amazonensis*: AF538038; *L. mexicana*: AJ319727; *L. braziliensis*: FR798982; *L. panamensis*: EU289030; *L. guyanensis*: GQ180933.

Tabelle S2: Design von CRISPR/Cas-Zielsequenzen zum spezifischen Nachweis von *L. tropica* durch Cpb-RPA

Name	CrRNA2	Sequence	CrRNA1
<i>L. tropica</i>	5'-TCGGCAGCATCGAGTCGCAGTGGGCCCTTGCCGGCCACGGGCTGACGGCCCTGT	CGGAG	CAGCAGCTGGTGAGCTGCCGATGACAAAGACAATGGTTGCGGGCGGGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC-3'
<i>L. major</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCCGTTGCCGGCCACAAGCTGGTGAGGCTGT	CGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCCGATCACGTGGACAATGGTTGCGGGCGGGGGCTGATGCTGCAGGCATT	
<i>L. aethiopica</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCCGTTGCCGGCCACGGCTGACGGCCCTGT	CGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCCGATGACATGGACAGTGGTTGCGGGCGGGGGCTGATGACGCAGGCGTTC	
<i>L. infantum</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCCGTTGCCGGCCACGGCTGGTGAGCCTGT	CGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCCGATGACAAAGACAATGGCTGCAACGGCGGGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC	
<i>L. chagasi</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCCGTTGCCGGCCACGGCTGGTGAGCCTGT	CGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCCGATGACAAAGACAATGGCTGCAACGGCGGGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC	
<i>L. donovani</i>	TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCCGTTGCCGGCCACGGCTGGTGAGCCTGT	CGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCCGATGACAAAGACAATGGCTGCAACGGCGGGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC	
<i>L. amazonensis</i>	TTGGCAACATCGAAGGTCAGTGGGCTGCAAGCGGCCACTCGTTGGTTTCACTGT	CAGAACAGATGCTCGTGTGTCGTCGACAACTCGATGAAGGGTGCAACGGCGGGGGCTGATGGACCAGGCAATG	
<i>L. mexicana</i>	TCGGCAACATCGAGGGGTCAGTGGTACCTTGCCGGCCACGAGCTGGTGAGCCTGT	CGGAGCAGCAACTGGTGAGCTGCCGATGACATGAACGATGGCTGCGACGGCGGGACTGATGCTGCAGGCGTTC	
<i>L. braziliensis</i>	TCGGCAACATAGAGTCGAAGTGGTACCTTGCCACCCACTCGCTGATCTCCTTGT	CGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTT	
<i>L. panamensis</i>	TCGGCAACATAGAGTCGCAGTGGTACGTTACCACCCACTCGCTGATTACCCTGT	CGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGGCTGATGCTGCAGGCATT	
<i>L. guyanensis</i>	TCGGCAACATAGAGTCGCAGTGGTACGTTACCACCCACTCGCTGATTACCCTGT	CGGAGCAGGAGCTGGTGAGCTGCCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGGCTGATGCTGCAGGCATT	
FP2	5'-TCGGCAGCATCGAGTCGCAGTGGGCCCTTGC-3'	-----	
P	-----		3'-ACTCGACGCTACTGTNTCTGTTACCAACGCCCGCCCGGACTACGA-3'
RP1	-----		3'-CGCCGCCCGCCGACTACGACGTCCGCAAG-3'

Aufgrund artspezifischer Sequenzunterschiede im Cpb-Amplikon zwischen unterschiedlichen Leishmanien wurden crRNA 1 und 2 identifiziert, die spezifisch die Zielsequenzen in *L. tropica* erkennen. Dadurch sollte eine Amplifikation von *L. tropica*-DNA verhindert werden und könnte der *Leishmania* Cpb-RPA spezifisch *L. tropica* nachweisen. FP2 und RP1 bezeichnen die RPA-Primer und P die Sonde. Accession-Nummern der Zielsequenzen: *L. tropica*: DQ286773; *L. major*: AJ319727; *L. aethiopica*: DQ071678; *L. infantum*: JN302673; *L. chagasi*: AF217087; *L. donovani*: GQ302673; *L. amazonensis*: AF538038; *L. mexicana*: AJ319727; *L. braziliensis*: FR798982; *L. panamensis*: EU289030; *L. guyanensis*: GQ180933.

Tabelle S3: Alignment des Amplikons des *Leishmania* Cpb-RPAs mit den entsprechenden Sequenzen unterschiedlicher *Leishmania*-Spezies

Name	Sequence
Amplikon	5'TCGGCAGCATCGAGTCGCAGTGGGCCCTTGCCGGCCACGGGCTGACGGCCCTGTCCGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAAAGACAATGGTTGCGGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTC3'
<i>L. tropica</i>	.....
<i>L. major</i>	.....A.....G.....AA.....GT.AGG.....C.GTG.....A...
<i>L. aethiopica</i>	.....A.....G.....C.....TG...G.....AC.....
<i>L. infantum</i>	.....A.....G.....CT.GT.AG.....C.AA.....
<i>L. chagasi</i>	.....A.....G.....CT.GT.AG.....C.AA.....
<i>L. donovani</i>	.....A.....G.....CT.GT.AG.....C.AA.....
<i>L. amazonensis</i>	.T...A....AGGT.....TGCAAG.....TC.T..GTTT.A....A..A...AT...C...TCG....CA..GTC..TG.A..G...AA.....GAC....AA.G
<i>L. mexicana</i>	.....A.....GG.....TA.....A...GT.AG.....A.....TGA..G...C...A....A.....
<i>L. braziliensis</i>	.....A..A....A....TA.....AC...TC...TCT..T.....G.....TGTG...G.G..C...AA.....C.....T
<i>L. panamensis</i>	.....A..A....TA.G..A..AC...TC...TTA.....G.....TGTG...G.G..C...AA.....C.....A...
<i>L. guyanensis</i>	.....A..A....TA.G..A..AC...TC...TTA.....G.....TGTG...G.G..C...AA.....C.....A...
FP2	5'TCGGCAGCATCGAGTCGCAGTGGGCCCTTGC3'.....
P	.....3'ACTCGACGCTACTGTNICTGTTACCAACGCCGCCGCCGACTACGA3'.....
RP1	.....3'CGCCGCCGCCGACTACGACGTCCGCAAG3'

Das Amplikon wurde aus dem *Cathepsin L-like Cysteine Proteinase B* Gen von *L. tropica* (Cpb, GenBank accession number: DQ286773) ausgesucht. FP2 und RP1 sind die Primer und P ist die Sonde. Accession-Nummern der Gene unterschiedlicher *Leishmania* spp.: *L. major*: AJ319727; *L. aethiopica*: DQ071678; *L. infantum*: JN302673; *L. chagasi*: AF217087; *L. donovani*: GQ302673; *L. amazonensis*: AF538038; *L. mexicana*: AJ319727; *L. braziliensis*: FR798982; *L. panamensis*: EU289030; *L. guyanensis*: GQ180933.

Tabelle S4: *Mismatches* zwischen dem *Leishmania tropica* 18S rRNA-Amplikon und den homologen Sequenzen in *Trypanosoma spp.*

	Sequence
Amplikon	5'TTCGTCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGT CAGAGGTGAAATTC TTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAG
<i>T. brucei gambiense</i>	G-GA-GTTTTT-CATT-AT-GCG-CGCGCG-CTTC-AG-A-TGA-----T-----
<i>T. brucei rhodesiense</i>	G-GA-GTTTTT-CATT-AT-GCG-CGCGCG-CTTC-AG-A-TGA-----T-----
<i>T. cruzi</i>	CCTT-GT-GAAATCC-TGTGGCA-IGT-IGT-IGT-G-T-C-GACTTC-TCITGC-TCC-C-I-TTT-CACAT-TGTCAT-CCT-CCCTCAAC-CACGGCAT---G--ATG-AGGAG-GT-GTT-GGGGGAG--C
P	-----
FPy	5'TTCGTCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGC-----
RPy	-----

	Sequence
Amplikon	GATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGAT GACACCCATGAATTGGGATCTTATGGCCGGCCTGCGGCAGGGTTTACCCGTGTGCA3'
<i>T. brucei gambiense</i>	-----G--A-----C-----ACA-CATT-GGT---C-T-TGGC--CC-ITTG--CCGAC
<i>T. brucei rhodesiense</i>	-----G--A-----C-----ACA-CATT-GGT---C-T-TGGC--CC-ITTG--CCGAC
<i>T. cruzi</i>	GTACTGGTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCGCACC---C-ACTACAG-G-AG-C-T-TT--AG-AT-C-TTCCT--AT--A---CCAAA-TGTGGGGATCGAA-ATGATTAG--ACCA-TGTAGTCCA--
P	-----5'TGTGGAGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAA3'-----
FPy	-----
RPy	-----3'TACCCGGCCGGACGCCGTCCCAAATGGGACACAGT3'

Die Trypanosomen haben zum Teil ähnliche DNA-Sequenzen wie die Leishmanien, deswegen wurde auch anfänglich die Kombination von FPy und RPy für den *Leishmania* 18S rRNA-RPA anhand dieser Tabelle ausgewählt. Das Amplikon wurde aus dem DNA-Standard aus dem *L. tropica* 18S ribosomale RNA Gen (18S rRNA, GenBank *accession number*: GQ332354 – GQ332363) synthetisiert. FPy und RPy sind die Primer und P die Sonde.

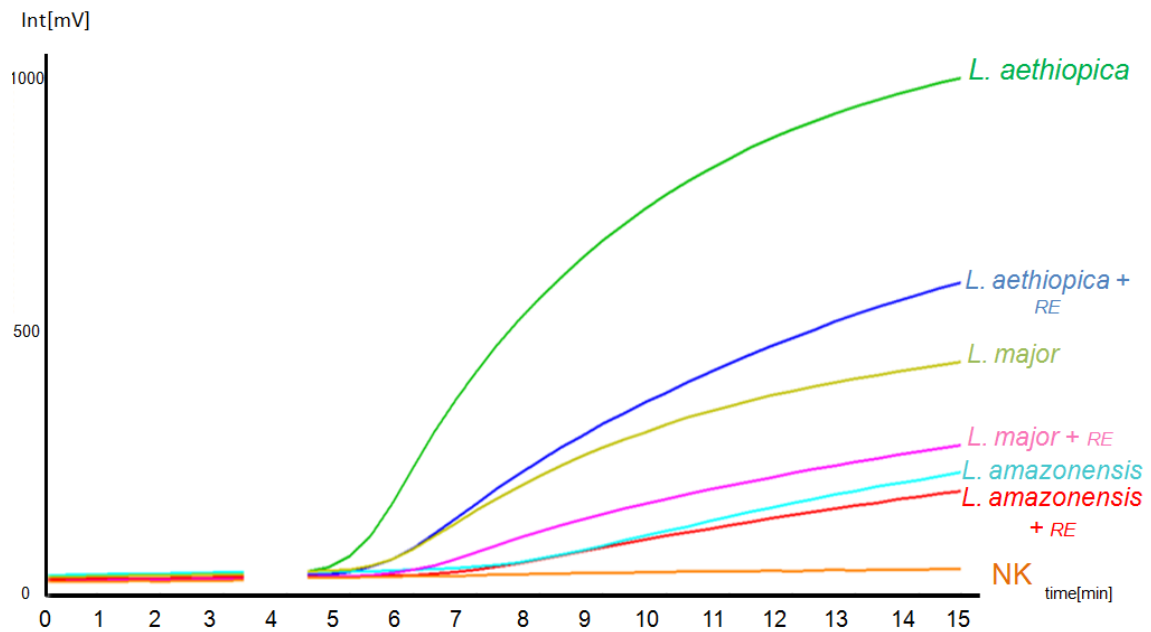


Tabelle S6: Accession-Nummern für *Leishmania* Cpb-Gene aus unterschiedlichen Spezies und Stämmen und Anzahl der *mismatches* innerhalb der Primer und der Sonde

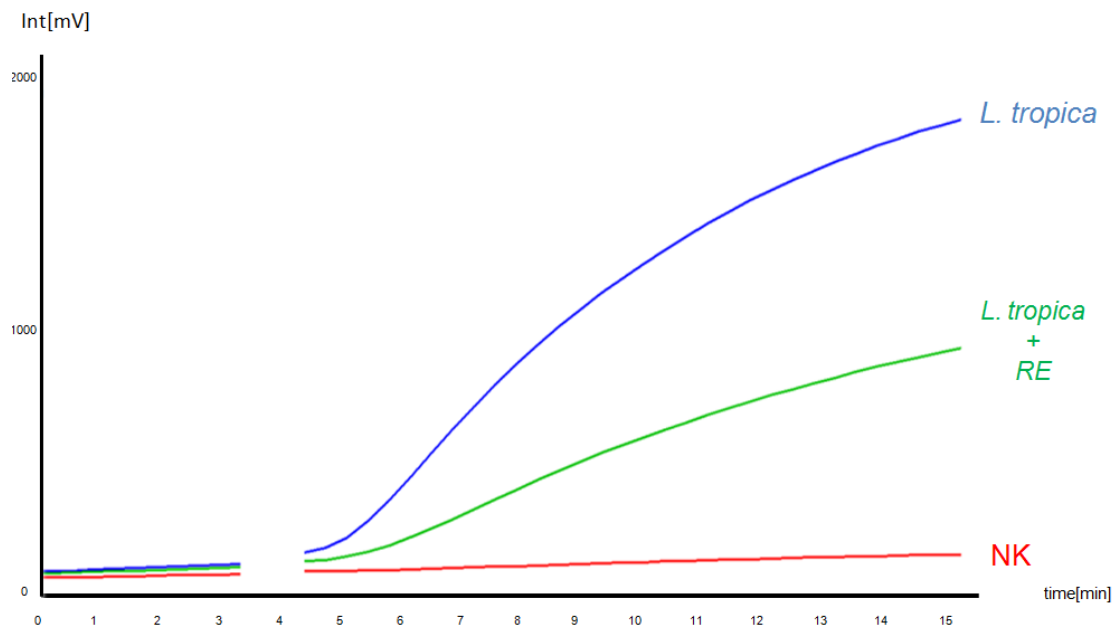
<i>Leishmania</i>	Accession-Nummer	Anzahl der <i>mismatches</i>		
		FP	RP	P
<i>L. tropica</i>	DQ286773 (amplikon)	0	0	0
	JN400182	0	1	1
	KY412786/JN400183	0	4	5
	JN400176	0	0	1
	JN400177	0	1	1
	JN400178	0	4	2
	JN400179	0	1	1
	JN400180	0	0	1
	JN400181	0	1	1
	JN400184	3	1	4
<i>L. major</i>	AJ512654/FR796404/JN400140/JN400141/ JN400142/JN400143/JN400143/JN400144/ JN400145/JN400146/JN400147/JN400148/ JN400149/JN400150/JN400151/JN400152/ JN400153/JN400154/JN400155/JN400156/ JN400157/JN400158/JN400159/JN400160/ JN400161/JN400162/JN400163/JN400164/ JN400165/JN400166/JN400167/JN400168/ JN400169/JN400170/JN400171/JN400172/ JN400173/JN400174/JN400175/JN944168/ JN944169/JN944170/JN944171/JN944172/ JN944173/JN944174/JN944175/KY412783/ KY412783	2	1	4
<i>L. aethiopica</i>	DQ071678	2	2	5
	HM178938/HM178939	2	4	5
	HM178941/HM178935	2	2	3

<i>Leishmania</i>	Accession-Nummer	Anzahl der mismatches		
		FP	RP	P
<i>L. infantum</i>	AJ628942/AY896776/AY896778/AY896780/ AY896782/AY896790/AY896791/XM003392190/ XM001463394	3	2	3
	GQ302670/AJ420286/AJ628943/AY896777/ EU637907/FR796440/JN400122/JN400123/ JN400124/JN400125/JN400126/JN400127/ JN400128/JN400129/JN400130/JN400131	3	2	3
	JN400128	2	2	4
	GQ302671	2	2	3
	GQ302674	2	2	3
<i>L. chagasi</i>	AF217087	2	2	3
	AF004592	2	3	3
<i>L. donovani</i>	AY896783/CP022623/GQ302672/GQ265875	2	2	3
	AY896785/AY896786/GQ302673/EU637908/ EU637909/EU637910/EU637911/EU637912/ EU637913/HQ159842/GQ302673	2	2	3
	FR799595/XM003858609/AY309627/AF309627	2	2	4
	KC609324	3	2	3
	AF309626/GU143558	3	2	3
	AF004592	2	3	3
<i>L. amazonensis</i>	AJ319727/AY141758/AY141759	12	8	16
<i>L. mexicana</i>	AJ319727	5	2	7
	Z49963	5	1	6
	Y09958/Z14061	5	1	3
	XM003886488/XM003872608	5	1	6
	XM003886523/XM003872607	5	1	6
<i>L. braziliensis</i>	XM001562089	5	4	10
	AY850168	4	6	12
	XM001562090	4	4	10
	XM001562091	4	4	10
	GQ180933	6	4	10
<i>L. panamensis</i>	EU289030/XM010705915	6	4	10
<i>L. guyanensis</i>	AJ512653/GQ180993	6	4	10

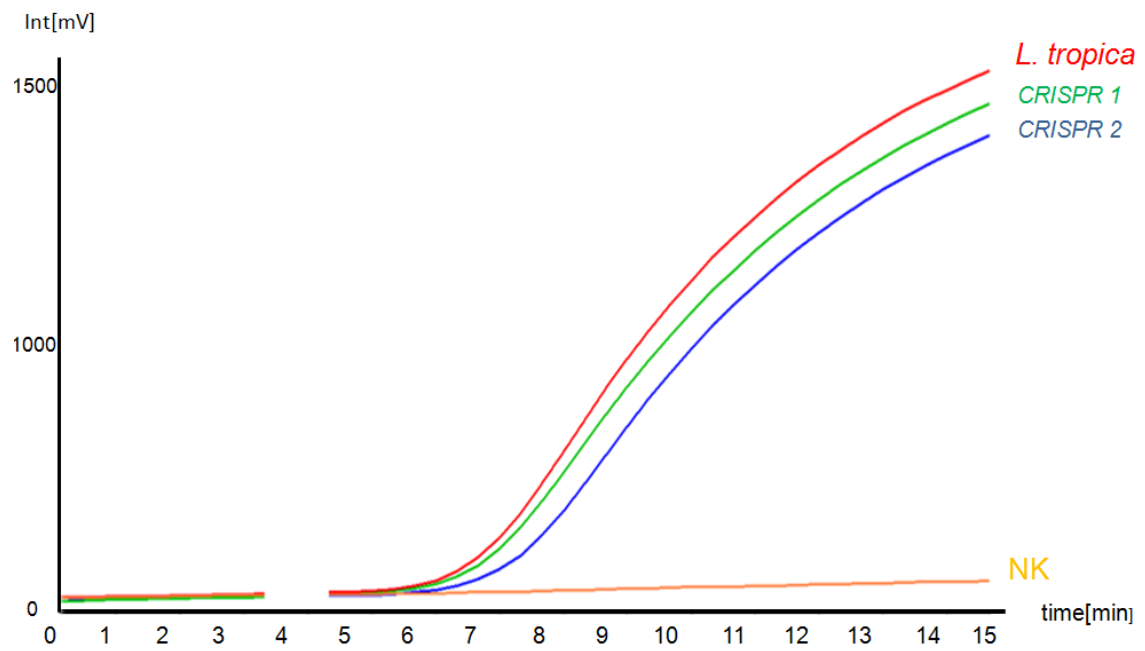




**Abbildung S1: *Leishmania* CpB-RPA nach Vorbehandlung der DNA mit dem Restriktionsenzym PFIMI.** Ein RPA-Lauf wurde mit *L. aethiopica*-, *L. major*-, *L. amazonensis* gDNA und mit *L. aethiopica*-, *L. major*-, *L. amazonensis* gDNA nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym PFIMI mit einer DNA-Konzentration von 40 – 100 ng/ $\mu$ l durchgeföhrt. Für die negative Kontrolle (NK) wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenz aufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeföhrt.



**Abbildung S2: *Leishmania* CpB-RPA nach Vorbehandlung der DNA mit dem Restriktionsenzym EcoO109I.** Ein RPA-Lauf wurde mit *L. tropica* gDNA und mit *L. tropica* gDNA nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym EcoO109I mit einer DNA-Konzentration von 40 – 100 ng/ $\mu$ l durchgeföhrt. Für die negative Kontrolle (NK) wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Zwischen 3 und 4 min wurde keine Fluoreszenzaufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeföhrt.



**Abbildung S3: *Leishmania* Cpb-RPA nach Vorbehandlung von *L-tropica*-DNA mittels CRISPR/Cas.** Ein RPA-Lauf wurde mit CRISPR 1-, CRISPR 2- und nicht vorbehandelter *L-tropica*-DNA mit einer Konzentration von 40 – 100 ng/ $\mu$ l durchgeführt. Für die negative Kontrolle (NK) wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Zwischen 4 und 5 min wurde keine Fluoreszenzaufgezeichnet, da ein Mischschritt notwendig ist, um die Testempfindlichkeit zu erhöhen. Das Experiment wurde mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alonso DP, Costa DL, de Mendonça IL, Costa CH, Ribolla PE (2010): Heterogeneity of *leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Med Hyg* **82**, 819-21
- Alvar J, Croft S, Olliaro P (2006): Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* **61**, 223-74
- Ameen M (2007): Cutaneous leishmaniasis: Therapeutic strategies and future directions. *Expert Opin Pharmacother* **8**, 2689-99
- Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, Parravicini C, Corbellino M (2009): Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis?. *Am J Trop Med Hyg* **81**, 46-51
- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E (1999): PCR detection and identification of *leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* **85**, 181-7
- Beaver PC, Cupp EW, Jung RC: Clinical parasitology. 9. Auflage; Lea and Febiger, Philadelphia 1984
- Beverley SM, Turco SJ (1995): Identification of genes mediating lipophosphoglycan biosynthesis by functional complementation of *leishmania donovani* mutants. *Ann Trop Med Parasitol* **89**, 11-7
- Bianco PR, Tracy RB, Kowalczykowski SC (1998): DNA strand exchange proteins: A biochemical and physical comparison. *Frontiers in Bioscience: Front Biosci* **3**, D570-603
- Blanco R, Guisan J, Halling P (1989): Agarose-chymotrypsin as a catalyst for peptide and amino acid ester synthesis in organic media. *Biotechnol Lett* **11**, 811-6
- Boch J (2011): TALEs of genome targeting. *Nat. Biotechnol* **29**, 135-6
- Bogdan C, Rölinghoff M (1998): The immune response to *leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* **28**, 121-34
- Bogdan C, Schönian G, Bañuls AL, Hide M, Pralong F, Lorenz E, Rölinghoff M, Mertens R (2001): Visceral leishmaniasis in a German child WHO had never entered a known endemic area: Case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* **32**, 302-6
- Bryceson A (2001): A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health* **6**, 928-34
- Carter KC, Hutchison S, Henriquez FL, Légaré D, Ouellette M, Roberts CW, Mullen AB (2006): Resistance of *leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 88-95
- Cathomen T, Joung JK (2008): Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol. Ther.* **16**, 1200-7
- Chaouch M, Fathallah-Mili A, Driss M, Lahmadi R, Ayari C, Guizani I, Ben Said M, Ben Abderrazk S (2013): Identification of Tunisian *Leishmania spp.* by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis. *Acta Trop* **125**, 357-65
- Choi CM, Lerner EA (2002): Leishmaniasis: Recognition and management with a focus on the immunocompromised patient. *Am J Clin Dermatol* **3**, 91-105

- Chow WH, McCloskey C, Tong Y, Hu L, You Q, Kelly CP, Kong H, Tang YW, Tang W (2008): Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *clostridium difficile*. *J Mol Diagn* 10, 452-8
- Chulay JD, Manson-Bahr PEC: Leishmaniasis. In Hunter's Tropical Medicine 36th. G.T. Strickland (Hrsg.): Saunders, Philadelphia 1984, 574-93
- Compton J (1991): Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91-2
- Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J (2002): *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359, 1124-5
- Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood S, Davarpanah MA, Soleimanpoor H, Daneshbod K (2011): Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med* 135, 478-82
- Desjeux P (2004): Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27, 305-18
- Donovan C (1903): The Etiology of one of the hetro geneous fevers of India. *Br Med J* 2, 1401
- DTG (2010): Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland. S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) in Zusammenarbeit mit der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG) und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. [https://dtg.org/images/Leitlinien\\_DTG/Leitlinie\\_Kutane\\_Leishmaniasis.pdf](https://dtg.org/images/Leitlinien_DTG/Leitlinie_Kutane_Leishmaniasis.pdf); abgerufen am 21.11.2020
- DTG (2016): Diagnostik und Therapie der viszeralen Leishmaniasis (Kala –Azar). S1-Leitlinie: Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG). [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/04004l\\_S1\\_viszerale\\_Leishmaniasis\\_Kalar\\_Azar\\_2017-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/04004l_S1_viszerale_Leishmaniasis_Kalar_Azar_2017-01.pdf); abgerufen am 21.11.2020
- Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, Gutierrez Fernandez J (2014): Diagnosis of Leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 8, 961-72
- Faye O, Faye O, Soropogui B, Patel P, Abd El Wahed A, Loucoubar C, Fall G, Kiory D, Magassouba N, Keita S et al. (2015): Development and deployment of a rapid recombinase polymerase amplification *ebola* virus detection assay in Guinea in 2015. *Euro Surveill* 20, 10-8
- Formosa T, Alberts BM (1986): Purification and characterization of the T4 bacteriophage UvsX protein. *J Biol Chem* 261, 6107-18
- Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, Pralong F, Costa JM, Bretagne S (2007): Detection and identification of *leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *J Clin Microbiol* 45, 2110-5
- Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC (2005): American tegumentary leishmaniasis: Antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol* 5, 109-16
- Geojith G, Dhanasekaran S, Chandran SP, Kenneth J (2011): Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of *mycobacterium tuberculosis* isolates in a resource limited setting. *J Microbiol Methods* 84, 71-3
- Gothé R, Nolte I, Kraft W (1997): Leishmaniose des Hundes in Deutschland: epidemiologische Fallanalyse und Alternative zur bisherigen kausalen Therapie. *Tierärztl. Praxis* 25, 68-73
- Grevelink SA, Lerner EA (1996): Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 34, 257-72

- Grimaldi G, Tesh RB (1993): Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6, 230-50
- Harris LD, Griffith JD (1988): Formation of D loops by the UvsX protein of T4 bacteriophage: A comparison of the reaction catalyzed in the presence or absence of gene 32 protein. *Biochemistry* 27, 6954-9
- Hashemi SA, Hashemi SA, Badirzadeh A, Sabzevari S, Nouri A, Seyyedini M (2018): First case report of atypical disseminated cutaneous leishmaniasis in an opium abuser in Iran. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 60, e5
- Herwaldt BL (1999): Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-9
- Hide M, Bañuls A-L (2006): Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. *Acta Trop* 100, 241-5
- Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, Du Y, Sun Z, Wu X, Du J, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS (2003): Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res* 13, 954-64
- Jha TK, Olliaro P, Thakur CP, Kanyok TP, Singhanian BL, Singh IJ, Singh NK, Akhoury S, Jha S (1998): Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in north Bihar, India. *BMJ* 316, 1200-5
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-21
- Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D (2000): Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351-4
- Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD, Kaushal H, Lezama-Davila C, Salotra P, Satoskar AR (2011): A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. *Am J Trop Med Hyg* 85, 64-5
- Kirk R, Sati MH (1940): Studies in leishmaniasis in the Anglo-Egyptian Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 34, 213-6
- Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schönián G, Zahner H, Burkhardt E (2002): Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by leishmania *infantum*. *Vet Parasitol* 109, 9-17
- Kubar J, Fragaki K (2005): Recombinant DNA-derived *leishmania* proteins: From the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* 5, 107-14
- Kuru T, Janusz N, Gadisa E, Gedamu L, Aseffa A (2011): *Leishmania aethiopica*: Development of specific and sensitive PCR diagnostic test. *Exp Parasitol* 128, 391-5
- Kutyavin IV (2008): Use of base-modified duplex-stabilizing deoxynucleoside 5' triphosphates to enhance the hybridization properties of primers and probes in detection polymerase chain reaction. *Biochemistry* 47, 13666-73
- Lainson R (1983): The American leishmaniasis: Some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77, 569-596
- Lang W (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Aufl. Georg Thieme-Verlag. Stuttgart 1996
- Lasken RS, Egholm M (2003): Whole genome amplification: Abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol* 21, 531-5

- Laurent T, Van der Auwera G, Hide M, Mertens P, Quispe-Tintaya W, Deborggraeve S, De Doncker S, Leclipteux T, Bañuls AL, Büscher P et al. (2009): Identification of old world *leishmania spp.* by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* **63**, 173-81
- Leishman WB (1903): On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *BMJ* **1**, 1252-4
- Leon W, Fouts DL, Manning J (1978): Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res* **5**, 491-504
- León CM, Muñoz M, Tabares JH, Hernandez C, Florez C, Ayala MS, Ramírez JD (2018): Analytical Performance of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for *Leishmania* DNA Detection in Sandflies and Direct Smears of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **98**, 1325-31
- Leventhal R, Cheadle RF: *Medical Parasitology: A self-instructional text*, Philadelphia 1985
- Lillis L, Lehman D, Singhal MC, Cantera J, Singleton J, Labarre P, Toyama A, Piepenburg O, Parker M, Wood R (2014): Non-instrumented incubation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of proviral HIV-1 DNA. *PloS One* **9**, e108189
- Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH (2016): Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. *HIV AIDS (Auckl)* **8**, 147-56
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls k, Tintaya KW, Jirku M, Chocholova E (2007): Evolutionary and geographical history of the *leishmania Donovanii* Complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9375-80
- Lux H, Hart DT, Parker PJ, Klenner T (1996): Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues. *Adv Exp Med Biol* **416**, 201-11
- Manson-Bahr PEC, Bell DR: *Manson's Tropical Diseases*, London 1996
- Mauel J, Behin R: Leishmaniasis: Immunity immunopathology and immunodiagnosis. In S. Cohen and K. S. Warren (Hrsg.): *Immunology of parasitic diseases*, Blackwell Scientific, Boston, Mass, Oxford 1982, 299–312
- McCulloch CE, Searle SR: *Generalized, linear, and mixed models*; John Wiley & Sons, New York 2001
- Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J (1999): Infection of sand flies by humans coinfecting with *leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 51-3
- Mondal D, Ghosh P, Khan MA, Hossain F, Böhlken-Fascher S, Matlashewski G, Kroeger A, Olliaro P, Abd El Wahed A (2016): Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasit Vectors* **9**, 281
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T (2001): Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 150-4
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T (2004): Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods* **59**, 145-57
- Morillas-Marquez F, Martin-Sanchez J, Acedo-Sanchez C, Pineda JA, Macias J, Sanjuan-Garcia J (2002): *Leishmania Infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Exp Parasitol* **100**, 71-4



- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005): Advances in Leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-77
- Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002): Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16, 223-9
- Nascimento MD, Alcântara-Neves NM, Muniz ME, Nunes SF, Paranhos M, de Carvalho LC (1993) Induction and modulation of the immune response to *leishmania* by Montenegro's skin test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87, 91-3
- Naucke TJ, Pesson B (2000): Presence of phlebotomus (transphlebotomus) *Mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitol Res* 86, 335-6
- Njiru ZK, Mikosza ASJ, Matovu E, Enyaru JCK, Ouma JO, Kibona SN, Thompson RCA, Ndung'u JM (2008): African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int J Parasitol* 38, 589-99
- Nzulu CO, Kato H, Peters NC (2019): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLoS neglected tropical diseases* 13, 116-9
- Oddone RC: La intradermoreacción de Montenegro en la leishmaniasis tegumentaria; Annual reports Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción 1994
- Opitz M: Hautmanifestationen bei der Leishmaniose des Hundes, *Tierärztl Praxis* 1996, 284-91
- Peters N, Sacks D (2006): Immune Privilege in Sites of Chronic Infection: *Leishmania* and Regulatory T Cells. *Immunol Rev* 213, 159-79
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA (2006): DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol* 4, e204
- Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL (1992): Stage-specific adhesion of *leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256, 1812-5
- Piscopo TV, Azzopardi CM (2007): Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 83, 649-57
- Quispe Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC (2004): Antigen genes for molecular epidemiology of Leishmaniasis: Polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *leishmania donovani* Complex. *J Infect Dis* 189, 1035-43
- Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuypere S, Hide M, Bañuls AL, De Doncker S, Rijal S, Cañavate C, Campino L, Dujardin JC (2005): Fluorogenic assay for molecular typing of the *leishmania donovani* Complex: Taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis* 192, 685-92
- Ready PD (2010): Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 15, 19505
- Reithinger R, Dujardin JC (2007): Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45, 21-5
- Requena JM, Soto M, Quijada L, Alonso C (1997): Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 853-8
- Rittig MG, Bogdan C (2000): *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16, 292-7
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF (1990): Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71, 267-75

- Ross R (1903): Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *BMJ* 2, 1261-2
- Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J (1997): *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Exp Parasitol* 85, 63-76
- Sampson TR, Weiss DS (2014): Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays* 36, 34-8
- Schneider P, Wolters L, Schoone G, Schallig H, Sillekens P, Hermsen R, Sauerwein R (2005): Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol* 43, 402-5
- Seifert K (2011): Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med Chem J* 5, 31-9
- Shibata T, Cunningham RP, DasGupta C, Radding CM (1979): Homologous pairing in genetic recombination: complexes of recA protein and DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5100-4
- Silveira TG, Arraes SM, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MV, Roberto AC, Ramos M, Nerilo Sobrinho A, Ishikawa E, Shaw J (1999): [The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Paraná State, southern Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 413-23
- Smith DF, Peacock CS, Cruz AK (2007): Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37, 1173-86
- Sundar S, Chatterjee M (2006): Visceral leishmaniasis - Current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 123, 345-52
- Symmers WC (1960): Leishmaniasis acquired by contagion. A case of marital infection in Britain. *Lancet* 1, 127-32
- Sypek JP, Wyler DJ: Host defense in leishmaniasis. In: Leech, J.H., Sande, M.A., Rook, R.K. (Hrsg.) *Parasitic Infections*. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh 1988, 221-42.
- Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Zaniewski AE, Houlihan HH, Olliaro P (2000): A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 429-31
- Tuon FF, Bombonato GM, Battaglin ER, Sakumoto MH, Amato VS, de Camargo RA, Nicodemo AC (2014): Reactivation of mucosal and cutaneous leishmaniasis in a renal transplanted patient. *Am J Trop Med Hyg* 91, 81-3
- Urbina JA (1997): Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 114, S91-9
- Van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, Peekel I, Schallig H (2008): Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *leishmania* parasites. *J Clin Microbiol* 46, 73-8
- Villalba E, Ramirez JL (1982): Ribosomal DNA of *Leishmania brasiliensis*: number of ribosomal copies and gene isolation. *J Protozool* 29, 438-41
- Walochnik J, Aspöck H (2010): Sandmücken, leishmanien und leishmaniosen – neue dimensionen alter Krankheiten. In: Aspöck H (Hrsg.): *Krank durch Arthropoden*. *Denisia* 30, 673-94
- Wang Y, Li Z, Xu J, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, Huang Y, Tan A (2013): The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *bombyx mori*. *Cell Res* 23, 1414-6



- Wittwer C, Hahn M, Kaul K: Rapid cycle real-time PCR -Methods and Applications: Quantification. Springer-Verlag, Berlin 2004
- Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, Ockenhouse CF (2005): Rapid identification of *leishmania* complexes by a real-time PCR assay. Am J Trop Med Hyg 73, 999-1004
- Yang S, Rothman RE (2004): PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis 4, 337-48
- Yonesaki T, Ryo Y, Minagawa T, Takahashi H (1985): Purification and some of the functions of the products of bacteriophage T4 recombination genes, UvsX and UvsY. Eur J Biochem 148, 127-34
- Zhong C, Peng D, Ye W, Chai L, Qi J, Yu Z, Ruan L, Sun M (2011): Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. PLoS One 6, e16025

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Prof. Dr. Carsten Lüder und meinem Projektleiter Dr. Ahmed Abd El Wahed für die Überlassung des interessanten Themas sowie auch für die freundliche Unterstützung und Betreuung ganz herzlich bedanken. Danke für die unermüdliche Motivation, die Hilfe im Labor, die Begutachtung der Dissertation und, vor allen Dingen, für Ihre Zeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem Ko-Betreuer Herrn Prof. Dr. Timo Buhl für den fachlichen und freundschaftlichen Beistand.

Nicht zuletzt bin ich allen dankbar, die mit mir im Labor gearbeitet haben, und auch allen, die mir bei der Korrektur und Überarbeitung meiner Dissertation mit kritischen Anregungen und Nachfragen weitergeholfen haben.