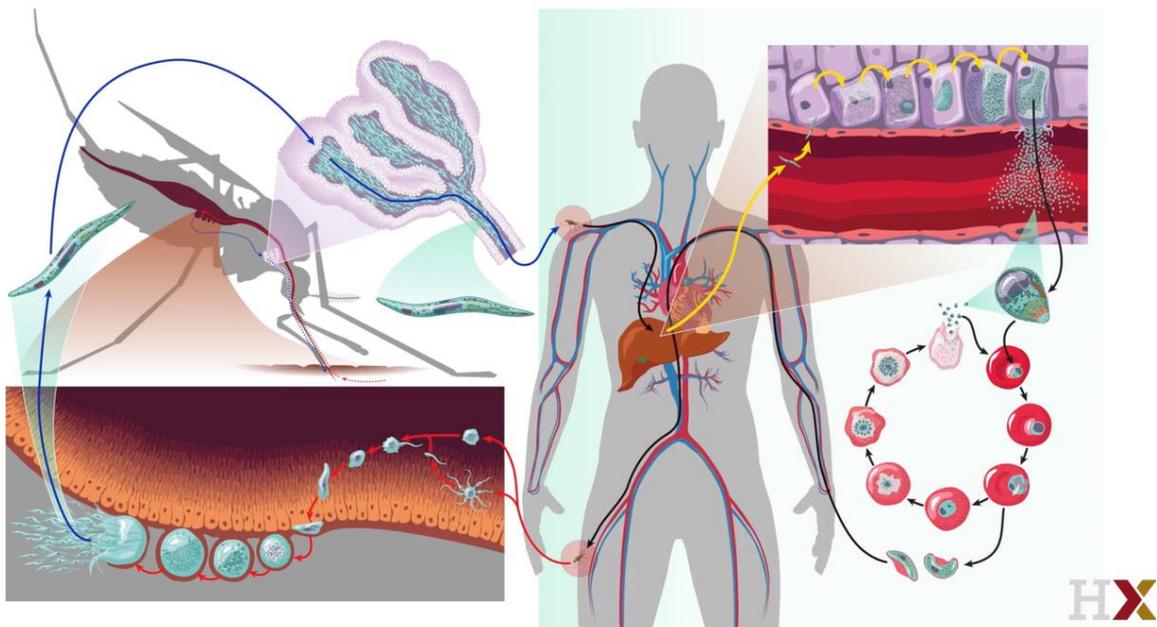


Malaria tropica  
- Untersuchungen zur genetischen Diversität  
von *Plasmodium falciparum*  
auf Bioko Island  
in Äquatorialguinea



Maturaarbeit von Koranan Blöchliger  
Gymnasium Muttenz, Klasse 4BZ  
Betreuungslehrperson Frau Regina Bandi  
2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b>	4
<b>Dank</b>	5
<b>Zusammenfassung</b>	6
<b>1 Einleitung</b>	
1.1. Malaria	7
1.1.1 Malaria: Eine alte Geißel der Menschheit	7
1.1.2 Biologie und Charakteristika des Parasiten	9
Malariaparasiten im Menschen:	
Leberzellen: asexueller exo-erythrozytärer Zyklus (Leber-Schizogonie)	9
Rote Blutkörperchen:	
A asexueller intra-erythrozytischer Zyklus (erythrozytische Schizogonie)	10
B Sexuelle erythrozytische Phase	10
Malariaparasiten in der Mücke:	
A sexuelle Gametozyten-Replikation	11
B Fertilisation und asexuelle Sporogonie	11
1.1.3 Pathogenese und natürlich erworbene Immunität	12
Pathogenese:	
A Unkomplizierte Malaria	12
B Schwere Malaria	12
Natürlich erworbene Immunität für Malaria	13
1.1.4 Epidemiologie	13
1.1.5 Malaria-Bekämpfung: Historischer Überblick und Ausblick Erfolge und Herausforderungen	14
1.2 Malaria-Diagnose	15
1.2.1 Malaria-Schnelltest (RDT)	16
1.3 Malaria-Prophylaxe und -Behandlung	16
1.4 Molekulare Epidemiologie	17
1.4.1 Genetische Diversität und Malaria Transmission	17

1.5	Bioko Island	19
1.5.1	Malaria auf Bioko Island	20
	A Vorkommen	20
	B Malariabekämpfung	20
1.6	Ziel und Hypothese	21
1.6.1	Ziel	21
1.6.2	Spezifisches Ziel	21
1.6.3	Hypothese	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	
2.1	Extraktion von Nukleinsäure von vorhandenen RDTs	22
2.2	Verschachtelte PCR (nPCR)	22
2.3	Agarose-Gelelektrophorese.	23
2.4	Praktischer Teil	23
2.4.1	Genotypisierung mittels nPCR und Gelelektrophorese	23
2.4.2	Amplifikation der DNA mittels nPCR	24
	1. PCR (genspezifisch)	24
	2. PCR (allelspezifisch)	30
2.4.3	Visualisierung der Allele mittels Agarose-Gelelektrophorese	34
2.5	Daten-Analyse	38
2.6	Schriftliche Befragung von einer Expertin und zwei Experten des Swiss TPH	39
<b>3</b>	<b>Resultate</b>	
3.1	Studienpopulation	40
3.2	Häufigkeiten von <i>msp1</i> und <i>msp2</i> Alleltypen	40
3.2.1	Alleltypen in den Altersgruppen	41
3.2.2	Alleltypen nach Provinzen	42
3.3	Häufigkeiten von <i>msp1</i> und <i>msp2</i> Allel-Basenpaarlängen	43
3.4	Parasitendichte in den RDT-Proben	48

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Material und Methoden	51
4.2	Resultate	52
	4.2.1 Altersgruppenvergleich bezüglich der Genotypenanzahl	53
	4.2.2 Genetische Diversität in Abhängigkeit von den Basenpaarlängen	54
	4.2.3 Parasitendichte und Genotyp	55
	4.2.4 Vergleich von Nord- und Südprovinz	55
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	57
	<b>Schlusswort</b>	58
	<b>Verzeichnisse</b>	
	Abkürzungen	59
	Abbildungsverzeichnis	61
	Tabellenverzeichnis	63
	Diagrammverzeichnis	63
	Referenzen	64

## **Anhang**

Onlinekurs-Zertifikat von von HarvardX, Harvard University: Certificate of Achievement,  
24.6.2020: PH425x: Malaria X: Defeating Malaria from the Genes to the Globe

Probenliste

Laborprotokoll

## **Redlichkeitserklärung**

## Vorwort

Die DNA ist das Erbgut, welches jedes Lebewesen auf der Welt definiert – ich war schon immer fasziniert davon, wie aus etwas so vermeintlich Kleinem wie die DNA eine grossartige Vielfalt an Leben entsteht. Bevor das Thema Maturaarbeit für uns relevant wurde, hatte ich schon eine ungefähre Ahnung, in welche Richtung meine Arbeit gehen würde: Im Biologieunterricht setzten wir uns mit der Genetik auseinander. Die Komplexität des Aufbaus eines Lebewesens inspirierte mich, eine Arbeit im naturwissenschaftlich-genetischen Bereich durchzuführen. Die Forschungsfelder in der Genetik sind jedoch sehr vielfältig, weshalb die ersten Anläufe zur Themenfindung schwierig waren. Es fühlte sich wie bei einer Jobsuche an. Zahlreiche Schülerinnen und Schüler gingen im gleichen Zeitraum auf die Jagd nach Praktikumsstellen. Die Zeit verging und die Stellen wurden immer weniger. Zudem rückte die Deadline für die Matura-Themenfindung stetig näher. Es war wie verhext und ich war an dem Punkt angelangt, mich mit einem anderen Thema zufriedengeben zu müssen. Ein Hoffnungsschimmer entstand schliesslich, als ich die grosse Chance erhielt, meine Maturaarbeit beim Schweizerischen Tropen- und Public Health-Institut, dem Swiss TPH in Basel, zu Malaria durchführen zu dürfen. Dieses Thema ist höchstinteressant und zugleich sehr aktuell. Zudem haben sich meine Wünsche für eine Arbeit im genetischen Bereich erfüllt: Ich durfte eine Laborrarbeit durchführen, bei welcher ich das Verfahren der PCR sowie der Gelelektrophorese erlernen konnte. Sie werden in der genetischen Forschung intensiv genutzt. Ich bin sehr dankbar, dieses wertvolle genetische Grundwissen aus der Arbeit mitnehmen zu dürfen.

Als Einstieg ins Thema hatte mir meine Betreuungslehrperson Frau Bandi empfohlen, den Malaria Onlinekurs der Harvard University zu absolvieren. Ich habe mich im April für den Kurs angemeldet und habe ihn im Juni mit einem Zertifikat erfolgreich abgeschlossen.

## Dank

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Biologielehrerin und Betreuungslehrperson Frau Bandi dafür, dass sie mich stets mit hilfreichen Ratschlägen unterstützt hat. Sie hat mich bei der Themenfindung sehr ermutigt sowie mir aktiv geholfen und sogar ihre freie Zeit dafür geopfert. Ich bin sehr dankbar für ihr grosses Engagement und ihr Vertrauen, das mir bei der Arbeit relativ viel Flexibilität und Selbstorganisation ermöglichte. Meine Maturaarbeit am Swiss TPH konnte dank Frau Prof. Daubenberger realisiert werden. Ich durfte im Institut meine Laborarbeit durchführen, dabei neue Methoden erlernen sowie tolle, interessante Personen kennenlernen. Ich danke ihr ebenfalls herzlich dafür, dass sie sich sofort für eine Befragung bereiterklärt hat. Ich bin sehr froh, dass sie mir Salome Hosch als Betreuungsperson zur Seite gestellt hat. Salome Hosch ist Master of Science (MSc) und arbeitet als Doktorandin im Department of Medical Parasitology and Infection Biology unter der Leitung von Frau Prof. Daubenberger. Sie hat mich bei meiner Laborarbeit mit grosser Geduld und Gutmütigkeit betreut und durch das neue Thema geleitet sowie bei meiner schriftlichen Arbeit sehr unterstützt. Ich danke ihr herzlich für ihren grossen Einsatz und Hilfestellungen (wie die Vorbereitung der Probenliste von den 50 Malariaschnelltests, die Zusammenstellung der Exceltabellen mit den Resultaten der Gelelektrophoresen, das Ausdrucken der Gelbilder, die Erstellung eines Kasten-Diagramms, die zur Verfügung gestellten Bilder zu Bioko Island und zu *Plasmodium falciparum*, die Unterstützung bei den statistischen Berechnungen) und viele allgemeine Anregungen, Ergänzungen und Korrekturen - ich hoffe, ich habe nichts vergessen. Sie hat viel Zeit und Mühe in mein Projekt investiert. Bei Fragen war sie jederzeit für eine ausführliche und prompte Beantwortung verfügbar. Ich durfte sie auch als Person besser kennen und schätzen lernen. Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Tobias Schindler, welcher sich mit tollen Ideen, wie z.B. die schriftliche Befragung zur Vervollständigung meiner Arbeit, engagiert hat. Ebenso bin ich ihm sehr dankbar, dass er sich für die Befragung zur Verfügung gestellt hat. Ich wurde von Frau Prof. Daubenbergers Forschungsgruppe sehr liebevoll aufgenommen und bin ihnen dafür enorm dankbar. Das Umfeld war sehr familiär und offen und ich fühlte mich sehr wohl. Ich hatte eine schöne und lehrreiche Zeit. Ebenfalls bedanke ich mich herzlich beim gesamten Team des Swiss TPH. Vielen Dank an Frau Zbären, die mich sehr nett weitervermittelt hat. Und zu guter Letzt ein grosses herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Marcel Tanner, welcher an meiner Befragung teilnahm, trotz den vielen täglichen Anfragen. Ich fühle mich sehr geehrt, dass er sich die Zeit für meine Arbeit genommen hat. Im Allgemeinen fühle ich mich geehrt, dass ich diese vielen Erfahrungen machen durfte und ich von allen so verwöhnt wurde. Ich habe die Zeit sehr genossen und bin sehr froh, dass ich meine Maturaarbeit am «Tropeli» durchführen konnte. Vielen lieben Dank an meine Mutter für ihre Unterstützung. Sie hat mir mit Ratschlägen und Ideen stets weitergeholfen. Ausserdem bedanke ich mich bei ihr und Salome für das Durchlesen meiner Arbeit.

## Zusammenfassung

Malaria ist eine grosse Bedrohung für die Gesundheit von Millionen von Menschen. Es sterben weltweit jährlich über 400'000 Personen an Malaria, überwiegend Kleinkinder. Malaria verursacht einen Grossteil der globalen Krankheits- und Todesfälle. In dieser Arbeit werden im Genotypisierungsverfahren die Allele der Merozoiten-Oberflächenproteine *msp1* und *msp2* von *Plasmodium falciparum* identifiziert. Molekulare Marker wie *msp1* und *msp2* ermöglichen es herauszufinden, welche und wie viele Parasitenstämme in einem endemischen Gebiet vorhanden sind. Sie helfen zu verstehen, wie sich die genetische Diversität vom Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* verändert und welche Präventions- und Kontrollmassnahmen effektiv sind.

Die Genotypisierung beruht auf der nested PCR und Agarose-Gelelektrophorese von 50 Malariaschnelltests asymptomatischer Probanden aus Bioko Island vom Malaria Indicator Survey 2018.

Die Resultate der Arbeit zeigen, dass für *msp1* K1 (75%) prädominant ist. Für *msp2* tritt überwiegend 3D7/IC (61%) auf. Für *msp1* RO33 gibt es eine sehr geringe Diversität. Auf Bioko Island gibt es einen grossen Anteil multiklonaler Infektionen. Bei den 5- bis 14-Jährigen gibt es mehr multiklonale als monoklonale Infektionen (12 zu 9). In der Südprovinz treten vergleichsweise deutlich mehr multiklonale als monoklonale Infektionen auf (5 zu 2). Es liegen mehr Alleltypen für *msp1* vor als für *msp2*. Die Genotypanzahl ist bei den unter 5-Jährigen mit 12 Alleltypen tiefer als bei den 5- bis 14-Jährigen und den über 15-Jährigen mit jeweils 17 Alleltypen. In der Nordprovinz gibt es überwiegend multiklonale Infektionen mit *msp1*-Allelen und im Süden gibt es etwa gleich viele multiklonale Infektionen mit *msp1*- und *msp2*-Allelen. Im Norden wurden 23 Alleltypen gefunden, während es im Süden 12 Alleltypen gibt. Die Resultate sind nicht signifikant, was auf die geringe Probezahlen zurückzuführen ist. Die Multiplicity Of Infection (MOI) steigt gesamthaft mit dem Alter von 1,67 auf 2 und ist in der Südprovinz (2,14) höher als im Norden (1,72).

Der Gesamt MOI-Wert liegt bei 1,8, damit ist die MOI immer noch relativ hoch. Das bedeutet, dass Programme zur Malariabekämpfung fortgesetzt werden müssen. Die Genotypisierung von molekularen Markern wie *msp1* und *msp2* liefert wichtige Informationen zur Transmissionsintensität.

# 1. Einleitung

## 1.1 Malaria

### 1.1.1 Malaria: Eine alte Geißel der Menschheit

Der Name Malaria ist vom Italienischen abgeleitet und bedeutet «schlechte Luft», die aus den Sümpfen steigt (Pflanzenforschung 2020). Deshalb wurde die Krankheit früher auch Sumpffieber genannt. Malaria ist eine sehr alte Krankheit, welche sich zusammen mit dem Menschen entwickelt hat.

Im Jahr 1880 fand der französische Mediziner und Bakteriologe Alphonse Laveran heraus, dass einzellige Parasiten Erreger der Malaria sind (Wirth 2020). Der englische Tropenmediziner Ronald Ross entdeckte 1896, dass Mücken Überträger von Malaria sind (Alonso, Marti und Wirth 2020).

Vor rund 100 Jahren war Malaria weltweit verbreitet (Abb. 1.1) - mit wenigen Ausnahmen wie z.B. Grönland, Neuseeland, der Mongolei und Island (Alonso 2020). Die Gefahr einer erneuten großflächigen Ausbreitung besteht bis heute (Abb. 1.2).

**The boundaries of malaria transmission in 1900**

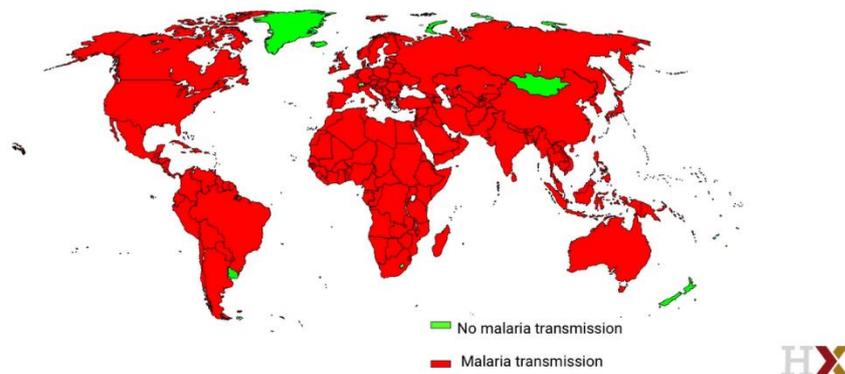


Abbildung 1.1: Malaria-Ausbreitung um 1900 (Quelle: learning.edx 2020)

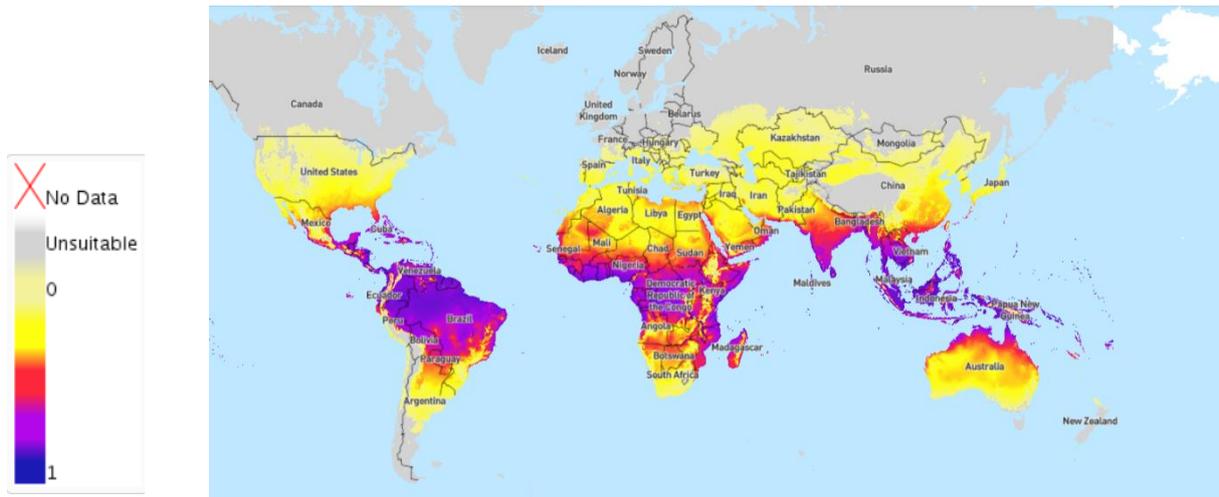


Abbildung 1.2: Möglicher Lebensraum für *Plasmodium falciparum* bezüglich Temperatureignung, 2010 (Quelle: malariaatlas 2020)

Die Krankheit ist aktuell vor allem in den tropischen und subtropischen Gebieten der Erde verbreitet. Die gefährlichste Form ist die sogenannte Malaria tropica, welche von *Plasmodium falciparum* übertragen wird. Afrika ist besonders betroffen (Abb. 1.3).

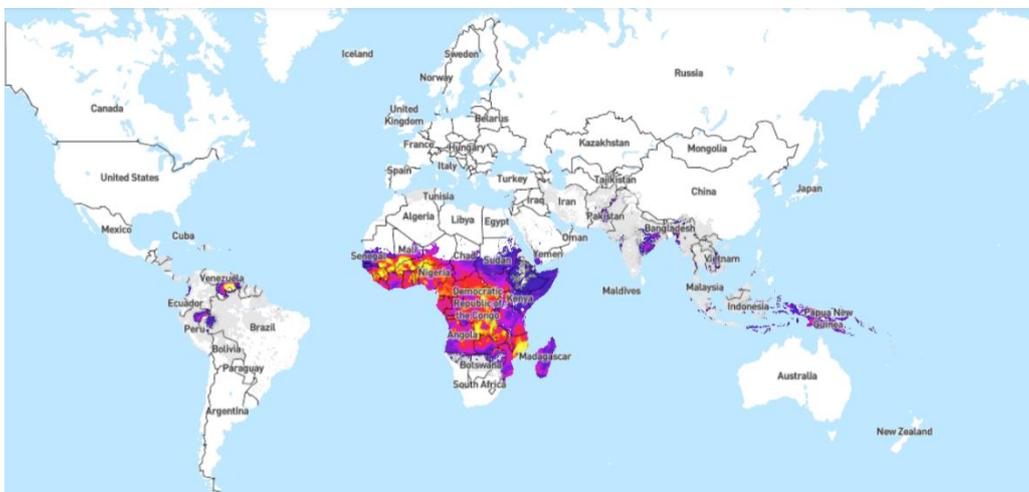


Abbildung 1.3: Weltweit neu auftretende Malariafälle durch *Plasmodium falciparum*, 2000–2017 (Quelle: malariaatlas 2020)

Bis heute sterben weltweit jährlich über 400'000 Personen an Malaria, überwiegend Kleinkinder (Abb. 1.4) (World Malaria Report, WHO 2019). Malaria verursacht einen Grossteil der globalen Krankheits- und Todesfälle (Somé et al. 2018). Weltweit gehen pro Jahr über 62 Millionen gesunde Lebensjahre durch Malaria und weitere Tropenkrankheiten verloren (DALY: Disability Adjusted Life Years in Our World in Data 2017).

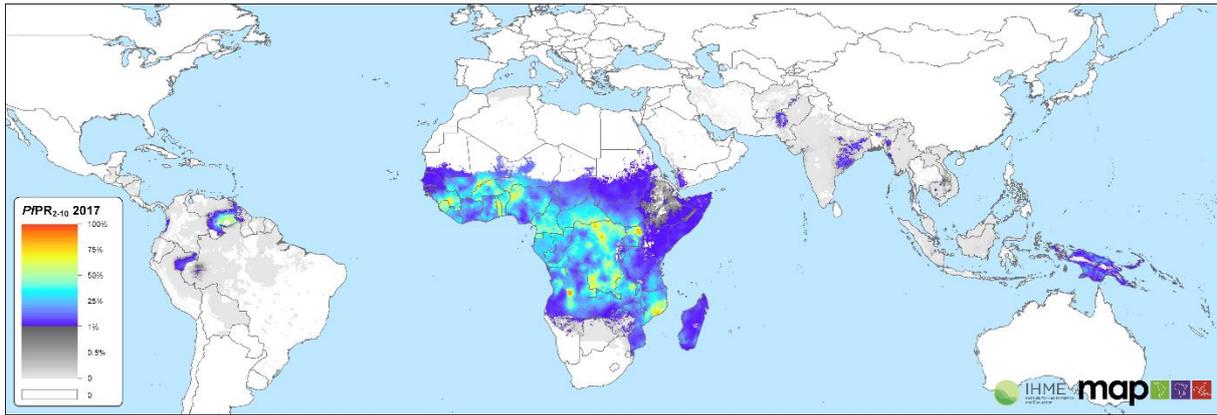


Abbildung 1.4: *Plasmodium falciparum*-Prävalenz bei Kindern zwischen 2 und 10 Jahren, 2017 (Quelle: Malaria Atlas Project 2020)

### 1.1.2 Biologie und Charakteristika des Parasiten

Die Informationen zum folgenden Thema basieren grösstenteils auf dem HarvardX-Malaria-Onlinekurs 'MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe' der Harvard University (2020) von folgenden Referentinnen und folgendem Referenten: Flamina Catteruccia (Anopheles-Mücke), Dyann Wirth und Matthias Marti (*Plasmodium falciparum*-Lebenszyklus).

Plasmodien sind einzellige parasitäre Eukaryoten (Wirth 2020). Sie haben einen komplexen Lebenszyklus mit zwei charakteristischen Zyklen, wobei sie vom ungeschlechtlichen zum geschlechtlichen Kreislauf wechseln.

Die meisten Mücken übertragen keine Malaria, nur weibliche Mücken der Gattung *Anopheles*. Sie werden aus diesem Grund auch als Vektoren bezeichnet. Um Eier legen zu können, benötigen sie eine Blutmahlzeit. Stechen sie einen mit Malaria infizierten Menschen, können sie Malariaparasiten aufnehmen. Nach Abschluss des geschlechtlichen Zyklus in der Mücke werden infektiöse Stadien bei der nächsten Blutmahlzeit in eine andere Person injiziert. Es gibt insgesamt 41 Arten von *Anopheles*-Mücken, die Malaria übertragen (Hosch 2020, Catteruccia 2020).

#### **Malariaparasiten im Menschen:**

##### **Leberzellen: asexueller exo-erythrozytärer Zyklus (Leber-Schizogonie)**

In der Speicheldrüse einer infizierten weiblichen Stechmücke befinden sich Sporozoiten. Wenn sie einen Menschen sticht, gelangen die Sporozoiten über die Blutbahn zur Leber, befallen Leberzellen (Hepatozyten), und reifen darin zu Leberschizonten heran. In den Leberzellen kommt es zu einer explosionsartigen Vermehrung der Parasiten (Hosch 2020). Diese Phase dauert ungefähr zehn Tage und erfolgt «still», da beim Menschen keine Symptome auftreten (Wirth 2020).

## Rote Blutkörperchen:

### A asexueller intra-erythrozytischer Zyklus (erythrozytische Schizogonie)

Die Leberschizonten brechen auf und es werden Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt (Abb. 1.5). Sie befallen rote Blutkörperchen (Erythrozyten) und reifen in ihnen. Es kommt zum intra-erythrozytischen asexuellen Replikationszyklus (Hosch 2020): Aus Merozoiten entwickeln sich Ringstadien, dann unreife Trophozoiten. Diese werden zu reifen Trophozoiten, die sich schliesslich zu Blutschizonten entwickeln. Ein Blutschizont entlässt 16 bis 32 Merozoiten in die Blutbahn. Die Merozoiten infizieren weitere rote Blutkörperchen. Der Parasit braucht für die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) etwa zwei Tage. Die Parasitendichte steigt innerhalb weniger Tage um das Zehn- bis Zwanzigfache. Die charakteristischen Malaria-Symptome treten nun auf. Das Aufbrechen der Blutschizonten verursacht Fieberschübe, da neben den Merozoiten auch Abfallprodukte freigesetzt werden. Dadurch wird das Immunsystem aktiviert und es reagiert mit Entzündung. In einem Menschen können bis zu 20 Prozent aller Blutkörperchen befallen werden. Eine Person kann über Wochen bis Monate mit Malariaparasiten infiziert sein, die sich immer nur asexuell in Erythrozyten vermehren (Wirth 2020).

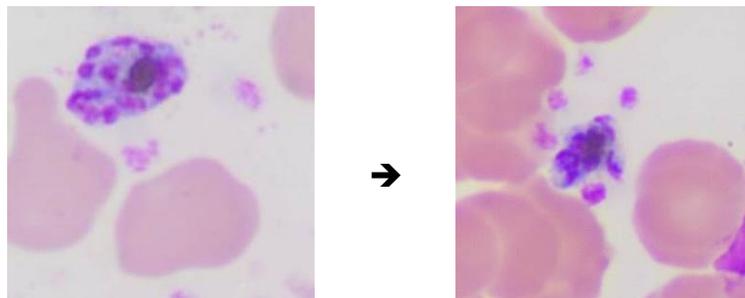


Abbildung 1.5: Merozoiten-Freisetzung aus einem reifen Schizonten (Ausschnitt, Quelle: imagebank.hematology 2020)

### B Sexuelle erythrozytische Phase

Nur etwa ein bis fünf Prozent der Merozoiten gehen in die sexuelle erythrozytische Phase über. In der asexuellen Phase werden genug Merozoiten gebildet, sodass sicher ein kleiner Teil in die sexuelle Phase übergehen kann. Die Merozoiten werden zu weiblichen und männlichen haploiden Gametozyten. Der sexuelle Zyklus dauert acht bis zwölf Tage und ist damit deutlich länger als der zweitägige asexuelle Zyklus. Die weiblichen und männlichen Gametozyten entwickeln sich in mehreren Stadien zu reifen Gametozyten. Bei *Plasmodium falciparum* findet die Gametozytogenese im Knochenmark statt. Erst reife Gametozyten zirkulieren wieder im Blut (Marti 2020).

## Malariaparasiten in der Mücke: A sexuelle Gametozyten-Replikation

Die längste Phase des Parasitenzyklus findet in der Anopheles-Mücke statt. Sie dauert bis zu zwei Wochen. Der sexuelle Zyklus wird in der Mücke fortgesetzt, sobald die/der Infizierte wieder von einer Anopheles-Mücke gestochen wird. Mit dem Blut einer infizierten Person nimmt sie weibliche und männliche Gametozyten auf (Hosch 2020). Diese gelangen zum Darm und durchlaufen mehrere asexuelle Zellteilungszyklen. Aus einem Gametozyten entsteht ein weiblicher Makrogamet oder es entstehen acht männliche Mikrogameten (Marti 2020).

## B Fertilisation und asexuelle Sporogonie

Im Darm der Mücke verschmelzen die Mikro- und Makrogameten zu einer Zygote, die dann zur Ookinete heranreift. In der Darmwand entwickelt sie sich schliesslich zur Oozyste. Die Oozyste bildet 3'000 bis 5'000 Sporozoiten. Diese asexuelle Sporogonie dauert 8 bis 14 Tage. Die Sporozoiten brechen anschliessend aus der Oozyste aus und wandern in die Speicheldrüse. Sticht die Mücke dann wieder einen Menschen, beginnt der Zyklus von neuem (Abb. 1.6) (Marti 2020).

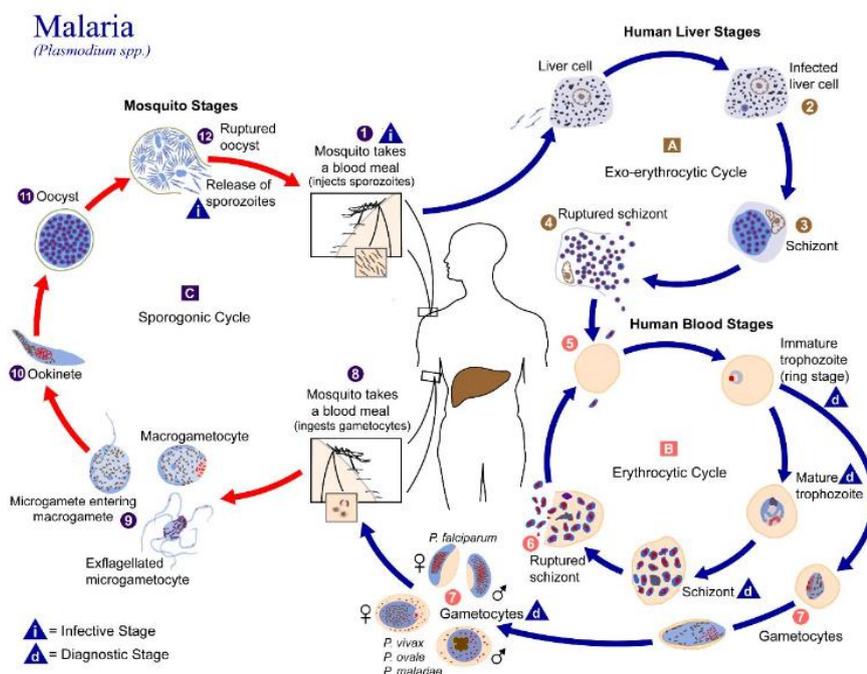


Abbildung 1.6: Plasmodien-Lebenszyklus (Quelle: Centers for Disease Control and Prevention 2019, Wikipedia 2020)

### 1.1.3 Pathogenese und natürlich erworbene Immunität

#### Pathogenese:

##### A Unkomplizierte Malaria

Es reichen zehn Parasiten pro Mikroliter Blut, dass bei einer nicht-immunen Person Symptome auftreten. In einem malaria-endemischen Gebiet kommen Plasmodien wie *Plasmodium falciparum* sehr häufig vor und die Übertragungsrates ist hoch. Bei Personen aus diesen Gebieten, die bereits ein- oder mehrmals Malaria hatten, können tausende Parasiten pro Mikroliter Blut vorkommen und dann Symptome verursachen, wobei geringere Konzentrationen keine Symptome mehr hervorrufen. Anzeichen einer unkomplizierten Malaria sind beispielsweise Fieber, Schüttelfrost, Körperschmerzen, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Husten und Durchfall. Wegen den relativ unspezifischen Krankheitszeichen ist eine rein symptombasierte Malaria-Diagnose schwierig (Grobusch und Kreamsner 2005, Hosch 2020, Wirth 2020).

##### B Schwere Malaria

Die Symptome einer schweren Malaria durch *Plasmodium falciparum* unterscheiden sich zwischen Erwachsenen und Kindern (Ashley, Pyae Phyo und Woodrow 2018). Kinder erkranken häufiger schwerer an Malaria, da ihr Immunsystem noch keine Schutzimmunität, die über Jahre durch Ansteckungen mit Malaria erworben wird, entwickelt hat. Es treten Symptome wie akute Atemnot, Nierenversagen, Hyperparasitämie und extreme Senkung des Blutzuckerspiegels auf. Sie werden durch die grosse Anzahl Parasiten im Blut und die Immunantwort der Infizierten verursacht. Bei vielen Patientinnen und Patienten mit schwerer Malaria ist die Milz vergrössert, da in ihr die infizierten roten Blutkörperchen herausgefiltert werden. Diese bleiben dann als Parasiten- und Zelltrümmer in der Milz zurück und müssen abgebaut werden. Die schnelle Zerstörung der roten Blutkörperchen führt bei einer akuten Infektion zur Anämie (Buffet et al. 2011). Eine Malariainfektion ist daher während der Schwangerschaft gefährlicher, weil schwangere Frauen oft schon Anämie haben und die Parasiten in der Plazenta sequestrieren können und dort die Blutzufuhr unterbrechen, was zu Fehlgeburten führen kann (Hosch 2020, Mayor et al. 2015).

Ein wichtiges Merkmal von Malaria tropica ist die Sequestrierung, die *Plasmodium falciparum* so gefährlich macht. Parasiten können die Kontrolle über die infizierten roten Blutkörperchen übernehmen und sie so umprogrammieren, dass deren Oberflächeneigenschaften verändert werden. Die neue Oberflächenstruktur verursacht, dass die roten Blutkörperchen an Gefässinnenwänden festhängen (Sysmex 2020). In der sexuellen erythrozytischen Phase reifen in den roten Blutkörperchen einige Merozoiten zu Gametozyten heran. Diese Blutkörperchen werden zunehmend steifer, während sich in ihnen die Merozoiten weiterentwickeln. Auch bei der Entwicklung zu

Blutschizonten werden die Blutkörperchen weniger beweglich. Die Steifheit hindert die infizierten roten Blutkörperchen daran, im Blut zu zirkulieren und von der Milz abgebaut zu werden. Auf diese Art können die Parasiten in Gefässen von Geweben wie Herz, Hirn und Lunge verweilen. Die haftende Oberflächenbeschaffenheit der Blutkörperchen kann dazu führen, dass Gefässe verstopfen. So können verstopfte Kapillargefässe im Gehirn zu schweren Beeinträchtigungen führen, bis hin zum Tod. Es sind überwiegend Kleinkinder und Kinder welche unter der zerebralen Malaria leiden (Wirth und Marti 2020).

### **Natürlich erworbene Immunität für Malaria**

In endemischen Gebieten leiden vor allem jüngere Kinder an der schweren Form von Malaria. Ältere Kinder erkranken häufiger an der unkomplizierten Form, während Erwachsene oft asymptomatische Parasitenträger sind (Marsh und Kinyanjui 2006, Baird 1998). Viele asymptomatische Personen tragen Parasiten über mehrere Wochen bis Monate in sich, ohne dass die Krankheit ausbricht. Sie werden zudem immer wieder neu infiziert. Das Immunsystem dieser Personen baut über die Jahre eine Schutzimmunität auf: Bei mehreren Begegnungen mit Malariaparasiten über die Jahre entwickelt das Immunsystem eine immer bessere Immunantwort. Diese erworbene Immunität schützt vor klinischen Symptomen und Tod, bietet aber keinen Schutz vor einer Infektion. Wiederholte Infektionen führen zu weniger schweren Erkrankungen. Das erklärt, warum Symptome häufiger in den jüngeren Lebensjahren auftreten (Hosch 2020, Wirth 2020). Eine Immunität bedeutet, dass infizierte Personen eine hohe Parasitendichte in sich tragen können, ohne dabei an Malaria zu erkranken. Zudem ist das Immunsystem fähig, das Parasitenwachstum einzudämmen (Miller 1958). Die natürlich erworbene Immunität gegen Malaria ist art- und stammspezifisch. (Wirth 2020, Gray et al. 2007). Jedoch wirkt die Immunantwort nach mehreren Infektionen gegen die meisten im Blut zirkulierenden Stämme einer Art (Hosch 2020).

Menschen mit einer solchen Immunität, welche für eine längere Zeit das endemische Gebiet verlassen haben, können jedoch nach ihrer Rückkehr erneut an symptomatischer Malaria erkranken (Wirth 2020, Gupta et al. 1999).

#### **1.1.4 Epidemiologie**

Gemäss einer Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) verursachte Malaria im Jahr 2018 228 Millionen Krankheitsfälle und 405'000 Todesfälle (World Malaria Report, WHO 2019). Zwischen den Jahren 2005 und 2018 ist die Malaria-Prävalenz sowie die Sterblichkeitsrate stark gesunken (Weiss et al. 2019). Insgesamt sind 96 Länder von Malaria betroffen. Von allen betroffenen Gebieten gibt es in den tropischen und subtropischen Regionen von Afrika mit 93% die meisten Malariafälle und mit 94% die meisten Todesfälle. In Afrika ist *Plasmodium falciparum* die

häufigste und tödlichste Malariaparasiten-Spezies. Weltweit betreffen 61% der Malaria-Todesfälle Kinder unter fünf Jahren (WHO 2019).

### **1.1.5 Malaria-Bekämpfung: Historischer Überblick und Ausblick**

Beim Malaria Eradication Programm der WHO wird angestrebt, Malaria weltweit auszurotten. Mitte des 19. Jahrhunderts kam es zur Entdeckung von Malariaparasiten und Mücken als Überträger, gleichzeitig begannen die ersten Malariabekämpfungs-Massnahmen. 1955 wurde an der Weltgesundheitsversammlung in Mexiko die erste Kampagne zur Malaria-Ausrottung verkündet, die zugleich die erste globale Kampagne zur Bekämpfung von Krankheiten war. Bis 1969 war Malaria in 35 Ländern eliminiert worden. 1992 erlangte die Malariabekämpfungs-Kampagne durch ein Ministertreffen in Amsterdam weltweite Aufmerksamkeit und es wurden globale Strategien zur Malariakontrolle festgelegt (Alonso 2020). Nach 2015 wurden nur noch wenige Fortschritte erreicht (WHO 2019). 2016 wurde daher das Bekämpfungsprogramm Global Technical Strategy for Malaria (GTS) gestartet, welches bis 2030 dauern soll. Damit soll unter anderem verhindert werden, dass die Malariabekämpfung vernachlässigt wird (Alonso 2020).

### **Erfolge und Herausforderungen**

Herr Prof. Marcel Tanner vom Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH) fasst die Erfolge bei der Malariabekämpfung folgendermassen zusammen: «Dank der letzten 15 Jahre durch den integrierten Einsatz der verschiedenen Bekämpfungsmassnahmen, insbesondere die frühe Diagnose und Behandlung, der Gebrauch von mit Insektiziden behandelten Mückennetzen und anderer entsprechender Techniken, konnte die Übertragung massiv gesenkt werden und auch Eliminierung erreicht werden.» Herr Tanner fügt hinzu, dass zudem erste Fortschritte bei der Impfstoffentwicklung (RTS,S) und bei neuen Medikamenten erzielt worden seien. Seit 2015 werde versucht, die von allen Ländern akzeptierte GTS umzusetzen.

Ebenfalls zählt er die verschiedenen Herausforderungen auf: «[1.] Dass die GTS in den verschiedenen Ländern auch umgesetzt wird, d.h. auf die lokale Situation angepasst wird, damit die Erfolge gehalten werden können und sogar noch bedeutender werden. [2.] Die Resistenzentwicklung von Parasiten gegenüber den herkömmlichen Medikamenten sowie die Resistenzbildung der Mücken gegenüber den heute eingesetzten Insektiziden. [3.] Fehlende hochwirksame Impfstoffe. [4.] Krisen à la Covid-19, die es nicht einfach machen, Bekämpfungsprogramme wie geplant umzusetzen ... aber auch sozial-politische Konflikte/Kriege, die Gesundheitsprogramme gefährden. [5.] Die Verfügbarkeit von Personal auf allen Ebenen.

## 1.2 Malaria Diagnose

Eine Malaria Diagnose wird in endemischen Gebieten häufig anhand von Mikroskopie oder Malariaschnelltests (Malaria Rapid Diagnostic Test, RDT) durchgeführt. Für die Mikroskopie wird der Blutropfen einer/eines Untersuchten benötigt. Der Blutfleck wird angefärbt, damit er unter dem Mikroskop auf dem Objektträger angeschaut werden kann. Die Diagnose erfolgt im Labor und benötigt geschulte Personen. Dicke Abstriche von Blut sind sensitiver, da ein grösseres Volumen angeschaut werden kann. Dünne Abstriche erlauben hingegen differenzierte Diagnosen der verschiedenen *Plasmodium*-Spezies. Die relativ günstige Mikroskopie ist nur dann sensitiver als RDT, wenn Mikroskopisten gut ausgebildet sind. Eine Diagnose per Schnelltest ist ohne Ausbildung möglich und benötigt keine Laborinfrastruktur. Der Test erkennt bestimmte Proteine, die während einer Malariainfektion von den Parasiten ins Blut freigesetzt wurden. Der Nachteil ist jedoch, dass diese Diagnose nicht so sensitiv und spezifisch ist wie die Mikroskopie. Bei der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wird die Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid, DNA) von Malariaparasiten nachgewiesen. Für eine hochsensitive Diagnose ist eine molekulare Analyse mittels PCR am geeignetsten, da diese Methode für *Plasmodium* sehr gut funktioniert und sie in feldbasierten Labors angewendet werden kann. Sie ist aber anspruchsvoller und erfordert gute Kenntnisse. PCR benötigt auch eine Kühlkette - also immer Strom. PCR Maschinen sind teuer und die Reagentien kosten auch mehr als die Mikroskopie (Hosch 2020, Wirth 2020).

Herr Dr. Tobias Schindler vom Swiss TPH sagt zu den molekularbiologischen-genetischen Methoden bei der Diagnose von Malaria: «[Sie] haben den grossen Vorteil, dass auch Infektionen mit tiefer Parasitenlast detektiert werden können. In Regionen, in der Malaria endemisch ist, hat ein beachtlicher Anteil der Infizierten eine sehr tiefe Parasitenlast (Anzahl Parasiten pro Milliliter Blut) und oftmals keine oder nur sehr geringe Symptome. Da diese [...] den Parasiten oft über längere Zeit in sich tragen, werden sie zur allgemeinen Übertragung von Malaria in der Bevölkerung beitragen. Dies erschwert die Bekämpfung der Malaria Epidemie. Bei Menschen, welche an Malaria erkrankt sind, ist die Parasitenlast oftmals hoch genug, dass eine Diagnose mittels RDT oder Mikroskop ausreicht. Da ist der grosse Vorteil, dass diese Methoden günstiger, einfacher und schneller als PCR sind.»

Herr Schindler habe bei Malariaverdacht (z.B. Fieber) immer einen RDT oder Mikroskopie gemacht und nie eine PCR, obwohl er kostenlos Zugang gehabt hätte. Er fasst zusammen, dass die PCR bei der Bekämpfung und Erforschung von Malaria einen sehr hohen Stellenwert habe, bei der Diagnose eines Patienten in einem Spital einen eher geringen.

### 1.2.1 Malaria-Schnelltest (RDT)

Der RDT ist ein Flusstest, welcher auf Immunchromatographie beruht (Obeagu et al. 2018), also einer Kombination aus Dünnschichtchromatographie und Immunfärbung. Ein RDT zeigt an, ob Antigene von Malariaparasiten im Blut vorhanden sind. Dafür genügen wenige Blutropfen einer Person. *Histidine-rich protein II* (PfHRP2), *plasmodium aldolase* und *parasite lactate dehydrogenase* (pLDH) sind die häufigsten Antigene, die für Plasmodien bei RDTs detektiert werden. Wenn ein farbstoffmarkierter Antikörper mit einer dieser Antigene bindet, erscheinen Banden auf dem Tauchstab des Schnelltests (Abb. 1.7). Damit der Test gültig ist, muss eine Kontrollbande vorhanden sein (Bio-rad 2020).



Abbildung 1.7: Zwei Malariaschnelltests von Teilnehmenden der MIS 2018 auf Bioko Island (Quelle: Foto von Koranan Blöchliger)

### 1.3 Malaria-Prophylaxe und -Behandlung

In den letzten zehn Jahren zeigten sich bei der Malariaprävention Erfolge, vor allem dank mit Insektiziden behandelten Netzen (Insecticide-Treated Net, ITN) und dem Besprühen von Innenräumen mit Insektiziden (Indoor Residual Spraying, IRS). Die Verringerung der Malariabelastung ist hauptsächlich auf die erfolgreiche Vektorbekämpfung zurückzuführen. ITNs haben Millionen von Menschen nachts vor infizierten Anopheles-Mücken geschützt, jedoch haben 50% der Bevölkerung in Subsahara-Afrika keinen Zugang zu ITNs. IRS bietet zusätzlichen Schutz, da Anopheles-Mücken kaum in Räume mit Insektiziden fliegen (Hosch 2020a). Es besteht jedoch das Problem, dass viele dieser Mücken gegen Insektizide resistent wurden. Mit Hilfe von Umweltmassnahmen können Brutstätten von Mücken trockengelegt werden, aber dies ist nur möglich, wenn die Regierungen und die Bevölkerung in den betroffenen Ländern zusammenarbeiten (Alonso 2020).

Es gibt gegen Malaria noch keine hochwirksamen Impfstoffe, jedoch wird intensiv an ihnen gearbeitet. Medikamente werden sehr häufig eingesetzt. Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Malariabehandlung, als auch bei der Prophylaxe. Jedoch besteht auch hier das gleiche Problem wie bei den Insektizidresistenzen, nämlich dass die Plasmodien gegen Arzneimittel resistent werden (Wirth 2020).

Hauptsächlich Schwangere und Kleinkinder in Afrika sind auf medikamentöse Behandlungen angewiesen. Die Entwicklung von neuen Medikamenten ist wegen der zunehmenden Resistenzbildung notwendig. Es wird oft von alten, ehemals gut wirksamen Medikamenten ausgegangen, um die neuen Medikamente zu entwickeln (Wells et al. 2015).

Die genetische Diversität von *msp1* und *msp2* hilft auch bei der Entwicklung von potentiellen Impfstoffen (Mawili et al. 2015). Frau Prof. Daubenberger vom Swiss TPH betont, dass aktiv an Impfstoffen und neuen Medikamenten geforscht werde. Der RTS,S Malaria-Impfstoff gegen *Plasmodium falciparum*[-Sporozoit] werde nun in drei Ländern in Afrika breit getestet.

## 1.4 Molekulare Epidemiologie

Die molekulare Epidemiologie verwendet genetische Methoden, um Aufschlüsse über die verschiedenen Plasmodien-Arten und deren genetische Diversität sowie die Arzneimittelresistenz zu erlangen (Conway 2007). Durch DNA-Amplifikation mittels PCR können auch *Plasmodium*-Infektionen mit niedriger Parasitendichte untersucht werden (Hosch 2020).

RDTs sind praktisch für die molekulare Epidemiologie: DNA kann gut aus RDTs extrahiert werden und trotz geringer Blutmenge mit der Methode der verschachtelten PCR (nested PCR, nPCR) amplifiziert werden. Ebenso ist es anhand von RDTs möglich, unter anderem die Malariaprävalenz abzuschätzen (Hosch 2020, Robinson et al. 2019, Veron und Carme 2006). Durch Agarose-Gelelektrophorese können verschiedene Parasitenstämme visualisiert und unterschieden werden. Die Genotypisierung beruht auf diesen beiden Verfahren. Die Auswertung der molekularen Marker für die merozoites surface proteins *msp1* und *msp2* ist ein «genetic tool», um Parasitenstämme zu detektieren.

Gemäss Herrn Dr. Schindler verhält es sich bei der Genotypisierung ähnlich wie bei der Diagnose via PCR. Sie sei ein wichtiges «tool», um den Parasiten zu verstehen und im Endeffekt zu bekämpfen. Frau Prof. Claudia Daubenberger erklärt, dass, durch weitere solche «tools» wie z.B. Crispr, die genetischen Modifikationen von Mücken als Vektoren von Malaria aktiv verfolgt werde [...] Allerdings seien die Nebenwirkungen dieser Technologien noch unklar (siehe dazu auch Scudellari 2019).

### 1.4.1 Genetische Diversität und Malaria Transmission

Die genetische Diversität beschreibt das Vorkommen von verschiedenen Varianten eines Gens, die durch Mutationen entstanden sind. Diese Genvarianten werden als Allele bezeichnet. Ein Genotyp fasst alle Allele eines Gens zusammen. Die genetische Diversität des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* hat Einflüsse auf die Entstehung der Immunität beim Menschen und die Resistenzentwicklung beim Parasiten sowie bei

den Vektoren (Somé et al. 2018). Obwohl in den letzten Jahrzehnten viel Wissen zusammengetragen wurde, besteht nach wie vor ein grosser Forschungsbedarf. Malariaparasiten haben um die 5'000 Gene, wohingegen z.B. Viren mindestens fünfzigmal weniger Gene aufweisen. Die Genvielfalt ermöglicht es den Parasiten, sich erfolgreich an äussere Einflüsse anzupassen und weiterzuentwickeln (Wirth 2020).

Ein wichtiger Wert in der Malariaforschung ist die Multiplicity Of Infection (MOI). Diese beschreibt die durchschnittliche Anzahl Genotypen pro Person in einer Bevölkerungsgruppe (Hosch 2020). Die Anzahl vorhandener Genotypen pro Anzahl Personen definiert den MOI-Wert. Je höher dieser Wert ist, desto stärker ist ein endemisches Gebiet von Malaria betroffen (Hamid et al. 2016). Wenn eine Person mit mehr als einem Genotyp gleichzeitig infiziert ist, handelt es sich um eine multiklonale Infektion. Hingegen wird von einer monoklonalen Infektion gesprochen, wenn nur ein Genotyp vorhanden ist (Volkman 2020). Das Mass der Malariaübertragung kann durch die genetische Diversität abgeschätzt werden. Eine hohe Übertragungsrate durch Vektoren bedeutet gleichzeitig, dass bei einer Person mehrere Infektionen mit verschiedenen Alleltypen vorhanden sind. Der Anteil monoklonaler Infektionen nimmt zu, wenn die Malariaübertragung sinkt: Mücken nehmen weniger verschiedene Alleltypen auf. Folglich ist die Rekombination bei der Gametenbildung in der Mücke weniger effektiv. Die Parasiten werden dadurch genetisch immer ähnlicher. Es gibt weniger Parasitenstämme, was ein Schritt in Richtung Ausrottung ist (Volkman 2020). Genetische Marker ermöglichen Aufschlüsse über den Erfolg von Kontrollmassnahmen. Aus diesem Grund sind regelmässige molekulare Untersuchungen hilfreich und notwendig (Somé et al. 2018). *Plasmodium falciparum* weist eine grosse genetische Variabilität auf. Gene für wichtige Proteine wie die Oberflächenproteine *msp1* und *msp2* sind polymorph (Cook et al. 2018, Snounou et al. 1999). Sie sind die Hauptoberflächenproteine von Merozoiten (Abb. 1.8) (Holder und Blackman 1994).

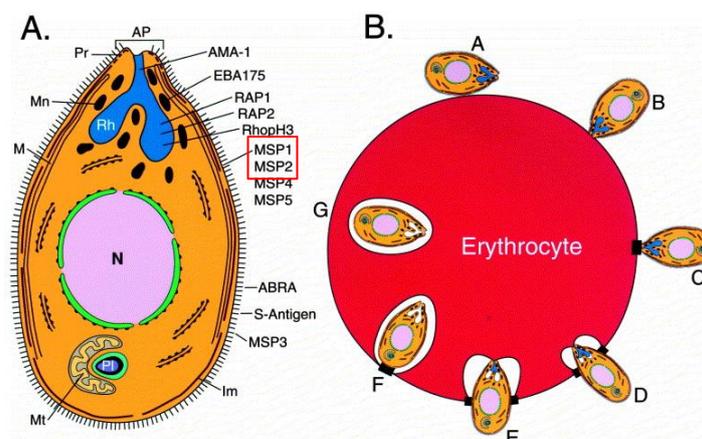


Abbildung 1.8: Merozoiten-Oberflächenproteine *msp1* und *msp2* von *Plasmodium falciparum* (Quelle: Cowman et al. 2000)

In dieser Arbeit werden im Genotypisierungsverfahren die *msp1*- und *msp2*-Allele identifiziert. Die Resultate ergänzen die vorgängigen Untersuchungen und Ergebnisse, welche in der Masterarbeit (2020) von Salome Hosch beschrieben wurden.

*Msp1* und *msp2* sind unter anderem für eine mögliche Impfstoffentwicklung wichtig, da das Immunsystem von Infizierten auf sie reagiert (Kwenti et al. 2017). Das Gen für *msp1* befindet sich auf dem Chromosom 9 und für *msp2* auf Chromosom 2 (Apinjoh et al. 2015, Ferreira und Hartl 2007). Für *msp1* gibt es drei verschiedene Alleltypen: K1, MAD20, RO33 (Beshir et al. 2018) und für *msp2* zwei verschiedene Alleltypen: 3D7/IC und FC27 (Ferreira und Hartl 2007). Die verschiedenen Alleltypen definieren die Parasitenstämme.

## 1.5 Bioko Island

Die tropische Insel Bioko gehört zu Äquatorialguinea und liegt im Golf von Guinea an der Westküste Zentralafrikas (Abb. 1.9). Sie ist mit rund 2'000 Quadratkilometer die größte Insel von Äquatorialguinea. Bioko Island ist die nächstgelegene Insel zum Festland: nördlich von ihr liegt Nigeria in 70 km Entfernung und westlich Kamerun in 32 km Entfernung (Cook et al. 2018, Guerra et al. 2006). Auf ihr leben etwa 250'000 Einwohnerinnen und Einwohner. Der grösste Teil der Bevölkerung (90%) lebt in der Hauptstadt Malabo im Norden der Insel. Es gibt starke Regenfälle von Mai bis Oktober und die Trockenzeit dauert von November bis April (Hosch 2020, Guerra et al. 2006). Die Insel ist grösstenteils von einem tropischen Regenwald bedeckt (Hosch 2020). Es gibt Berge, von denen drei zwischen rund 2'000 und 3'000 Meter hoch sind. Bioko Island weist eine einzigartige Tierwelt auf. Sie bietet Schutz für viele bedrohte Tierarten (Morell 2020).

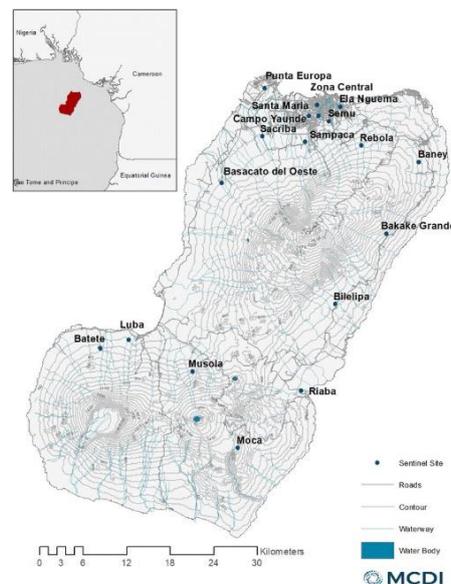


Abbildung 1.9: Lage sowie Karte von Bioko Island (Quelle: MCDI, Cook et al. 2018)

## 1.5.1 Malaria auf Bioko Island

### A Vorkommen

Auf Bioko Island kommen vier *Plasmodium*-Spezies vor, wobei *Plasmodium falciparum* am häufigsten ist. *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* wurden in mehreren Studien nachgewiesen, ebenso wie wenige Fälle von *Plasmodium vivax* (Hosch 2020, Guerra et al. 2006). Hauptüberträger auf der Insel Bioko sind *Anopheles coluzzi* und *Anopheles melas*, die beide zur Gruppe der *Anopheles gambiae*-Mücken gehören (Meyers et al. 2016). Die Malariaprävalenz war früher in ganz Äquatorialguinea sehr hoch (Bhatt et al. 2015 S 17). In den letzten 16 Jahren konnte durch das Bioko Island Malaria Control Project (BIMCP) ein Rückgang der Malariabelastung festgestellt werden, jedoch ist die Krankheit immer noch endemisch (Cook et al. 2018, Rehman et al. 2013). Die Malaria-Prävalenz unterscheidet sich zwischen Dörfern und Regionen (Kleinschmidt et al. 2006). Auf dem Festland ist die Prävalenz höher (Abb. 1.10) (Rehman et al. 2013).

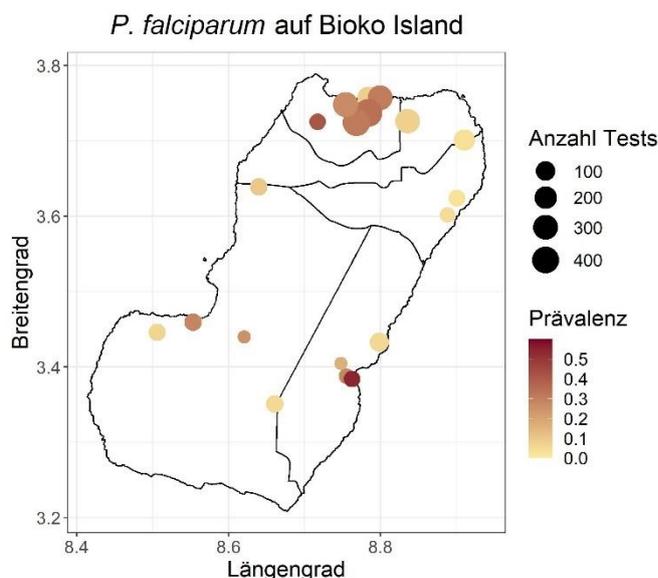


Abbildung 1.10: Malaria-Prävalenz *Plasmodium falciparum* auf Bioko Island (Quelle: Salome Hosch 2020)

### B Malariabekämpfung

Das BIMCP wurde 2004 in die Wege geleitet, mit dem Ziel, die Malariabelastung auf der Insel stark zu senken. Das Projekt wird vom Staat und durch die Privatwirtschaft finanziell unterstützt (Hosch 2020). Die Malariabekämpfung beinhaltet Massnahmen wie IRS, Zugang zu diagnostischen Tests und verbesserte medikamentöse Therapien. Die Vektorkontrolle durch IRS führte zu einer erheblichen Reduktion der Übertragung (Sharp et al. 2007). In den Jahren 2007 und 2014 gab es zwei grosse Verteilungs-

aktionen von langlebigen ITNs. Seit 2004 findet jährlich ein Malaria Indicator Survey (MIS) statt - Fragebogen und RDT ergeben ein aktuelles Bild der Malariasituation (Hosch 2020). Die Malaria-Prävalenz auf Bioko Island betrug im Jahr 2004 bei Kindern zwischen zwei und vierzehn Jahren rund 43%. Im Jahr 2016 betrug sie nur noch rund 11% (Cook et al. 2018). Einige Gebiete sind stärker von Malaria betroffen als andere (Cook et al. 2018): 2019 stieg die Prävalenz in gewissen Regionen auf Bioko Island wieder an (Guerra et al. 2020). In den fünf Jahren nach der Initiierung des BIMCP, war die Malaria-Sterblichkeitsrate (von 152/1'000 auf 55/1'000) bei Kindern unter fünf Jahren gesunken (Kleinschmidt et al. 2009). 1998 war die Prävalenz viel höher (Guerra et al. 2006) als 2018. Dieser Erfolg ist dem BIMCP zu verdanken (Rehman et al. 2013, Cook et al. 2018). Gründe, warum die Prävalenz im Jahr 2019 wieder gestiegen ist, sind unter anderem auf den überdurchschnittlich starken Regenfall und die vielen Baustellen auf Bioko Island zurückzuführen, welche neue Brutstätten für Anopheles-Mücken bildeten. Die Reisetätigkeit vom Festland ist ebenso ein wichtiger Grund für die immer noch bestehende Malariaübertragung auf der Insel (Guerra et al. 2019).

## 1.6 Ziel und Hypothese

### 1.6.1 Ziel

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von *Plasmodium falciparum*-Stämmen mittels Genotypisierung von den Merozoiten-Oberflächenproteinen *m*sp1 und *m*sp2 aus 50 RDTs mit Blut von asymptomatischen Probanden auf Bioko Island.

Es soll festgestellt werden, ob es sich um monoklonale Infektionen mit einem Genotyp oder multiklonale Infektionen mit mehreren Genotypen handelt, um die Diversität von *Plasmodium falciparum*-Genotypen und damit die MOI zu beschreiben.

### 1.6.2 Spezifisches Ziel

Mittels nPCR und Agarose-Gelelektrophorese soll ermittelt werden, welche Alleltypen für *m*sp1 und *m*sp2 vorhanden sind und wie viele.

### 1.6.3. Hypothese

Es gibt Unterschiede bei der *m*sp1 und *m*sp2-Allelverteilung innerhalb verschiedener Altersgruppen und Herkunftsregionen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Extraktion von Nukleinsäure von vorhandenen RDTs

13'348 RDTs wurden während des MIS 2018 von August bis Oktober auf Bioko Island gesammelt. Diese Proben dürfen mit der Einwilligung der Teilnehmerinnen und Teilnehmer molekular untersucht werden. Alle RDTs erhielten einen Barcode und wurden in Kisten mit Trockenmittel bei Raumtemperatur gelagert. Es wurden 2'690 RDTs für eine molekulare Analyse angeschaut. Für die molekulare Analyse wurde die DNA in den Proben nach dem ENAR-Verfahren (Extraction of Nucleic Acids from used RDTs) extrahiert (Guirou et al. 2020). Dieses Verfahren wird detaillierter in der Masterarbeit von Salome Hosch (2020) beschrieben. Mittels qPCR (Real Time Quantitative PCR) wurden in 682 Proben *Plasmodium*-Spezies identifiziert. Von diesen waren 608 positiv für *Plasmodium falciparum*. Von den 608 Proben wurden 50 für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Laborarbeit dauerte zehn Tage. In dieser Zeit ist es machbar, 50 RDTs zu untersuchen. Zudem ist die Probenanzahl gross genug, um Schlussfolgerungen ziehen zu können. Es wurden Proben ausgewählt, die für diese molekulare Analyse geeignet sind. So wurden hauptsächlich Proben mit höheren Parasitendichten ausgewählt, damit genug verwendbares DNA-Material vorhanden ist.

### 2.2 Verschachtelte PCR (nPCR)

Wenn DNA in geringer Menge vorhanden ist, wird diese mit Hilfe von PCR vervielfältigt, damit anschliessend genügend DNA-Material vorliegt, mit dem weitergearbeitet werden kann. Bei vorliegender Arbeit wurde die Methode der nPCR verwendet, dabei werden zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt. Nach einer genspezifischen PCR folgt eine allelspezifische PCR. Allgemein braucht es für eine PCR immer Forward und Reverse Primer (FP, RP). Bei der ersten PCR werden Primer benutzt, die weiter aussen an die DNA binden und bei der zweiten PCR solche, die im inneren Bereich der DNA binden (Abb. 2.1):

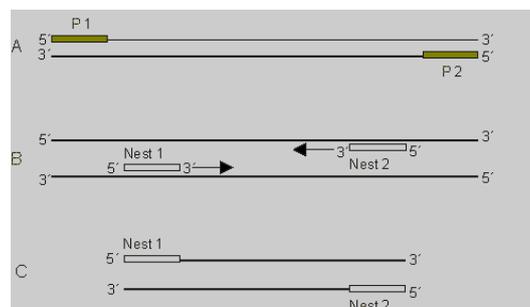


Abbildung 2.1: Verfahren der nPCR (Quelle: Labor Gärtner 2020)

A) In der ersten Reaktion bindet ein Outer Forward Primer (OFP) am 5'-Ende eines Strangs der doppelsträngigen DNA und ein Outer Reverse Primer (ORP) am 3'-Ende des entgegengesetzten Strangs. Die DNA-Polymerase amplifiziert von diesen Primer aus die Sequenz zwischen ihnen. B) Bei der allelspezifischen PCR werden Forward Primer (FP) und Reverse Primer (RP) verwendet, welche weiter innen an die jeweiligen Stränge der amplifizierten DNA andocken. C) Es werden kürzere DNA-Fragmente in hoher Anzahl amplifiziert (Labor Gärtner 2020). Die amplifizierte DNA aus der ersten Reaktion kann einem bestimmten Gen zugeordnet werden, während DNA-Fragmente aus der zweiten Reaktion einem bestimmten Allel zugeordnet werden können.

## 2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Stränge mittels Gelelektrophorese nach ihren Basenpaarlängen getrennt. Auf dem Gel können die verschiedenen langen DNA-Fragmente wandern. Das Gel wird elektrisch aufgeladen, damit Spannung auf dem Feld entsteht. Eine Seite (Kathode) ist negativ und die andere (Anode) ist positiv geladen. Der Phosphatteil der DNA bewirkt, dass die DNA von aussen negativ geladen ist und sie daher in Richtung der positiven Ladung (zur Anode) wandert. Je nachdem, wie gross die DNA-Fragmente sind, können diese mehr oder weniger weit auf dem Gel wandern (Biologie Schule 2020). Wenn genug DNA einer bestimmten Länge vorhanden ist - also das Fragment genug stark amplifiziert wurde - dann ist sie als Bande auf dem Gel zu sehen. Die verschiedenen Fragmente können so optisch ausgewertet und ihren entsprechenden Alleltypen zugeordnet werden.

## 2.4 Praktischer Teil

Die Laborarbeit wurde während den zehn Freistellungstagen vom 4. und 5.6., 8. bis 10.6. und 22. bis 26.6.2020 im Labor der Clinical Immunology Unit am Swiss TPH Basel unter der Beaufsichtigung meiner Betreuungsperson Salome Hosch durchgeführt.

### 2.4.1 Genotypisierung mittels nPCR und Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Methode der nPCR für die Amplifizierung der DNA und das Verfahren der Gelelektrophorese für die Genotypisierung der DNA verwendet. Eine nPCR ist notwendig, damit für die Gelelektrophorese genügend DNA-Material vorhanden ist. Es wurden 50 RDTs aus dem MIS 2018, die für *Plasmodium falciparum* positiv getestet worden waren, zur Verfügung gestellt. Von diesen Proben konnten 47 untersucht werden.

## **Arbeitsschritte:**

04.06.20: 1. und 2.PCR  
05.06.20: 3.PCR und 1.Gelelektrophorese  
08.06.20: 4.PCR; 2. und 3.Gelelektrophorese  
09.06.20: 5.PCR  
10.06.20: 6.PCR; 4. und 5.Gelelektrophorese  
22.06.20: 7.PCR und 6.Gelelektrophorese  
23.06.20: 8. und 9.PCR; 7.Gelelektrophorese  
24.06.20: 10.PCR und 8.Gelelektrophorese  
25.06.20: 11.,12., 13.PCR und 9.Gelelektrophorese  
26.06.20: 10. und 11.Gelelektrophorese

Für 50 RDTs wurden insgesamt 13 PCRs und 11 Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt (inklusive Wiederholungen). Es wurden drei PCR und eine Gelelektrophorese für bestimmte Proben wiederholt, da beim ersten Versuch keine oder nicht deutliche Resultate zu sehen waren. Es wurden bestimmte Faktoren (wie die Temperatur und Primerkonzentration) bei der PCR angepasst, damit gute Ergebnisse erzielt werden konnten (siehe Diskussion).

Im praktischen Teil werden nur die 1. und 2.PCR und die 1.Gelelektrophorese detailliert beschrieben, da der Vorgang für die weiteren PCRs und Gelelektrophoresen im Prinzip gleich bleibt.

### **2.4.2 Amplifikation der DNA mittels nPCR**

#### **1.PCR (genspezifisch)**

Eine nPCR (eine genspezifische PCR, gefolgt von einer allelspezifischen PCR) wird zur Amplifikation des DNA-Materials von RDTs durchgeführt. Die 1.PCR ermöglicht eine Gendifferenzierung, indem die gesamte DNA mittels Outer Forward Primer (OFP) und Outer Reverse Primer (ORP) amplifiziert wird. Die amplifizierte DNA kann jeweils einem bestimmten Gen für *msp1* oder *msp2* zugeordnet werden. Bei der ersten Reaktion werden die ersten 10 DNA-Proben genspezifisch amplifiziert. (Speziell zu erwähnen ist, dass die OFP und ORP zu Outer Primer (OP) zusammengefasst werden, da so bestimmte Abläufe besser beschrieben werden können.)

Die Stammlösung aller Primer haben eine Konzentration von 100µM. Die OP (Firma: Microsynth) für *Plasmodium falciparum* werden mit Wasser verdünnt: 10 µl OP und 90 µl Wasser ergeben 100 µl Wasser-Primer-Lösung. Dies entspricht der 10 µM OP-Konzentration, welche hier verwendet wird.

- **Erhitzen der Primer:**

1 Tube (1,5 ml) mit ***msp1* Outer Forward Primer** (OFP)

1 Tube mit ***msp1* Outer Reverse Primer** (ORP)

1 Tube mit ***msp2* OFP**

1 Tube mit ***msp2* ORP**

Heizblock

Alle 4 Tubes (Eppendorf) werden für 10 min in einem Heizblock (Firma: Eppendorf) auf 70°C erhitzt. Dies ist notwendig, da es zwischen den OP zu Wasserstoffbrückenbindungen kommen kann, z.B. können mehrere *msp1* OFP zusammenhängen. Durch Hitze werden diese Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OP getrennt (Abb. 2.2).

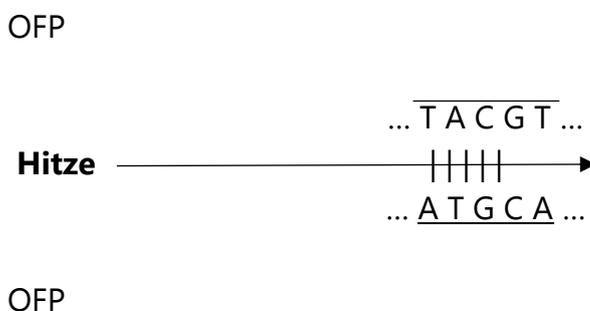


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zur Wasserstoffbrücken-Trennung zwischen den Primer

Die OP liegen nun homogen im Wasser vor (Abb. 2.3).

- **Vortexen:**

4 Tubes mit den verschiedenen Outer Primer (OP)

fünffach konzentrierter (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Vortexmixer

Die Tubes mit den jeweiligen OP werden mittels eines Vortexmixers geschüttelt, damit sich die Primer gut im Wasser verteilen. Würde man dies nicht tun, könnte es sein, dass beim Pipettieren keine OP erwischt werden. Ohne die OP funktioniert die nPCR nicht. Der (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix wird ebenfalls zur Homogenisierung seiner Komponenten gevortext. Er enthält DNA-Polymerase, Nukleotide A, T, G, C, Magnesiumchlorid (10 mM MgCl<sub>2</sub>) und bovine serum enhancer (was die PCR verbessert). Der Mix wird bei -20°C aufbewahrt, damit seine Komponenten für mehrere Anwendungen erhalten bleiben. Beim Gefriervorgang ist es möglich, dass die Komponenten nicht homogen gefroren wurden. Das Vortexen sorgt dafür, dass sie sich gleichmässig im Mix verteilen.

- **Mastermix:**

4 Tubes mit den OP (Konzentration je 10 µM), 2 leere Tubes (1,5 ml)  
10 µl-Pipette, 100 µl-Pipette, 1000 µl-Pipette  
3 Tube Strips (jedes hat 8 voneinander getrennte Röhrchen)

Für *msp1* und *msp2* gibt es jeweils 12 Proben, d.h. 10 DNA-Proben mit je 1 Negativ- und 1 Positivkontrolle. Es bräuchte zwar 12 Reaktionen, aber es werden 13 Reaktionen vorbereitet, damit genug Volumen vorhanden ist, weil beim Pipettieren Ungenauigkeiten möglich sind. Wasser, (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix (Firma: Solis BioDyne) und OP werden im Verhältnis vermischt, sodass die Primerkonzentration **0,125 µM** entspricht. Die Mastermixe werden an einem sterilen Arbeitsplatz hergestellt (Abb. 2.4).

Mastermix 1

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* OFP**  
3,25 µl von ***msp1* ORP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp2* OFP**  
3,25 µl von ***msp2* ORP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Die Mastermixe befinden sich separat voneinander in ihren eigenen Tubes (Firma: Eppendorf, jeweils 1,5 ml). Eines von 3 Tube Strips wird halbiert: Eineinhalb 8er-Tube Strips für *msp1* OP und eineinhalb 8er Tube Strips für *msp2* OP ergeben je ein 12er Tube Strip (12 Röhrchen). Mit einer 100 µl-Pipette (Firma: Eppendorf) werden je 18 µl von Mastermix 1 mit *msp1* OP in die 12 Röhrchen pipettiert. Der Vorgang mit Mastermix 2 mit *msp2* OP ist genau gleich (Abb. 2.5). Die Farbmarkierungen für *msp1* und *msp2* bleiben immer gleich: weiss für *msp1* und blau für *msp2*. Die 12 Röhrchen sind nummeriert, das ist vor allem für das Pipettieren der DNA-Proben wichtig, damit man weiss, wo was hinein pipettiert wurde.

- **Entnehmen der DNA-Proben:**

Zentrifuge

Mikrotiterplatten Nr. 3, 4, 6, 9, 10, 11 (darin sind DNA-Proben enthalten)

Liste (mit den zu untersuchenden 50 positiven Malariaschnelltests)

10 µl-Pipette

zwei 12er Tube Strips mit je *mSP1* und *mSP2* OP

Salome Hosch hat auf einer A4-Seite 50 Malariaschnelltests aufgelistet, bei denen es sie interessiert, ob es sich um Infektionen von einem Parasitenstamm oder von mehreren handelt. Es wird anhand dieser Liste (erste 10 Proben; ganze Liste siehe Anhang) gearbeitet.

Die sechs Mikrotiterplatten, auf welchen sich die ersten 10 DNA-Proben befinden, werden in einer Zentrifuge geschleudert, damit sich die DNA am Boden sammelt und nichts an der Alufolie hängen bleibt. (Die Platten sind mit einer Aluminiumfolie verschlossen.) Das garantiert, dass man beim Herauspipettieren auch wirklich DNA erwischt. Die DNA-Proben werden nacheinander von den sechs Platten entnommen (Abb. 2.6). Auf der Liste wird abgelesen, auf welcher Position der Platten sich die DNA-Proben befinden. Anschliessend wird mit einer 10 µl-Pipette je 2 µl DNA heraus pipettiert. Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben mit dem Mastermix 1 (Kombination von Polymerase, Nukleotiden und OP für *mSP1*) in den Röhren vermischt. Das gleiche Vorgehen gilt auch beim 12er Tube Strip mit Mastermix 2.

Bei beiden Tube Strips wird in Röhren Nr. 11 NF54 (Abb. 2.7), die DNA eines bestimmten Parasitenstamms von *Plasmodium falciparum*, pipettiert: Nr. 11 bildet die Positivkontrolle, die bei der späteren Agarose-Gelelektrophorese angibt, ob die PCR funktioniert hat, indem Banden zu sehen sind. Es wird nichts in Röhren Nr. 12 pipettiert. Man könnte jedoch 2 µl Wasser dazu pipettieren, damit das Volumen im Röhren gleich gross ist wie bei den anderen. Röhren Nr. 12 bildet die non template control (NTC = Non Template Control, Negativkontrolle) und gibt bei der Gelelektrophorese an, ob sauber gearbeitet wurde und/oder eine Kontamination vorliegt. Bei einer Kontamination würde für Nr. 12 eine Bande vorliegen.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

zwei 12er Tube Strips mit DNA und Mastermix

Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler (Firma: BioRad) für die 1. PCR platziert (Abb. 2.8).

PCR program 1st PCR:

95 °C 12 min

**95 °C 1 min**

**58 °C 2 min**

**72 °C 2 min**

72 °C 2 min



**Das wird 25x wiederholt.**

**Am Schluss gibt es 25 Verdoppelungen  
der DNA.**

Dauer: Insgesamt 2h 40 min (2h 20 min für die PCR und 20 min für das Abkühlen und Erhitzen in den Übergängen).

Produkte 1.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_1***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_1***

Die Länge der amplifizierten DNA ist genspezifisch für *msp1* und *msp2*.

## Benötigte Materialien:



Abbildung 2.3: OP für *msp1* und *msp2*



Abbildung 2.4: Steriler Arbeitsplatz, in welchem die Mastermixe hergestellt werden



Abbildung 2.5: *msp1* und *msp2* 12er Tube Strips gefüllt mit den Mastermixen



Abbildung 2.6: Zwei von sechs Mikrotiterplatten, von denen die 10 DNA-Proben entnommen werden

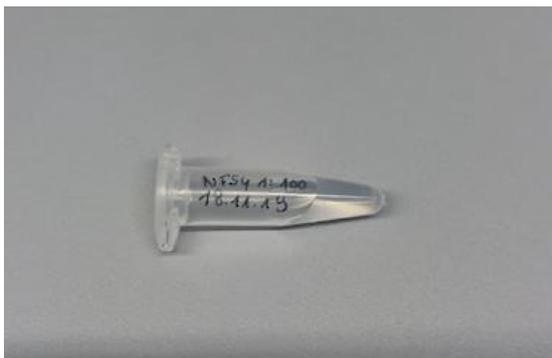


Abbildung 2.7: NF54 (Positiv-Kontrolle)



Abbildung 2.8: Thermocycler, in welcher die DNA-Proben für die PCR amplifiziert werden

## 2. PCR (allelspezifisch)

Für die 2.PCR werden allelspezifische Primer benötigt. Diese Inner Forward Primer (IFP) und Inner Reverse Primer (IRP) binden weiter innen an die Matrize der amplifizierten DNA. Die Produkte der 1.PCR werden in dieser zweiten Reaktion zu kürzeren DNA-Fragmenten in höherer Anzahl amplifiziert. Die entstehenden Produkte entsprechen in ihren Eigenschaften bestimmten Alleltypen (*msp1*: K1, MAD20, RO33; *msp2*: 3D7/IC, FC27).

### DNA-Strang

\_\_\_OFP\_IFP  IRP\_\_ORP\_\_\_

 ist das, was interessiert und was später auf dem Gel (siehe unten) zu sehen sein wird.

- **Erhitzen der Primer:**

- 1 Tube mit ***msp1* K1-Forward-Primer** (KFP)
  - 1 Tube mit ***msp1* K1-Reverse-Primer** (KRP)
  - 1 Tube mit ***msp1* MAD20-F-Primer** (MFP)
  - 1 Tube mit ***msp1* MAD20-R-Primer** (MRP)
  - 1 Tube mit ***msp1* RO33-F Primer** (RFP)
  - 1 Tube mit ***msp1* RO33-R-Primer** (RRP)
  - 1 Tube mit ***msp2* 3D7/IC-F-Primer** (ICFP)
  - 1 Tube mit ***msp2* 3D7/IC-R-Primer** (ICRP)
  - 1 Tube mit ***msp2* FC27-F-Primer** (FCFP)
  - 1 Tube mit ***msp2* FC27-R-Primer** (FCRP)
- Heizblock

Alle Tubes mit den verschiedenen Primer werden für 10 min in einem Heizblock auf 70°C erhitzt, damit Wasserstoffbrücken zwischen den Primer aufgebrochen werden.

- **Vortexen:**

- 5 Tubes mit den verschiedenen Primer
- (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix
- Vortexmischer

Zur Homogenisierung: Die Primer werden mittels eines Vortexmischer geschüttelt. Ebenso der (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix (Abb. 2.9).

- **Mastermix:**

10 Tubes mit Primer, 5 leere Tubes (1,5 ml)  
10 µl-Pipette, 100 µl-Pipette, 1'000 µl-Pipette  
fünf 12er Tube Strips

Mastermix 1

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* KFP**  
3,25 µl von ***msp1* KRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* MFP**  
3,25 µl von ***msp1* MRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 3

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* RFP**  
3,25 µl von ***msp1* RRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 4

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp2* ICFP**  
3,25 µl von ***msp2* ICRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 5

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp2* FCFP**  
3,25 µl von ***msp2* FCRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Die Mastermixe befinden sich separat voneinander in ihren Tubes (Abb. 2.10). Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von Mastermix 1 (mit *msp1* K1 Primer) in ein weisses 12er Tube Strip pipettiert. Mastermix 2 (mit *msp1* MAD20 Primer) wird in ein blaues 12er Tube Strip pipettiert. Es wird bei den weiteren Mastermixen 3-5 analog vorgegangen (Abb. 2.11).

- **Vermischen der Produkte mit Mastermix:**

zwei 12er Tube Strips mit den Produkten aus der **1.PCR** (Diese wurden in einem Tiefkühler bis zur nächsten Anwendung aufbewahrt.)

12-Pipettenhalter

fünf 12er Tube Strips mit den Mixen **für die 2.PCR**

Die Produkte der 1.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_1* und *msp2\_outer\_1* werden mit den Mastermixen vermischt: Je 2 µl von ***msp1\_outer\_1*** wird mit einem 12-Pipettenhalter nacheinander in die 3 weissen Tube Strips pipettiert und ***msp2\_outer\_1*** in die 2 blauen Tube Strips gefüllt (Abb. 2.12).

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

fünf 12er Tube Strips mit PCR-Produkten und Mastermix

Alle 5 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 2.PCR platziert.

PCR program 2nd PCR:

95 °C 12 min

**95 °C 30 sek**

**58 °C 30 sek**

**72 °C 40 sek**

72 °C 2 min

**Das wird 35x wiederholt.**

Dauer: Insgesamt 1h 40 min

Die 2.PCR braucht weniger lang für die Amplifikation der DNA, da kürzere DNA-Fragmente vervielfältigt werden: Man rechnet mit circa 1 Minute **Elongation Time** pro 1'000 Basenpaare für die Polymerase plus zusätzlich einige Sekunden zur Sicherheit.

Produkte 2.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K1\_2*** (Anmerkung: 2 weil 2.PCR)

**Amplifizierte DNA für *msp1\_MAD20\_2***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_RO33\_2***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_3d7/IC\_2***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_FC27\_2***

Diese einzelnen Alleltypen unterscheiden sich in ihrer Länge.

## Benötigte Materialien:



Abbildung 2.9: Allelspezifische Primer mit HOT FIREPol® MultiPlex Mix



Abbildung 2.10: 5 Tubes mit den Mastermixen und allelspezifischen Primer

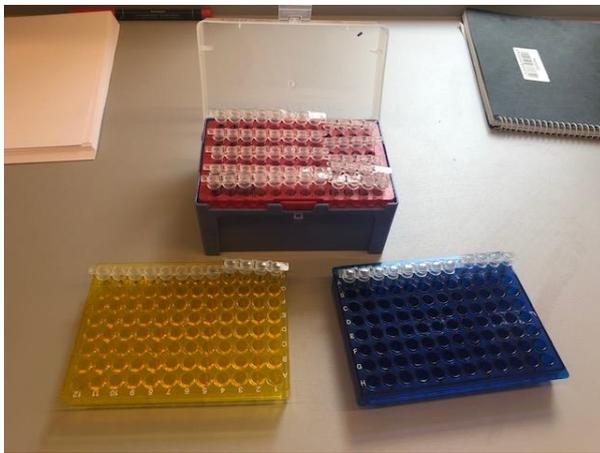


Abbildung 2.11: Rote Box mit Tube Strips, die mit den verschiedenen Mastermixen gefüllt sind für die 2.PCR und Tube Strips mit den PCR-Produkten aus der 1.PCR



Abbildung 2.12: Mit einem 12-Pipettenhalter werden Mastermixe mit den PCR-Produkten vermischt

### 2.4.3 Visualisierung der Allele mittels Agarose-Gelelektrophorese

Pro Gel ist es möglich, zwei Kämme zu verwenden. Diese ergeben 2 Reihen mit je 13 Kammern im Gel. Pro Reihe wird ein Allel angeschaut. Die 13 Kammern sind mit 10 DNA-Proben, einer Positiv- und Negativkontrolle und zusätzlich einer DNA-Leiter, um die Grösse der Fragmente zu bestimmen, beladen. Auf einem Gel haben 2 Produkte Platz. 2 Gels werden jeweils gleichzeitig hergestellt, weshalb nur 4 von den 5 Produkten aus der **2.PCR** darauf beladen werden können.

- **Herstellung des Agarosegels:**

- 1,5 g Agarosepulver
- 150 ml 0,5x konzentrierter TBE Buffer (aus 100 ml fünffachkonzentrierter (5x) TBE Buffer und 900 ml Wasser)
- 500 ml-Erlenmeyerkolben
- Waage
- 50 ml-Messzylinder
- Magnetstäbchen, Magnetrührer
- Mikrowelle

1,5 g Agarose wird auf einer Waage abgewogen. Im Messzylinder wird dreimal 50 ml für insgesamt 150 ml 0,5x konzentrierter TBE Buffer abgefüllt. 1,5 g Agarosepulver, 150 ml (0,5x) TBE Buffer und ein Magnetstäbchen werden in den Erlenmeyerkolben gefüllt. Die Agarose-Buffer-Lösung wird im Erlenmeyerkolben anschliessend für circa 5 Minuten in einer Mikrowelle aufgeheizt. Pulverstückchen werden dadurch in der Lösung aufgelöst. Der Erlenmeyerkolben wird dann für 15-20 min bei Raumtemperatur zum Abkühlen auf einem Magnetrührer stengelassen. Das Magnetstäbchen in der Lösung wird vom Magnetrührer magnetisch angeregt und es beginnt sich zu drehen. Das sorgt für ein gleichmässiges Abkühlen der gesamten Lösung. Danach kann das Agarosegel in zwei Gestelle gegossen werden. Die Agarose muss polymerisieren, um ein gleichmässiges Gitter zu bilden.

- 2 Gelelektrophorese-Gestelle
- 4 Kämme
- Wasserwaage

Es werden zwei Gelelektrophorese-Gestelle (Firma: MupidOne) vorbereitet: In jedes Gestell werden 2 Kämme eingerastet (2 Gels, 4 Kämme). Die Bereiche der Kämme sind gleich gross. Mit einer kleinen Wasserwaage wird kontrolliert, ob das Gestell ganz eben ist oder nicht. Falls nötig, wird ein kleines Papierfetzchen unter das Gestell gelegt, damit es überall gleich eben ist (Abb. 2.13).

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels:**

- 2 Gelelektrophorese-Gestelle
- 2 Gelelektrophorese-Geräte
- 4 Kämme
- Erlenmeyerkolben mit dem Gel
- (0,5x) TBE Buffer

Das Agarosegel wird in zwei Gelelektrophorese-Gestelle gegossen. Dann wird 15 Minuten gewartet, damit das Gel fest werden kann. Danach wird die Oberfläche des Gels mit (5x) TBE Buffer benetzt. Die 4 Kämme werden aus den Gels herausgehoben. Pro Gel gibt es zwei waagrechte Reihen mit je 13 Kammern, die beladen werden. Jedes Gestell mit Gel wird in ein Gelelektrophorese-Gerät gelegt: In zwei Gelelektrophorese-Geräte wird (0,5x) TBE Buffer gefüllt, sodass die Gels vollständig mit Buffer bedeckt sind.

- **Beladen der Gels:**

- Beladungspuffer (= DNA-Loading Dye 10-fach konzentriert)
- DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)
- Mikrotiterplatte
- 10 µl-Pipette
- Pipettenhalter
- vier 12er Tube Strips mit Produkten aus der **2.PCR**

Auf einer Mikrotiterplatte werden 4 von 8 waagrecht Reihen mit Beladungspuffer gefüllt (Abb. 2.14). Jede Reihe besitzt 12 Röhren. Mit einer 10 µl-Pipette wird 1 µl Beladungspuffer in die 12 Röhren jeder Reihe pipettiert: Der Puffer sorgt dafür, dass die PCR-Produkte in den Kammern des Gels bleiben und sich nicht im Buffer verteilen. Beladungspuffer ist viskoser als der TBE Buffer und ist mit einem Farbstoff versehen, damit überprüft werden kann, ob in die Kammer richtig geladen wurde und ob die PCR-Produkte auf dem Gel in die richtige Richtung wandern. Mit einem Pipettenhalter werden 4 Produkte aus der 2.PCR mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.

Auf der Mikrotiterplatte sind 4 Reihen mit Beladungspuffer gefüllt. Pro Reihe wird ein Produkt mit Beladungspuffer vermischt. 5 µl PCR-Produkt wird zu 1 µl Puffer pipettiert. Um beides zu mischen, wird hoch und runter pipettiert. Danach kann das Gel beladen werden (Abb. 2.15). Ein Gel wird mit *mSP1\_R\_2* und *mSP1\_M\_2* beladen. In der oberen Reihe befindet sich *mSP1\_R\_2*. Die Kammern Nr. 1-8, Nr. 10 und 11 sind mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *mSP1\_M\_2*. Gleicher Vorgang beim

Beladen der Kammern. Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit *msp1\_K\_2* und *msp2\_IC\_2* beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_K\_2*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_IC\_2*. Kammer Nr.12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC. Kammer Nr.9 wird mit DNA-Leiter (3 µl) beladen. Anhand der DNA-Leiter kann später im Geldokumentationssystem auf den Gels abgelesen werden, wie lange die verschiedenen DNA-Fragmente jeder Kammer sind. Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte (Firma: MupidOne) mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern wandert für 30 min durch das Gel.

- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

- 2 GE-Geräte mit den 2 Gels
- GelRed
- Geldokumentationssystem
- PC

Die Gels werden aus den zwei Geräten herausgenommen und für 20 min in GelRed gelegt (Abb. 2.16). Das ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der interkalierend an DNA bindet. Im Quantum ST5 Gel Documentation System, einem Geldokumentationssystem, werden die DNA-Fragmente auf den zwei Agarosengels mit UV-Licht bestrahlt (Abb. 2.17). Das an das PCR-Produkt gebundene GelRed fluoresziert mit einem orangen Farbton, wenn es UV-Licht ausgesetzt wird. Die Länge der DNA-Fragmente kann mit Hilfe der DNA-Leiter abgelesen werden: Die verschiedenen DNA-Fragmente sind aus den Kammern verschieden weit migriert. Sie sind als Banden (= waagrechte Striche) im Gel zu sehen. Wenn mehrere Banden in einer Kammer zu sehen sind, bedeutet dies, dass für die DNA mehrere Parasitenstämme vorliegen.

Für die Alleltypen *msp1* M und R sind keine Banden zu sehen, dafür aber für *msp1* K1 und *msp2* 3D7/IC (Abb. 2.18). Bei der 3.PCR wird deshalb die 2.PCR mit höherer Primerkonzentration für *msp1* M, R und auch gleich für K wiederholt.

## Benötigte Materialien:



Abbildung 2.13: Gelelektrophorese-Gestelle



Abbildung 2.14: Pipette mit Beladungs-  
buffer



Abbildung 2.15: Gel wird beladen

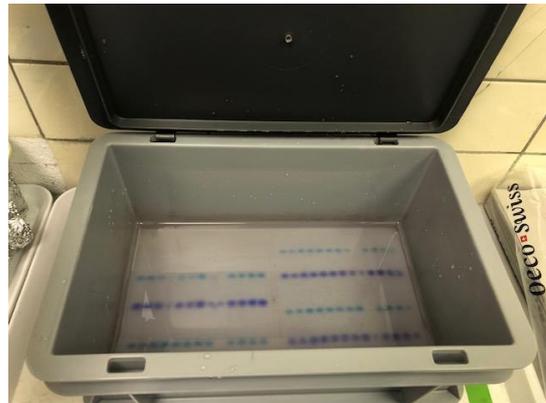


Abbildung 2.16: Gel im GelRed-Bad



Abbildung 2.17: ST5 Gel Documentation System

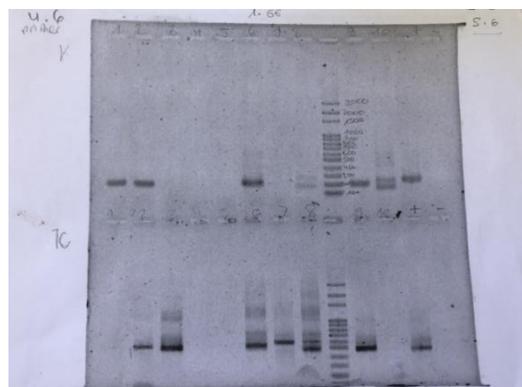


Abbildung 2.18: Ausgedrucktes Gelbild  
mit Banden für *msp2* 3d7/IC und FC27

## 2.5 Daten-Analyse

Die Gelbilder wurden mittels des Programms R Studio am Computer visualisiert. Die Signifikanzberechnungen wurden anhand des Fisher Exact Test Calculator, des Chi-Square Calculator und AVONA durchgeführt (siehe Referenzen).

Die Berechnungen für den Mastermix und die Laufzeit für die PCRs wurden von meiner Betreuungsperson gemacht:

Die Primer, Konditionen der PCR und die verwendeten Reagentien sind angepasst und basieren auf Snounou et al. (1999).

### ***msp1 msp2* Genotypisieren Master Mix**

Reaktionsvolumen [uL]	20
Anzahl Reaktionen	26
Volumen der Probe [uL]	2

	<b>Konzentration der Stocklösung</b>	<b>Reaktions- konzentration</b>	<b>Volumen pro Reaktion</b>	<b>Mastermix für 13 Reaktionen</b>
5x Hot Firepol Master Mix	5	1	4	104
Primer F	10	0.25	0.5	13
Primer R	10	0.25	0.5	13
H <sub>2</sub> O			13	338

Tabelle 2.1: Mastermix-Berechnungen

### **Berechnung Volumen pro Reaktion**

Reaktionskonzentration/Konzentration Stocklösung\*Reaktionsvolumen

Wasser: Totalvolumen - Volumen der Probe - 5xHotFirepol - Primer F - Primer R

### **Berechnung Mastermix**

Volumen pro Reaktion\*Anzahl Reaktionen

### PCR program 1st PCR

95 °C	12 min	
95 °C	1 min	
56 °C	1 min	25x
72 °C	2 min	
72 °C	2 min	

### PCR Programm 2.PCR für *msp1*

95 °C	12 min	
95 °C	30 s	
56 °C	30s	35x
72 °C	40s	
72 °C	2 min	

### PCR Programm 2.PCR für *msp2*

95 °C	12 min	
95 °C	30 s	
58 °C	30s	35x
72 °C	40s	
72 °C	2 min	

Tabelle 2.2: PCR-Programmierungen

## 2.6 Schriftliche Befragung von einer Expertin und zwei Experten des Swiss TPH

In Rahmen der Maturaarbeit am Swiss TPH ergab sich im September die Gelegenheit, eine schriftliche Befragung von Herrn Prof. Marcel Tanner, Frau Prof. Claudia Daubenberger und Herrn Dr. Tobias Schindler durchzuführen.

Herr Marcel Tanner, Professor, PhD, MPH, Epidemiologe, Direktor Emeritus des Swiss TPH, Präsident der Rudolf Geigy-Stiftung, Präsident der Akademien der Wissenschaften Schweiz wurde zu den wichtigsten Erfolgen und den aktuell grössten Herausforderungen bei der weltweiten Malariabekämpfung befragt.

Frau Claudia Daubenberger, Professorin, PHD, DVM, Leiterin der Abteilung Clinical Immunology am Swiss TPH berichtete über den Einfluss der Genotypisierung und den weiteren «genetic tools» bei der Malariabekämpfung. Zudem informierte sie über den aktuellen Stand bezüglich der Entwicklung von Impfstoffen und neuen Medikamenten.

Herr Tobias Schindler, PhD, postdoktoraler wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abteilung Medical Parasitology and Infection Biology am Swiss TPH, erklärte den Stellenwert von genetischen Methoden, wie z.B. PCR, im Gegensatz zu Methoden wie Mikroskopie und RDT bei der Malaria-Diagnose. Zudem berichtete er über den Stellenwert der Genotypisierung in Bezug auf die Malariabekämpfung.

## 3 Resultate

### 3.1 Studienpopulation

Es nahmen 20'012 Einwohnerinnen und Einwohner von 4'774 Haushalten aus Bioko Island am BIMCP 2018, einer jährlichen MIS, teil. Bioko Island als Insel wurde für dieses Projekt ausgesucht, da dort Massnahmen mit weniger Störfaktoren ausgewertet werden können. Bei der MIS wurden Einwohnerinnen und Einwohner jeglichen Alters miteinbezogen. 13'348 (66,7%) Teilnehmerinnen und Teilnehmer stellten ihre RDT-Proben für eine molekulare Analyse zur Verfügung. Die Malariaprävalenz zeigt Höchstwerte bei Kindern ab 5 Jahren und Jugendlichen und sinkt danach mit zunehmendem Alter (Hosch 2020). Die Prävalenz ist je nach geografischer Lage unterschiedlich (Hosch 2020). In dieser Arbeit sind die vier Regionen, in welchen die MIS-Untersuchungen durchgeführt wurden, auf eine Nord- und Südprovinz aufgeteilt worden, damit bessere Vergleiche möglich sind: Malabo und Baney bilden Bioko Norte, Luba und Riaba bilden Bioko Sur.

Für diese Arbeit wurde bereits extrahierte DNA von insgesamt 50 RDT-Proben zur Verfügung gestellt. Alle Probanden dieser 50 Proben sind asymptomatisch. Die Proben wurden nicht zufällig ausgewählt, sondern aufgrund verschiedener Faktoren basierend auf RDT-Resultaten (siehe Hosch 2020). Drei von 50 RDT-Proben aus dem MIS konnten nicht untersucht werden, da diese Proben in der Zwischenzeit bereits für andere Experimente verbraucht worden waren. Mit der Methode der nPCR wurden deshalb insgesamt 47 Proben amplifiziert. 11 Proben (23%, 11/47) konnten weder für *msp1* noch für *msp2* amplifiziert werden. Insgesamt 27 Proben (57%, 27/47) ergaben ein PCR-Produkt für *msp1* und *msp2*. Für *msp1* und/oder *msp2* konnte die nPCR bei 36 Proben erfolgreich durchgeführt werden: 32 Proben (89%, 32/36) ergaben ein PCR-Produkt für *msp1* und 31 Proben (86%, 31/36) für *msp2*.

Unter den 36 Probanden befinden sich 22 (61%) Frauen und 14 (39%) Männer. Die Probanden wurden in drei Altersgruppen zusammengefasst, damit Vergleiche hinsichtlich ihres Alters möglich sind. Sechs sind Kinder unter fünf Jahren (17%, 6/36) und 21 Kinder zwischen 5 und 14 Jahren (58%, 21/36). Die restlichen neun Probanden (25%, 9/36) sind zwischen 15 und 43 Jahre alt.

### 3.2 Häufigkeiten von *msp1* und *msp2* Alleltypen

Bei den *msp1* Alleltypen kommt K1 in 27 Proben vor, MAD20 in 12 und RO33 in 7. Bei den *msp2* Alleltypen sind es 3D7/IC in 22 Proben und FC27 in 13. Die Verteilung der Genotypen ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Für *msp1* überwiegt gesamthaft der Alleltyp K1 mit 75% (27/36), MAD20 folgt mit 33% (12/36) und RO33 mit 19% (7/36). Bei *msp2* überwiegt der Alleltyp 3D7/IC mit 61% (22/36), gefolgt von FC27 mit 36% (13/36).

### 3.2.1 Alleltypen in den Altersgruppen

Für *msp1* kommt K1 öfter bei Kindern als Erwachsenen vor (Tabelle 3.1). Bei den 5-bis 14-Jährigen ist die Prävalenz von K1 mit 86% (18/21) am höchsten, gefolgt von den unter 5-Jährigen mit 67% (4/6) und den über 15-Jährigen mit 56% (5/9) ( $p=0.190$ ). Für *msp2* kommt 3D7/IC bei allen Altersgruppen am häufigsten vor. Die höchste Prävalenz findet sich bei den über 5-Jährigen mit 60% (18/30) ( $p=1$ ). Das Verhältnis von Infektionen mit 3D7/IC und FC27 ist in allen Altersgruppen ähnlich, 3D7/IC verursachte 67% der Infektionen von unter 5-Jährigen, 53% der Infektionen von 5-14-Jährigen und 78% der Infektionen von über 15-Jährigen. K1 kommt bei allen Altersgruppen nicht signifikant häufiger vor als die anderen *msp1* Allele ( $p=0.19$ ), das Gleiche gilt für *msp2* 3D7/IC ( $p=0.969$ ).

Genlokus	Alleltyp	Altersgruppen (in Jahren)			Total
		<5 <i>n</i> (%) <b>(<i>n</i> = 6)</b>	5-14 <i>n</i> (%) <b>(<i>n</i> = 21)</b>	≥15 <i>n</i> (%) <b>(<i>n</i> = 9)</b>	
<i>msp1</i>	K1	3 (50%)	9 (43%)	2 (22%)	14 (39%)
	MAD20	1 (17%)	2 (10%)	0 (0%)	3 (8%)
	RO33	0 (0%)	0 (0%)	2 (22%)	2 (6%)
	K1+MAD20	0 (0%)	7 (33%)	1 (11%)	8 (22%)
	K1+RO33	1 (17%)	2 (10%)	1 (11%)	4 (11%)
	MAD20+RO33	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	K1+MAD20+RO33	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	1 (3%)
Total		5 (83%)	20 (95%)	7 (78%)	32 (89%)
MOI		1,5	1,57	1,78	1,81
<i>msp2</i>	3D7/IC	4 (67%)	9 (43%)	5 (56%)	18 (50%)
	FC27	2 (33%)	5 (24%)	2 (22%)	9 (25%)
	3D7/IC+FC27	0	2 (10%)	2 (22%)	4 (11%)
	Total	6 (100%)	16 (76%)	9 (100%)	31 (86%)
MOI		1,33	1,1	1,44	1,42
Multiklonale Infektionen		3 (50%)	12 (57%)	4 (44%)	19 (53%)
MOI gesamt		1,67	1,76	2	1,8

*n* Nummer der Individuen, *MOI* Multiplicity Of Infection

**Tabelle 3.1: Genetische Diversität von *Plasmodium falciparum msp1* und *msp2* innerhalb verschiedener Altersgruppen**

Bei einer monoklonalen Infektion ist jeweils nur ein Genotyp vertreten. Das heisst, bei *msp1* sind es die Alleltypen K1, MAD20 oder RO33 und bei *msp2* ist es entweder 3D7/IC oder FC27. Viele Personen haben mehr als einen Genotyp, also eine multiklonale Infektion. Bei einer solchen Infektion sind mehrere Alleltypen vorhanden. Dabei sind

mehrere Kombinationen zwischen den verschiedenen Alleltypen möglich. Diese sind bei *msp1* K1+MAD20, K1+RO33, MAD30+RO33 oder K1+MAD20+RO33, da für *msp1* Kombinationen mit maximal drei verschiedenen Alleltypen möglich sind. Bei *msp2* gibt es nur die Kombination mit den beiden Alleltypen 3D7/IC+FC27.

Tabelle 3.1 zeigt, dass bei *msp1* in allen Altersgruppen multiklonale Infektionen mit verschiedenen Alleltypen (36%, 13/36) auftreten: Bei den unter 5-Jährigen gibt es eine einzige multiklonale Infektion (17%); 12 von 30 (40%) sind es bei den über 5-Jährigen ( $p=0.385$ ). Diese multiklonalen Infektionen treten vor allem kombiniert mit dem Alleltyp K1 auf. Bei *msp2* wurden mit 11% (4/36) weniger multiklonale Infektionen festgestellt.

### 3.2.2 Alleltypen nach Provinzen

In Tabelle 3.2 wird die Genotypverteilung zwischen der Nord- und Südprovinz von Bioko Island angeschaut. Es sind unterschiedlich viele Proben für Bioko Norte und Bioko Sur analysiert worden: Die Mehrzahl der Proben sind aus Bioko Norte, nämlich 29 Proben (81%, 29/36), die positiv für *msp1* und/oder für *msp2* getestet worden, verglichen mit 7 Proben (19%, 7/36) von Bioko Sur. In Bioko Norte funktionierte die PCR für *msp1* und/oder *msp2* bei 9 Proben nicht und im Süden bei 2. Das heisst, dass für die Nordprovinz effektiv 29 von 38 Proben (76%) amplifiziert werden konnten und für die Südprovinz 7 von 9 Proben (78%).

Bei *msp1* kommt K1 sowohl im Norden (76%, 22/29) als auch im Süden (71%, 5/7) am häufigsten vor. Bei *msp2* ist 3D7/IC häufiger im Süden mit 71% (5/7) als im Norden mit 59% (17/29) vertreten ( $p=0,681$ ).

Multiklonale Infektionen für *msp1* sind im Norden mit 38% (11/29) vertreten, verglichen mit 29% (2/7) im Süden ( $p=1$ ).

Genlokus	Alleltyp	Bioko Norte	Bioko Sur	Total
		<i>n</i> (%) ( <i>n</i> = 29)	<i>n</i> (%) ( <i>n</i> = 7)	<i>n</i> (%) ( <i>n</i> = 36)
<i>msp1</i>	K1	11 (38%)	3 (43%)	14 (39%)
	MAD20	2 (7%)	1 (14%)	3 (8%)
	RO33	2 (7%)	0 (0%)	2 (6%)
	K1+MAD20	6 (21%)	2 (29%)	8 (22%)
	K1+RO33	4 (14%)	0 (0%)	4 (11%)
	MAD20+RO33	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	K1+MAD20+RO33	1 (3%)	0 (0%)	1 (3%)
Total	26 (90%)	6 (86%)	32 (89%)	
MOI	1,62	1,57	1,81	
<i>msp2</i>	3D7/IC	13 (45%)	5 (71%)	18 (50%)
	FC27	8 (28%)	1 (14%)	9 (25%)
	3D7/IC+FC27	4 (14%)	0 (0%)	4 (11%)
	Total	25 (86%)	6 (86%)	31 (86%)
MOI	1,14	1,57	1,42	
Multiklonale Infektionen		14 (48%)	5 (71%)	19 (53%)
MOI gesamt		1,72	2,14	1,8

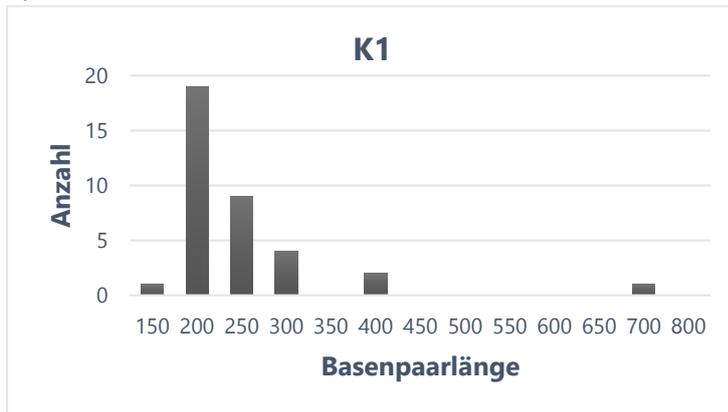
*n* Nummer der Individuen, *MOI* Multiplicity Of Infection

**Tabelle 3.2: Genetische Diversität von *Plasmodium falciparum msp1* und *msp2* in der Nord- und Südprovinz**

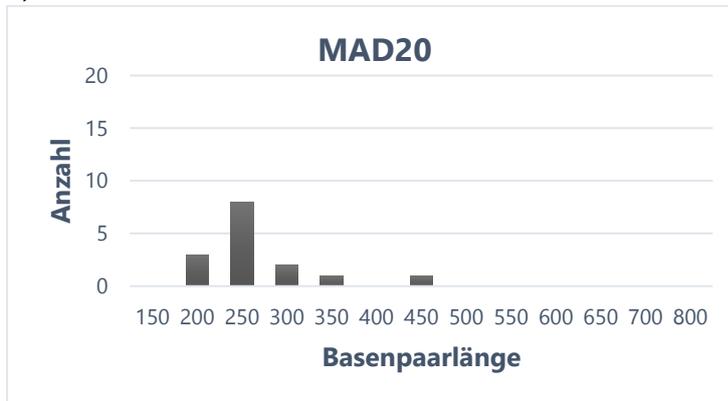
### 3.3 Häufigkeiten von *msp1* und *msp2* Allel-Basenpaarlängen

Für die genetische Diversität sind nicht nur die Alleltypen und ihre Kombinationen relevant, sondern auch ihre jeweiligen Basenpaarlängen. Hat z.B. eine Person zwei *msp1* K1 Genotypen und diese unterscheiden sich in ihrer Basenpaarlänge, dann hat diese Person ebenfalls eine multiklonale Infektion.

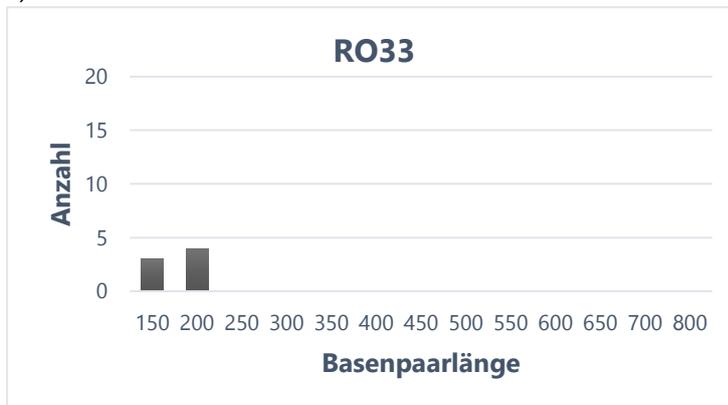
a)



b)



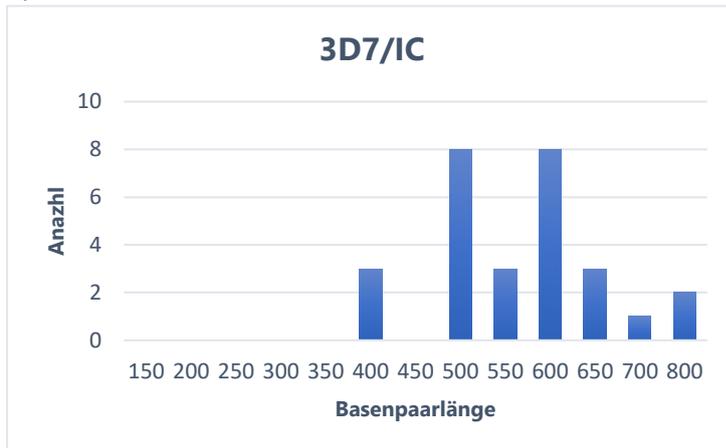
c)



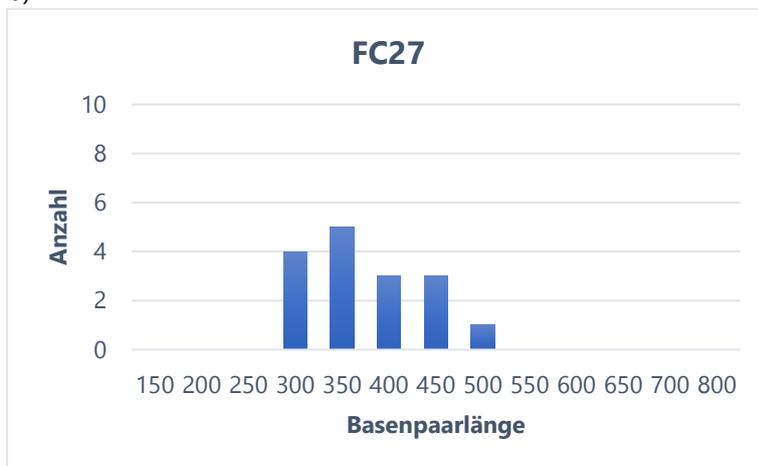
**Diagramm 3.1a-c: Allelverteilung *msp1* K1, MAD20, RO33**

Tabelle 3.3 veranschaulicht die Anzahl PCR-Produkte von den verschieden langen Alleltypen. Es gab 36 PCR-Produkte für K1, 15 für MAD20 und 7 für RO33. In Diagramm 3.1a-c sind die drei *msp1* Alleltypen mit ihren unterschiedlichen Basenpaarlängen zu sehen. Es gibt gesamthaft 13 verschiedene Allele, die für *msp1* identifiziert wurden: Für K1 gibt es 6 unterschiedliche Allele mit einer Länge zwischen 150-700 Basenpaaren (bp). Bei MAD20 gibt es 5 verschiedene Allele (200-450bp) und bei RO33 sind es 2 unterschiedliche Allele (150 und 200bp).

a)



b)



**Diagramm 3.2a und b: Allelverteilung *msp2* 3d7/IC und FC27**

Für *msp2* gibt es 28 PCR-Produkte für 3D7/IC und 15 für FC27 (Tabelle 3.3). Es sind 12 verschiedene Allele identifiziert worden (Diagramme 3.2a+b): Für 3D7/IC gibt es 7 verschiedene Allele (400-800bp), bei FC27 5 verschiedene Allele (300-500bp).

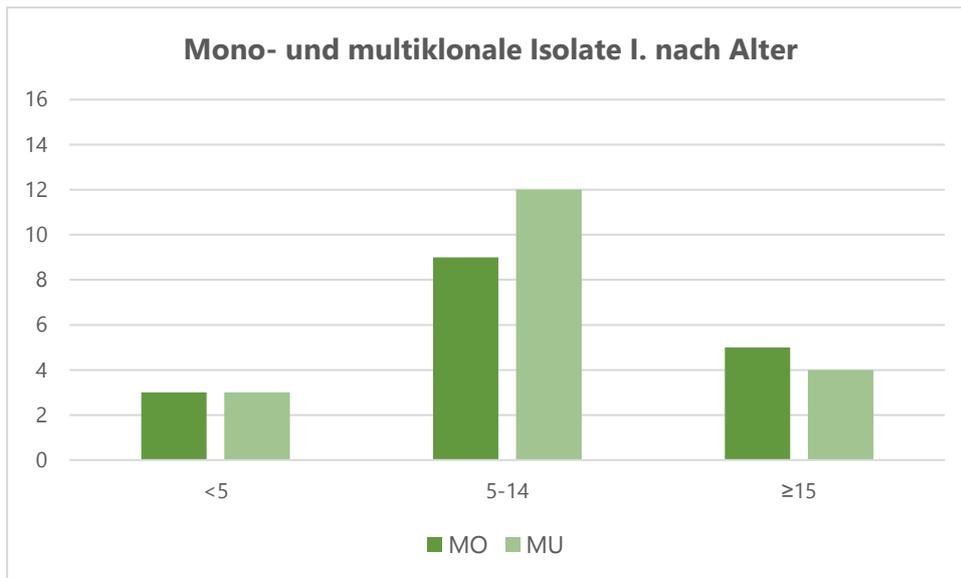
Es konnten 11 Proben nicht amplifiziert werden, während es bei 36 Proben möglich war ( $p=0,18$ ). Insgesamt gibt es 9 Proben, die gleichzeitig für *msp1* und *msp2* multiklonale Infektionen aufweisen. Tabelle 3.3. zeigt, dass 17 Proben (53%, 17/32) für *msp1* multiklonal sind. Für *msp2* sind es 11 (35%, 11/31) ( $p=0,17$ ). Es gibt in Bioko Norte für *msp1* 14 multiklonale Infektionen und im Süden 3. Für *msp2* sind es 8 multiklonale Infektionen im Norden und 4 im Süden.

Bei den unter 5-Jährigen gibt es 12 verschiedene Alleltypen. Die 5- bis 14-Jährigen sowie die über 15-Jährigen haben jeweils 17 Alleltypen ( $p=0,9$ ). In Bioko Norte treten 13 verschiedene Alleltypen für *msp1* auf und für *msp2* 10. Im Süden gibt es 5 Alleltypen für *msp1* und 7 für *msp2* ( $p=0,4$ ). Zusammengefasst sind im Norden 23 Alleltypen für *msp1* und *msp2* vorhanden und 12 Alleltypen für *msp1* und *msp2* im Süden. Die Anzahl Alleltypen in beiden Provinzen für *msp1* verglichen mit *msp2* sind ähnlich.

Genotyp	Altersgruppen (in Jahren)			Provinz			
	<5 <i>n</i> =6	5-14 <i>n</i> =21	≥15 <i>n</i> =9	PCR- Produkt Total	Bioko Norte <i>n</i> =29	Bioko Sur <i>n</i> =7	PCR- Produkt Total
<i>msp1</i>							
K1 <sub>150</sub>	1	-	-	1	1	-	1
K1 <sub>200</sub>	3	15	1	19	14	5	19
K1 <sub>250</sub>	1	4	4	9	9	-	9
K1 <sub>300</sub>	2	1	1	4	2	2	4
K1 <sub>400</sub>	-	-	2	2	2	-	2
K1 <sub>700</sub>	-	-	1	1	1	-	1
MAD20 <sub>200</sub>	-	2	1	3	2	1	3
MAD20 <sub>250</sub>	1	6	1	8	6	2	8
MAD20 <sub>300</sub>	-	2	-	2	1	1	2
MAD20 <sub>350</sub>	-	1	-	1	1	-	1
MAD20 <sub>400</sub>	-	-	-	-	-	-	-
MAD20 <sub>450</sub>	-	-	1	1	1	-	1
RO33 <sub>150</sub>	1	-	2	3	3	-	3
RO33 <sub>200</sub>	-	2	2	4	4	-	4
<i>msp2</i>							
FC27 <sub>300</sub>	1	3	-	4	4	-	4
FC27 <sub>350</sub>	1	-	4	5	5	-	5
FC27 <sub>400</sub>	-	3	-	3	2	1	3
FC27 <sub>450</sub>	-	3	-	3	2	1	3
FC27 <sub>500</sub>	-	1	-	1	-	1	1
3D7/IC <sub>400</sub>	-	3	-	3	-	3	3
3D7/IC <sub>450</sub>	-	-	-	-	-	-	-
3D7/IC <sub>500</sub>	1	4	3	8	7	1	8
3D7/IC <sub>550</sub>	1	1	1	3	2	1	3
3D7/IC <sub>600</sub>	2	4	2	8	5	3	8
3D7/IC <sub>650</sub>	2	-	1	3	3	-	3
3D7/IC <sub>700</sub>	-	-	1	1	1	-	1
3D7/IC <sub>800</sub>	-	1	1	2	2	-	2

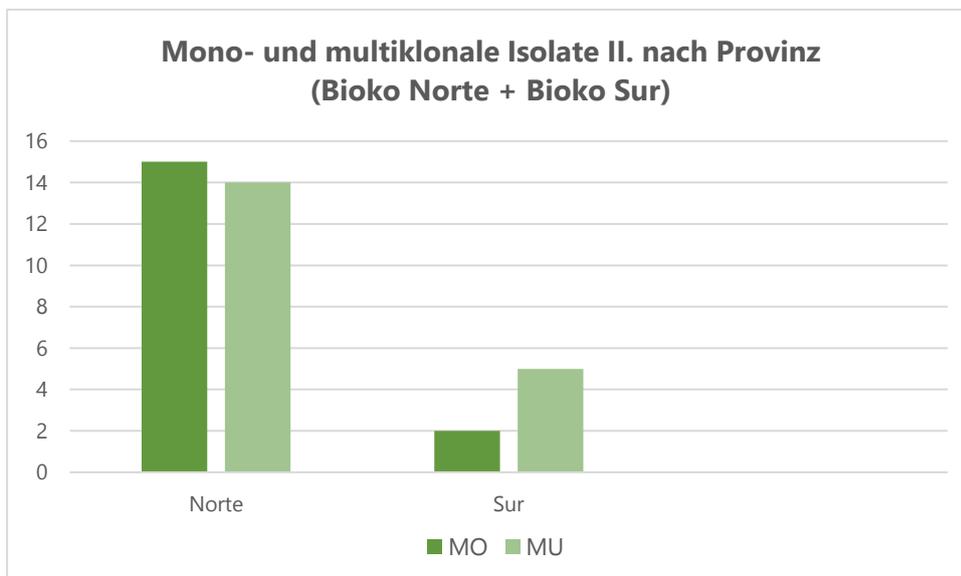
**Tabelle 3.3: Für *msp1/msp2* identifizierte Allele nach Altersgruppen, Provinzen und Anzahl Basenpaarlängen**

Alle Altersgruppen zeigen Diversität bezüglich den Basenpaarlängen (Tabelle 3.3): Kinder unter 15 Jahren zeigen eine Tendenz in Richtung kürzerer Basenpaarlängen, während es mit zunehmendem Alter mehr Allele mit längeren Basenpaarlängen gibt. Dies ist deutlich bei *msp2* FC27 und 3D7/IC zu sehen. Bei den unter 5-Jährigen ist die Diversität für K1 und 3D7/IC mit mehr als 6 verschiedenen Genotypen am höchsten.



**Diagramm 3.3a: Verteilung monoklonale und multiklonale Isolate in Altersgruppen**

In Diagramm 3.3a wird *msp1* und *msp2* kombiniert dargestellt, d.h. sobald *msp1* oder *msp2* mehrere Allele hat, gilt die Probe als multiklonal. Es sind in allen drei Altersgruppen monoklonale sowie multiklonale Infektionen vorhanden. Bei der Altersgruppe der unter 5-Jährigen wurden gleich oft monoklonale wie multiklonale Infektionen gefunden (3:3). In der Altersgruppe zwischen 5-14 Jahren überwiegen die multiklonalen Isolate (12:9). Bei den über 15-jährigen ist das Verhältnis wieder ausgewogener (5:4). Ein Peak bei den multiklonalen Isolaten findet sich in der mittleren Altersgruppe.

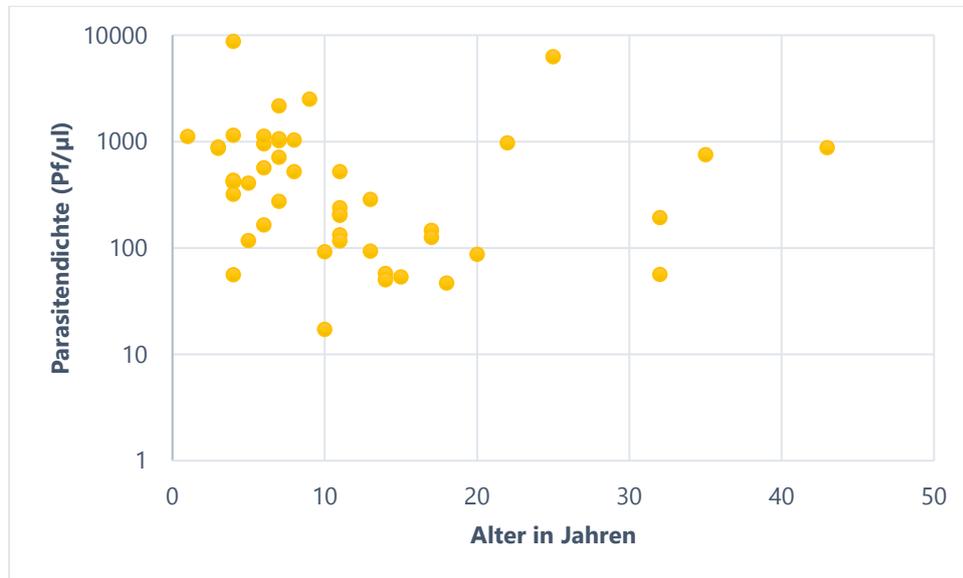


MO Monoklonal, MU Multiklonale Isolate

**Diagramm 3.3b: Verteilung monoklonale und multiklonale Isolate in den Provinzen Bioko Norte und Bioko Sur**

In Diagramm 3.3b ist die Anzahl der monoklonalen und multiklonalen Isolate in Bioko Norte ähnlich gross (15:14). In Bioko Sur überwiegen multiklonale gegenüber monoklonalen Isolaten (5:2) ( $p=0,408$ ).

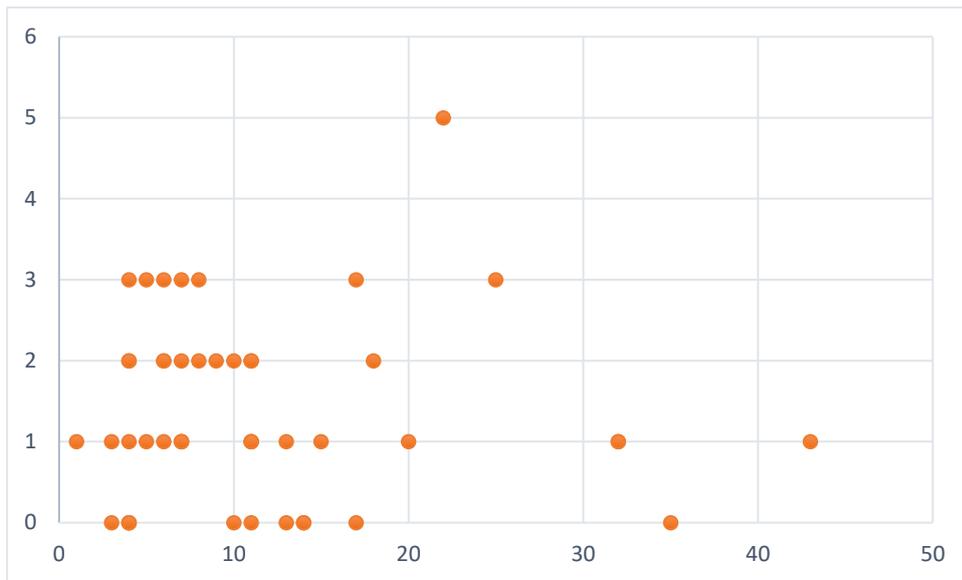
### 3.4 Parasitendichte in den RDT-Proben



**Diagramm 3.4: Parasitendichte in Abhängigkeit vom Alter**

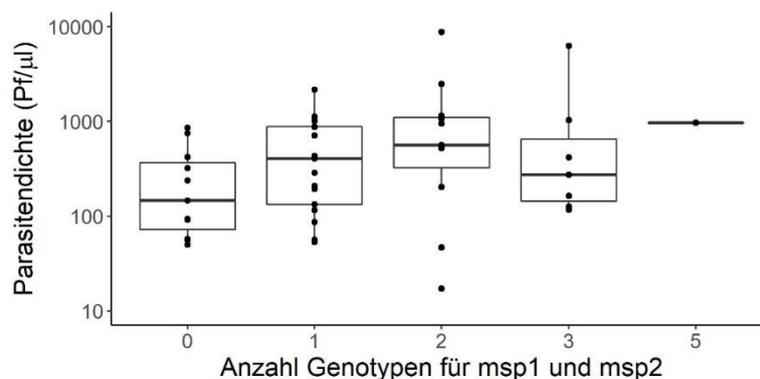
Diagramm 3.4 zeigt die Parasitendichte in Abhängigkeit vom Alter. Bei den untersuchten Probanden ohne Malariasymptome ist eine geringe Parasitendichte, meist Werte unter 1'000 pro Mikroliter Blut, festzustellen. Erwachsene haben generell tiefere Parasitendichten. Von den Erwachsenen konnten nur die wenigen analysiert werden, welche genügend grosse Parasitendichten haben.

Die meisten Proben, für die keine Genotypisierung möglich war, waren von Personen jünger als 20 Jahre. Bei den restlichen Personen treten ein bis drei Genotypen auf (Diagramm 3.5). Die Verteilung der Anzahl Genotypen innerhalb dieser Altersgruppe ist etwa ausgeglichen.



**Diagramm 3.5: Anzahl Genotypen für *msp1* und *msp2* in Abhängigkeit vom Alter**

Der Wert der MOI beschreibt die Anzahl Genotypen pro Anzahl Personen. Wenn z.B. für eine Person zwei MAD20 und ein RO33 Genotyp gefunden wurde, ist die MOI für diese Person gleich drei. Der MOI-Wert ist nicht mit den multiklonalen Infektionen zu verwechseln: Bei der MOI wird die Zahl der verschiedenen Alleltypen pro Person angeschaut, während bei der Unterscheidung von multi- und monoklonalen Infektionen wichtig ist, ob verschiedene Alleltypen auftreten oder nicht. Das heißt, wenn z.B. bei einem Probanden zwei verschiedene Alleltypen gefunden werden, dann wird das als eine multiklonale Infektion bezeichnet. Tabelle 3.1 zeigt, dass der MOI-Wert mit dem Alter steigt. In Tabelle 3.2 beträgt der MOI-Wert im Süden 2,14 gegenüber dem Norden mit 1,72 ( $p=0,315$ ). Es gibt keine grossen Unterschiede bei der MOI zwischen *msp1* und *msp2*. Das gilt ebenso für den MOI-Wert bei den Altersgruppen sowie bei den Provinzen. In Tabelle 3.1 ist die MOI bei den über 15-Jährigen am höchsten: ein Proband dieser Altersgruppe besitzt 5 Genotypen (Tabelle 3.5). Das erhöhte auch die Gesamt-MOI (Tabelle 3.1).



**Diagramm 3.6: Parasitendichte in Abhängigkeit von der Anzahl Genotypen** (Darstellung von Salome Hosch 2020)

	Anzahl Genotypen					
	0	1	2	3	4	5
<b>Parasitendichte/<math>\mu</math>l</b>						
<1'000	11	13	7	5	-	1
1'000-1'999	-	3	2	1	-	-
2'000-2'999	-	1	1	-	-	-
5'000-5'999	-	-	-	1	-	-
8'000-8'999	-	-	1	-	-	-

**Tabelle 3.4a: Anzahl Genotypen für *msp1* und *msp2* in Abhängigkeit von der Parasitendichte**

	Anzahl Genotypen					
	0	1	2	3	4	5
<b>Parasitendichte/<math>\mu</math>l</b>						
<100	5	3	2	-	-	-
<1'000	6	10	5	5	-	1
>1'000	-	4	4	2	-	-

**Tabelle 3.4b: Anzahl Genotypen für *msp1* und *msp2* in Abhängigkeit von der Parasitendichte**

Diagramm 3.6 zeigt folgendes: Die Parasitendichte erstreckt sich über einen weiten Zahlenbereich von 17 bis 6'282 Parasiten/ $\mu$ l. Die durchschnittliche Parasitendichte entspricht rund 366 pro  $\mu$ l (geometrischer Mittelwert: Berechnung Salome Hosch) bzw. rund 821 pro  $\mu$ l (arithmetischer Mittelwert). Die Parasitendichte für die 11 Proben, in denen weder *msp1* noch *msp2* amplifizierbar waren, beträgt 49-860 Parasiten/ $\mu$ l, also stets unter 1'000 Parasiten/ $\mu$ l. Die durchschnittliche Parasitendichte dieser Proben entspricht rund 178 pro  $\mu$ l (geometrischer Mittelwert: Berechnung Salome Hosch) bzw. rund 281 pro  $\mu$ l (arithmetischer Mittelwert) ( $p=0.19$ ).

Tabelle 3.4a und 3.4b zeigen: In den Proben mit einer Parasitendichte unter 1'000 Parasiten/ $\mu$ l wurden zwischen einem und fünf Genotypen gefunden, wobei der Wert 1 am häufigsten auftritt. Bei den wenigen Proben mit über 1'000 Parasiten pro  $\mu$ l gibt es keine Häufigkeit einer bestimmten Genotypenanzahl ( $p=0.69$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Material und Methoden

Die RDT-Proben wurden von asymptomatischen Probanden entnommen. Die Parasitendichte ist bei ihnen generell geringer als bei symptomatischen. In RDTs sind geringe Blutvolumen (5-15  $\mu\text{l}$ ) gespeichert. Die Proben sind trotz zweijähriger Lagerzeit gut erhalten, obwohl die Menge an DNA abnimmt, je länger sie aufbewahrt werden (Hosch 2020). Die Proben wurden zudem für andere Untersuchungen verwendet, weshalb relativ wenig DNA-Material vorhanden war. Salome Hosch hat daher die Proben basierend auf bestimmten Faktoren, wie die Parasitendichte und die Menge des DNA-Materials, ausgewählt, damit für die Analyse genügend verwendbares Material vorhanden war. Drei Proben wurden von vorgängigen Untersuchungen bereits verbraucht, weshalb für die Laborarbeit 47 von ursprünglich 50 Proben mittels nPCR amplifiziert werden konnten. Während der Laborarbeit wurde eine Mikrotiterplatte, die PCR-Produkte enthielt, nicht genügend gut verschlossen und die Produkte verdampften. Es konnten dadurch keine PCR-Wiederholungen von bestimmten Produkten durchgeführt werden. Das hatte jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtergebnis. Es ist bei der Aufbewahrung von Primer und PCR-Produkten wichtig, dass diese gut von der Luft verschlossen sind, da sie sonst verdampfen und dann keine Primer bzw. Produkte mehr vorhanden sind. Trotz all dieser Faktoren konnten gute Resultate erzielt werden. Für *msp1* und/oder *msp2* konnten 36 Proben mittels Agarose-Gelelektrophoresen genotypisiert werden. Für 11 Proben war die Genotypisierung nicht erfolgreich. Das lässt sich aufgrund der tiefen Parasitendichte erklären. Diese 11 Proben haben eine durchschnittliche Parasitendichte von 281 Parasiten/ $\mu\text{l}$ . Je weniger Parasiten in einem RDT vorhanden sind, desto schwieriger wird eine Genotypisierung, da dadurch die Wahrscheinlichkeit sinkt, in einer der Proben einen Parasitenstamm oder mehrere zu finden. Das liegt an der limitierten Sensitivität von nPCR (Hosch 2020a). Aus diesem Grund gab es für diese Proben keine Bande auf dem Gel, da keine Parasitenstämme mit den Allelen visualisiert werden konnten. Es sind wenig Personen über 15 Jahren unter den Probanden vertreten, weshalb für diese Altersgruppe weniger Resultate vorhanden sind als für die Altersgruppe der unter 15-Jährigen. Die Zahl der Proben war generell für die Berechnung der Signifikanz kaum ausreichend gross genug, weshalb keine statistischen Aussagen gemacht werden konnten. Beim Verdoppeln der Zahlen wurde jedoch deutlich, dass bei Ergebnissen, bei welchen Tendenzen erkennbar sind, z.T. eine Signifikanz bestehen würde. Es ist daher anzunehmen, dass diese Tendenzen der Realität entsprechen könnten. Vorteile von RDTs sind, dass nur ein Fingerstich nötig ist. Sie sind zudem so konzipiert, dass ihr Kunststoffgehäuse Kontaminationen zwischen den Proben verhindert und eine optimale Lagerung bei Raumtemperatur ermöglicht (Robinson et al. 2019). Ein Nachteil ist, dass nur eine geringe Blutmenge aufgenommen

werden kann und damit auch nur begrenzt DNA-Material (Hosch 2020). RDT-Proben eignen sich gut für eine PCR (ENAR protocol, Guirou et al. 2020).

Für die Genotypisierung wurde die Methode der nPCR verwendet. Für die vorhandene kleine Menge an DNA-Material in den Proben ist die nPCR gut geeignet, da bei diesen Verfahren zwei PCRs nacheinander folgen. Zudem ist die nPCR ein ausreichend sensitives Verfahren, weshalb gute Resultate erzielt wurden. Aus den Gelbildern wird deutlich, dass die Amplifikation temperaturabhängig ist. Bei höheren Temperaturen binden die Primer spezifischer. Bei tieferen besteht das Risiko, dass an einer falschen Stelle im Genom (mit ähnlicher Sequenz) DNA amplifiziert wird (Hosch 2020a). Während der Annealing-Phase binden die Primer an die DNA-Stränge. Das Bindungsverhalten der Primer verändert sich, sobald die Temperatur leicht erhöht oder erniedrigt wird. Wenn die Temperatur für die Primer nicht optimal ist, binden diese «falsch», binden gar nicht oder binden nicht genug stark an den DNA-Strang. Das konnte bei den Gelbildern gut festgestellt werden, da bei einigen Bildern PCR-Produkte als Banden auf dem Gel zu sehen waren und bei einigen nicht, sobald die Temperatur verändert wurde. Die Amplifikation für *msp1* ist bei einer Annealing-Temperatur von 56° C optimal, da es wenig unspezifische Amplifikationen gibt. Dafür ist bei 58°C wenig PCR-Produkt vorhanden. Für die Amplifikation für *msp2* ist die Annealing-Temperatur von 58° C optimal. Die nPCR wurde aus diesem Grund für einige Proben angepasst und wiederholt. Wenn z.B. bei einer Annealing-Temperatur von 56° C die Amplifikation des *msp2* Allels FC27 nicht funktionierte, dann wurde sie auf die optimalere Temperatur von 58° C angepasst. Damit die DNA-Proben ausgewertet und nach Allelen unterschieden werden können, wurde die Agarose-Gelelektrophorese für die Genotypisierung angewendet. Es braucht eine bestimmte Menge an PCR-Produkt, damit diese auf dem Gel zu sehen sind. Für elf Proben funktionierte deshalb die Gelelektrophorese nicht. Diese RDT-Proben hatten wenig Parasiten im Blut und somit wenig DNA-Material, sodass trotz Amplifikation die Menge an PCR-Produkten für eine Visualisierung ihrer Allele auf dem Gel zu gering waren.

## 4.2 Resultate

Die Resultate der Laborarbeit zeigen, dass für *msp1* die nPCR zu 89% und für *msp2* zu 86% von den 36 Proben, die amplifiziert werden konnten, erfolgreich war. Gesamthaft kommt K1 (75%) am häufigsten vor (Tab. 3.1). Die multiklonalen Infektionen für *msp1* treten überwiegend kombiniert mit dem Alleltyp K1 auf. Die Ergebnisse entsprechen zum Teil denen von Chen et al. (2018): Innerhalb ihrer Studie wurden 181 Patienten aus Bioko Island mit milden Symptomen untersucht. Das Alter dieser Patienten erstreckt sich von unter fünf bis über 40 Jahre. Die nPCR funktionierte zu 98% für *msp1* und zu 96% für *msp2*. MAD20 mit 98% und K1 mit 96% kommen am häufigsten vor. Diese beiden Alleltypen dominieren auch bei den multiklonalen Infektionen für *msp1*. Zudem

ist die Anzahl der Dreifachkombinationen zwischen K1, MAD20 und RO33 viel grösser. Tabelle 3.2 dieser Arbeit veranschaulicht, dass für *msp2* gesamthaft 3D7/IC (61%) dominiert. Hingegen kommt bei Chen *msp2*FC27 mit 98% häufiger als 3D7/IC mit 72% vor. Es gibt für *msp2* ebenfalls viel mehr multiklonale Infektionen.

Eine andere Studie wurde von Guerra et al. (2006) veröffentlicht: 1998 wurden 96 Proben, ebenfalls von asymptomatischen Personen, gesammelt. Mit diesen Proben wurden auf Bioko Island erstmals Daten über die genetische Diversität von *msp1* und *msp2* von *Plasmodium falciparum* erfasst. Die Probanden waren zehn Jahre alt oder jünger. In ihrer Studie war K1 ebenfalls gesamthaft am häufigsten vertreten. Dies unterscheidet sich von Chens Studie, jedoch postuliert Chen, dass die Häufigkeit von MAD20 in den Jahren zwischen 1998 und 2014 deutlich gestiegen sei. Chen vermutet, dass dieser Unterschied aufgrund der unterschiedlichen Gruppe untersuchter Personen (asymptomatischer versus symptomatischer) bestände. Die Daten von Guerra entsprechen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Dies liegt wahrscheinlich daran (wie auch Chens Vermutung), dass Guerra ebenfalls asymptomatische Probanden untersucht hat.

#### 4.2.1 Altersgruppenvergleich bezüglich der Genotypenanzahl

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Ähnlichkeiten bei der MOI mit denen von Chen et al. (2018), da Kinder und Jugendliche von 5-19 Jahren den höchsten Wert haben. Bei Chen war dies signifikant. In dieser Altersgruppe besteht ein Peak des MOI-Werts (Olasehinde et al. 2012, Owusu et al. 2002, Smith et al. 1999). Bei den 5 bis 14-Jährigen gibt es ebenfalls ein Peak bei den multiklonalen Infektionen. Im Gegensatz dazu sinkt die MOI bei Guerra et al. (2006) bei Kindern ab 5 Jahren. In der Studie von Konate et al. (1999) in Senegal ist der MOI-Peak bei Kindern zwischen 5 bis 9 Jahren, danach nimmt die MOI mit steigendem Alter ab (Guerra et al. 2006, Yavo et al. 2016). Es ist anzunehmen, dass dies von der erworbenen klinischen Immunität gegen *Plasmodium falciparum* durch wiederholte Infektionen beeinflusst wird. In Diagramm 3.5 ist dementsprechend kein deutlicher Zusammenhang zu erkennen. Bei Guerra ist bei den unter 5-Jährigen die Gesamt-MOI vom 2,44 am höchsten. In Tabelle 3.1 beträgt die Gesamt-MOI dieser Altersgruppe 1,67. Der MOI-Wert zeigt einen leichten Rückgang bei der vorherrschenden Genotypenanzahl: Die MOI bei den unter 5-Jährigen ist in einem Zeitraum von 20 Jahren nur leicht gesunken, was überraschend ist, da durch das BIMCP die Malariaprävalenz deutlich abnahm. Im Rahmen des BIMCP wurden imprägnierte Schlafnetze verteilt und die Häuser mit Insektiziden gesprayed, daher gab es weniger Mückenstiche und Mücken konnten weniger Malariaparasiten aufnehmen. Die Gruppe der unter 5-Jährigen ist klinisch die wichtigste Altersgruppe, da vor allem Kleinkinder an der schweren Form von Malaria erkranken.

Bei Patientinnen und Patienten in derselben Altersgruppe beträgt die Gesamt-MOI 5,17 (Chen et al. 2018). Bei asymptomatischen Personen liegt der Wert um 1,8 (vorliegende

Arbeit) respektive 2 (Guerra), während er bei symptomatischen Patienten zwischen 5 und 6 liegt. Die Untersuchungen von Aubouy et al. (2003) zeigen, dass die Parasitendichte und das Alter nicht mit der MOI zusammenhängen; ebenso bei Brice et al. (2019) und Ogouyèmi et al. (2013). Dies scheint den vorhergehenden Ergebnissen zu widersprechen. Es ist jedoch anzumerken, dass in den untersuchten Proben dieser Arbeit die Blutmenge klein und dadurch auch die Parasitenkonzentration relativ tief war. Es konnten deshalb nur die häufigsten Parasitenstämme erwischt werden. Die Probanden waren wahrscheinlich mit mehr verschiedenen Stämmen infiziert, aber in zu geringer Dichte. Sie konnten deshalb nicht detektiert werden (Hosch 2020). Die Proben zeigen einen relativ hohen MOI-Wert bei den über 15-Jährigen, da bei einem Probanden ein MOI-Wert von 5 gefunden wurde und die Anzahl der Probanden in dieser Altersgruppe klein ist. Das könnte eine Verzerrung verursacht haben. In den Studien wird stärker auf den MOI-Wert fokussiert als auf die einzelnen mono- und multiklonalen Infektionen. Aus diesem Grund konnten dazu keine direkten Vergleiche angestellt werden. Es ist aber auffällig, dass es bei den 5- bis 14-Jährigen ein Höchstwert für multiklonale Infektionen gibt, verglichen mit monoklonalen Infektionen (12:9) (Diagr.3.3a).

#### **4.2.2 Genetische Diversität in Abhängigkeit von den Basenpaarlängen**

Für *msp1* wurden 13 verschiedene Allele mit unterschiedlichen Basenpaarlängen gefunden: sechs für K1, fünf für MAD20 und zwei für RO33. Für *msp2* gibt es 12 verschiedene Allele: sieben für 3D7/IC und fünf für FC27. Die Diversität bei *msp1* und *msp2* ist fast gleich gross. Bei Chen et al. (2018) gibt es insgesamt 26 verschiedene *msp1* Allele: neun für K1, neun für MAD20 und acht für RO33. Für *msp2* gibt es 25 Allele: 20 für 3D7/IC und fünf für FC27. Die Allelzahl von 5 für FC27 entspricht jenen dieser Arbeit. Die Diversität bei ihren Proben ist deutlich grösser. Das liegt wahrscheinlich einerseits an den viel höheren Anzahl Proben und andererseits an der Auswahl Probanden (bei Chen sind sie symptomatisch). In der Studie von Guerra et al. (2006) sind 16 verschiedene Allele für *msp1* gefunden worden: eines für RO33, neun für K1 und sechs für MAD20. Für *msp2* fanden sie acht Allele. Das sind gesamthaft 24 Allele für 96 Proben, also praktisch gleich viele wie für die erfolgreich untersuchten 36 RDT-Proben (25 Allele). Bei den Ergebnissen dieser Arbeit und den erwähnten Bioko-Studien zeigt sich ein erkennbares Muster, da vor allem für K1 die grösste Diversität zu sehen ist, nah gefolgt von MAD20. RO33 zeigt für *msp1* die kleinste Diversität. Das ist auch bei anderen Studien aus Nachbarländern wie Gabon (Yavo et al. 2016), Kamerun (Metoh et al. 2020), Nigeria (Oyebola et al. 2014), der Republik Kongo (Brice et al. 2019) und auf der Nachbarsinsel Annobon (Cano et al. 2007) der Fall. Die Studie von Wanji et al. (2012) von asymptomatischen Kindern aus Kamerun zeigt eine andere Verteilung, da MAD20 mit 69 Alleltypen die grösste Diversität aufweist, gefolgt von RO33 mit 50 Allelen und schliesslich K1 mit 32 Allelen. Bei Ogouyèmi et al. (2013) mit sympto-

matischen Kindern kommt RO33 auch sehr häufig vor. In einer anderen Studie aus Kamerun wurden asymptomatische und symptomatische Personen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass bei asymptomatischen Personen K1 häufiger auftritt als bei symptomatischen (Apinjoh et al. 2015). Aus den oben erwähnten Studien folgt, dass es keine einheitliche Allelverteilung gibt. Es besteht eine breite Diversität hinsichtlich des Vorkommens der *msp1*-Alleltypen bei *Plasmodium falciparum* (Funwei et al. 2018). Die Resultate der vorliegenden Laborarbeit zeigen, dass für *msp2* das Allel 3D7/IC am häufigsten vorkommt. Das entspricht den Daten Chens et al. (2018). Von den Studien aus den Nachbarländern gibt es einige, die ein ähnliches Ergebnis für *msp2* aufweisen (Metoh et al. 2020, Yavo et al. 2016), während bei den anderen Arbeiten das Allel FC27 prädominant ist (Oyebola et al. 2014, Ogouyèmi et al. 2013). In Tabelle 3.3 ist zu sehen, dass *msp1* praktisch gleich viele Allele wie *msp2* hat. Bei Chen ist es ebenfalls ausgeglichen, im Gegensatz zu Guerra (viel mehr Allele für *msp1*). Vergleiche mit den Nachbarländern ergab, dass bei Kindern mit unkomplizierter Malaria aus Gabon für *msp1* 25 verschiedene Allele und für *msp2* 19 Allele gefunden wurden (Aubouy et al. 2003). Bei Kindern aus der Republik Kongo, ebenfalls mit unkomplizierter Malaria, wurden 13 verschiedene Allele für *msp1* und 27 Allele für *msp2* gefunden (Brice et al. 2019). In der Studie von Ogouyèmi et al. (2013), auch mit Kindern mit unkomplizierter Malaria, gibt es für *msp2* etwas mehr Allele (28) als für *msp1* (25). Zusammengefasst aus den obigen Studien wird deutlich, dass nicht klar gesagt werden, für welches Gen, ob für *msp1* oder *msp2*, eine grössere Diversität herrscht.

#### 4.2.3 Parasitendichte und Genotyp

Von den 47 Proben ist die durchschnittliche Parasitendichte 281 Parasiten/ $\mu$ l und die Spannbreite liegt zwischen 17 und 6'282 Parasiten/ $\mu$ l. Bei Guerra et al. (2006) ist diese relativ gross, denn sie erstreckt sich von 40 bis 63'380 Parasiten/ $\mu$ l. Von den 96 Proben sind vier über 1'000 Parasiten/ $\mu$ l. Die durchschnittliche Parasitendichte in der Studie von Chen et al. (2018) mit symptomatischen Patientinnen und Patienten beträgt 64'800 Parasiten/ $\mu$ l und die Spannbreite ist ziemlich gross, denn sie liegt bei 420 bis 816'300 Parasiten/ $\mu$ l. Es besteht bei Guerra und Chen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Parasitendichte und Anzahl Genotypen. In den Tabellen 3.4a und 3.4b ist ebenso eine Tendenz hierfür erkennbar. Jedoch hängt in den Studien von Brice et al. (2019), Aubouy et al. (2013) und Ogouyèmi et al. (2013) die Parasitendichte nicht mit der MOI zusammen.

#### 4.2.4 Vergleich von Nord- und Südprovinz

In dieser Arbeit wurden die vier Regionen auf Bioko Island (Baney, Luba, Malabo und Riaba) auf eine Nord- und eine Südprovinz aufgeteilt, damit der Norden (Malabo+Baney) mit dem Süden (Luba+Riaba) verglichen werden konnte. Durch diese

Unterteilung sind auch Vergleiche mit Guerra et al. (2006) möglich. Die Proben von Probanden, welche aus Bioko Norte stammen, sind zu 76% positiv für *msh1* und/oder *msh2* getestet worden. In Bioko Sur sind die Proben zu 78% positiv. In Guerras Studie waren in den nördlichen Dörfern (Bareso+Sacriba) 55-79% positiv. Im südlichen Dorf Ureka waren es 66%. Das zeigt, dass für die 47 Proben vergleichsweise eine relativ hohe erfolgreiche Amplifikationsrate erreicht wurde. Es gibt Unterschiede bei der Genotypverteilung im Norden und Süden: Tabelle 3.3 zeigt, dass für *msh1* im Norden mehr multiklonale Infektionen vorherrschen als im Süden. Im Süden ist die Anzahl multiklonale Infektionen für *msh1* und *msh2* ausgeglichen. Dies ist ungleich Guerras Ergebnissen, da im Süden für *msh2* am meisten multiklonale Infektionen gefunden wurden. Das kann unter anderem daran liegen, dass die hier untersuchten Probandenzahl im Süden im Gegensatz zu Guerra viel kleiner war.

Im Süden ist das Verhältnis zwischen multi- und monoklonalen Infektionen (5:2) unausgeglichen, da es mehr multiklonale Infektionen gibt, im Gegensatz zum Norden, wo das Verhältnis ausgeglichen ist (Diagramm 3.3b) (15:14).

## 5 Schlussfolgerung

Molekulare Marker wie *msp1* und *msp2* ermöglichen es herauszufinden, welche und wie viele Parasitenstämme in einem endemischen Gebiet vorhanden sind. Sie helfen zu verstehen, wie sich die genetische Diversität vom Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* verändert und welche Präventions- und Kontrollmassnahmen effektiv sind. Eine abnehmende genetische Diversität bedeutet gleichzeitig eine Transmissionsabnahme und ist ein weiterer Schritt in Richtung Malaria Eradication (Ausrottung).

Bei Untersuchungen zu Malaria ist es wichtig, dass asymptomatische Probanden miteinbezogen werden, da sie wichtige Reservoirs für Malariaparasiten bilden und damit auch die Transmission erhöhen. In Hinblick auf eine Malaria Eradication ist es notwendig, dass Malariakontrollprogramme wie das BIMCP auch weiterhin in abgelegenen Gebieten wie Bioko Island durchgeführt werden. Bioko Island als «geschlossenes System» hat dennoch Austausch mit dem Festland von Äquatorialguinea, wo die Malariaprävalenz deutlich höher ist.

Die Resultate der Arbeit zeigen, dass in allen Altersgruppen für *msp1* K1 prädominant ist, während für *msp2* überwiegend 3D7/IC auftritt. Das gilt auch für Bioko Norte und Bioko Sur. Bei den über 5-Jährigen sowie in der Nordprovinz wurden mehr Alleltypen gefunden. Auf Bioko Island sind die multiklonalen Infektionen in der Mehrzahl. Bei den 5- bis 14-Jährigen gibt es mehr multiklonale Infektionen im Vergleich zu monoklonalen Infektionen. In der Südprovinz treten ebenfalls deutlich mehr multiklonale Infektionen auf. In der Nordprovinz sind die multiklonalen Infektionen meist an den diversen *msp1*-Allelen erkennbar. Im Süden ist die Anzahl multiklonaler Infektionen mit *msp2*- und *msp1*-Allelen ziemlich ausgeglichen. Die Gesamt-MOI steigt mit dem Alter und ist im Süden höher. Die Resultate sind jedoch nicht signifikant, da die Anzahl Probanden in den Altersgruppen und den beiden Provinzen unterschiedlich gross ist, zudem ist die Probenanzahl ziemlich klein. Die Gesamt-MOI liegt bei 1,8. Das bedeutet, dass weiterhin Programme zur Malariabekämpfung fortgesetzt werden müssen. Hierfür ist die regelmässige Genotypisierung von molekularen Markern wie *msp1* und *msp2* wichtig, da sie entscheidende Informationen über die genetische Diversität liefert.

## Schlusswort

Das Thema Malaria ist sehr umfangreich und komplex, dies wurde mir erst während des Arbeitsprozesses wirklich bewusst. Ich tastete mich an das neue Thema heran, indem ich den von Frau Bandi empfohlenen Malaria Onlinekurs belegte. Dieser war zeitintensiv und erstreckte sich über acht Wochen. Der Kurs war sehr interessant und ermöglichte mir, einen guten Überblick über das Thema zu erlangen. So konnte ich mir ein grobes Bild davon machen, wie ich meine Arbeit strukturieren könnte und welche Themen dabei wichtig sind. Der Kurs war jedoch vom Stoffumfang her ziemlich ausführlich, dennoch konnte ich viele Themen in die Arbeit miteinbeziehen.

Ich durfte eine zehntägige Laborarbeit am Swiss TPH durchführen und dabei 50 RDT-Proben untersuchen. Als Laborneuling war ich stark absorbiert von der Menge an neuem Lernstoff. Alleine das Nachführen des Laborprotokolls kostete viel Zeit.

Für die Auswertung und Darstellung der Resultate, die Zusammenstellung der wissenschaftlichen Tabellen und die Diskussion habe ich mich an der Masterarbeit von Salome Hosch (2020) und den Publikationen von Chen et al. (2018) und Guerra et al. (2006) orientiert – beide Artikel behandeln ebenfalls das Thema genetische Diversität von *Plasmodium falciparum* auf Bioko Island.

Eine intensive Betreuung war notwendig, um die vorliegende Arbeit realisieren zu können. Ich wurde bei verschiedensten Arbeitsschritten begleitet und angeleitet, dadurch wusste ich immer, was als nächstes getan werden musste.

Diese Maturaarbeit war hochinteressant, aber sie bedeutete zugleich grossen Stress. Seit April war ich mit ihr beschäftigt. Ich hatte in meiner Begeisterung den Umfang dieser Arbeit merklich unterschätzt. Ich bin aber sehr froh, es doch geschafft zu haben. Dank dieser Arbeit habe ich sehr viel über Malaria, Genetik, die Durchführung einer praktischen Laborarbeit, das Schreiben einer wissenschaftlichen Arbeit sowie über mich selbst gelernt.

## Abkürzungen

<b>BIMCP</b>	Bioko Island Malaria Control Project
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>DALY</b>	Disability Adjusted Life Years
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic Acid
<b>ENAR</b>	Extraction of Nucleic Acids from used RDTs
<b>FC27</b>	<i>msp2</i> Allel
<b>FCFP</b>	FC27-F-Primer
<b>FCRP</b>	FC27-R-Primer
<b>FP</b>	Forward Primer
<b>F-Primer</b>	Forward Primer
<b>GE</b>	Gelelektrophorese
<b>GTS</b>	Global Technical Strategy
<b>hpr2</b>	histidine-rich protein 2
<b>hpr3</b>	histidine-rich protein 3
<b>ICFP</b>	3D7/IC-F-Primer
<b>ICR</b>	3D7/IC-R-Primer
<b>IFP</b>	Inner Forward Primer
<b>IP</b>	Inner Primer
<b>IRP</b>	Inner Reverse Primer
<b>IRS</b>	Indoor Residual Spraying
<b>ITN</b>	Insecticide-Treated Nets
<b>K1</b>	<i>msp1</i> Allel
<b>KFP</b>	K1-Forward-Primer
<b>KRP</b>	K1-Reverse-Primer
<b>MAD20</b>	<i>msp1</i> Allel
<b>MFP</b>	MAD20-F Primer
<b>MIS</b>	Malaria Indicator Survey
<b>MOI</b>	Multiplicity Of Infection
<b>MRP</b>	MAD20-R-Primer
<b><i>msp1</i></b>	<i>merozoite surface protein 1</i>
<b><i>msp2</i></b>	<i>merozoite surface protein 2</i>
<b>NF54</b>	ein bestimmter Stamm von <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>nPCR</b>	nested PCR
<b>NTC</b>	Non Template Control, Negativkontrolle
<b>OFFP</b>	Outer Forward Primer
<b>OP</b>	Outer Primer
<b>ORP</b>	Outer Reverse Primer
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
<b>PfHRPII</b>	Histidine-rich protein II

<b>pLDH</b>	parasite Lactate Dehydrogenase
<b>qPCR</b>	Real Time Quantitative PCR
<b>RDT</b>	Malaria Rapid Diagnostic Test
<b>RFP</b>	RO33-F Primer
<b>RO33</b>	<i>msp1</i> Allel
<b>RP</b>	Reverse Primer
<b>R-Primer</b>	Reverse Primer
<b>RRP</b>	RO33-R-Primer
<b>RTS,S</b>	Malaria-Impfstoff gegen Sporozoiten von <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>Swiss TPH</b>	Swiss Tropical and Public Health Institute, Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut
<b>TBE</b>	Tris/Borate/EDTA (Ethylendiamintetraazetat)
<b>WHO</b>	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
<b>3d7/IC</b>	<i>msp2</i> Allel

## Abbildungsverzeichnis

Titelbild: Wirth, Dyann: Module 2: The Biology of Malaria: Chapter 2: The Parasite Life Cycle in Detail, PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, 2020

Abbildung 1.1: Malaria-Ausbreitung um 1900 (Quelle: learning.edx 2020)

Abbildung 1.2: Möglicher Lebensraum für *Plasmodium falciparum* bezüglich Temperatureignung, 2010 (Quelle: malariaatlas 2020)

Abbildung 1.3: Weltweit neu auftretende Malariafälle durch *Plasmodium falciparum*, 2000-2017 (Quelle: malariaatlas 2020)

Abbildung 1.4: *Plasmodium falciparum*-Prävalenz bei Kindern zwischen 2 und 10 Jahren, 2017 (Quelle: (Malaria Atlas Project 2020)

Abbildung 1.5: Merozoiten-Freisetzung aus einem reifen Schizonten (Ausschnitt, Quelle: image-bank.hematology 2020)

Abbildung 1.6: Plasmodien-Lebenszyklus (Quelle: Centers for Disease Control and Prevention 2019, Wikipedia 2020)

Abbildung 1.7: Zwei Malariaschnelltests von Untersuchten auf Bioko Island (Quelle: Foto Koranan Blöchliger)

Abbildung 1.8: Merozoiten-Oberflächenproteine *msp1* und *msp2* von *Plasmodium falciparum* (Quelle: Cowman et al. 2000)

Abbildung 1.9: Lage sowie Karte von Bioko Island

Abbildung 1.10: Malaria-Prävalenz *Plasmodium falciparum* auf Bioko Island (Quelle: Salome Hosch 2020)

Abbildung 2.1: Verfahren der nPCR (Quelle: Labor Gärtner 2020)

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zur Wasserstoffbrücken-Trennung zwischen den Primer

Abbildung 2.3: OP für *msp1* und *msp2*

Abbildung 2.4: Steriler Arbeitsplatz, in welchem die Mastermixe hergestellt werden

Abbildung 2.5: *msp1* und *msp2* 12er Tube Strips gefüllt mit den Mastermixen

Abbildung 2.6: Zwei von sechs Mikrotiterplatten, von denen die 10 DNA-Proben entnommen werden

Abbildung 2.7: NF54 (Positiv-Kontrolle)

Abbildung 2.8: Thermocycler, in welcher die DNA-Proben für die PCR amplifiziert werden

Abbildung 2.9: Allelspezifische Primer mit HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Abbildung 2.10: 5 Tubes mit den Mastermixen und allelspezifischen Primer

Abbildung 2.11: Rote Box mit Tube Strips, die mit den verschiedenen Mastermixen gefüllt sind für die 2.PCR und Tube Strips mit den PCR-Produkten aus der 1.PCR

Abbildung 2.12: Mit einem 12-Pipettenhalter werden Mastermixe mit den PCR-Produkten vermischt

Abbildung 2.13: Gelelektrophorese-Gestelle

Abbildung 2.14: Pipette mit Beladungsbuffer

Abbildung 2.15: Gel wird beladen

Abbildung 2.16: Gel im GelRed-Bad

Abbildung 2.17: ST5 Gel Documentation System

Abbildung 2.18: Ausgedrucktes Gelbild mit Banden für *msp2* 2d7/IC und FC27

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Mastermix-Berechnungen

Tabelle 2.2: PCR-Programmierungen

Tabelle 3.1: Genetische Diversität von *Plasmodium falciparum msp1* und *msp2* innerhalb verschiedener Altersgruppen

Tabelle 3.2: Genetische Diversität von *Plasmodium falciparum msp1* und *msp2* in der Nord- und Südprovinz

Tabelle 3.3: Für *msp1/msp2* identifizierte Allele nach Altersgruppen, Provinzen und Anzahl Basenpaarlängen

Tabelle 3.4a: Anzahl Genotypen für *msp1* und *msp2* in Abhängigkeit von der Parasitendichte

Tabelle 3.4b: Anzahl Genotypen für *msp1* und *msp2* in Abhängigkeit von der Parasitendichte

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 3.1a-c: Allelverteilung *msp1* K1, MAD20, RO33

Diagramm 3.2a und b: Allelverteilung *msp2* 3d7/IC und FC27

Diagramm 3.3a: Verteilung monoklonale und multiklonale Isolate in Altersgruppen

Diagramm 3.3b: Verteilung monoklonale und multiklonale Isolate in den Provinzen Bioko Norte und Bioko Sur

Diagramm 3.4: Parasitendichte in Abhängigkeit vom Alter

Diagramm 3.5: Anzahl Genotypen für *msp1* und *msp2* in Abhängigkeit vom Alter

Diagramm 3.6: Parasitendichte in Abhängigkeit von der Anzahl Genotypen (Darstellung von Salome Hosch 2020)

## Referenzen

### Artikel und Arbeiten

Aubouy, Agnès, Florence Migot-Nabias, Philippe Deloron: Polymorphism in two merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon, in: Malaria Journal, 2:12, 2003

Apinjoh, Tobias O., Rolland B. Tata, Judith K. Anchang-Kimbi, Hanesh F. Chi, Eleanor M. Fon, Regina N. Mugri, Delphine A. Tangoh, Robert V. Nyingchu, Stephen M. Ghogomu, Theresa Nkuo-Akenji, Eric A. Achidi: *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 block 2 gene polymorphism in field isolates along the slope of mount Cameroon: a cross-sectional study, in: BMC Infectious Diseases, 2015, 15:309

Ashley, Elizabeth A., Aung Pyae Phy, Charles J. Woodrow: Malaria, in: The Lancet, 2018, 391 (10130), 1608-1621

Baird, J. K.: Age-Dependent Characteristics of Protection V. Susceptibility to *Plasmodium Falciparum*, in: Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1998, 92 (4), 367–390

Beshir, KB., N. Diallo, CJ. Sutherland: Identifying recrudescence *Plasmodium falciparum* in treated malaria patients by real-time PCR and high resolution melt analysis of genetic diversity, in: Scientific Reports, 2018, 8:10097

Bhatt, S., D. J. Weiss, E. Cameron, D. Bisanzio, B. Mappin, U. Dalrymple, K. E. Battle, et al.: The Effect of Malaria Control on *Plasmodium Falciparum* in Africa Between 2000 and 2015, in: Nature, 2015, 526 (7572), 207–211

Brice, Pembet Singana, Pembe Issamou Mayengue, Fabien Niama Roch, Mathieu Ndounga: Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection among children with uncomplicated malaria living in Pointe-Noire, Republic of Congo, in: Pan African Medical Journal, 2019, 32:183

Buffet, Pierre A., Innocent Safeukui, Guillaume Deplaine, Valentine Brousse, Virginie Prendki, Marc Thellier, Gareth D. Turner, Odile Mercereau-Puijalon: The Pathogenesis of *Plasmodium Falciparum* Malaria in Humans: Insights from Splenic Physiology, in: Blood, 2011, 117 (2), 381–392

Cano, Jorge, Pedro Berzosa, Aida de Lucio, Migual Angel Descalzo, Leonardo, Bobuakasi, Sisinio Nzambo, Melchor Ondo, Jesus N. Buatiche, Gloria Nseng, Agustin Benito: Transmission of malaria and genotypic variability of *Plasmodium falciparum* on the Island of Annobon (Equatorial Guinea), in: Malaria Journal, 2007, 6:141

Chen, Jiang-Tao, Jian Li, Guang-Cai Zha, Guang Huang, Zhi-Xiu Huang, Dong-De Xie, Xia Zhou, Huan-Tong Mo, Juan Urbano Monsuy Eyi, Rocio Apicante Matesa, Maximo Miko Ondo Obono, Shan Li, Xiang-Zhi Liu, Min Lin: Genetic diversity and allele frequencies of *Plasmodium falciparum msp1* and *msp2* in parasite isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea, in: Malaria Journal, 2018, 17:458

Conway, David J.: Molecular Epidemiology of Malaria, in: Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20 (1), 188–204

Cook, Jackie, Dianna Hergott, Wonder Phiri, Matilde Riloha Rivas, John Bradley, Luis Segora, Guillermo Garcia, Chris Schwabe, Immo Kleinschmidt: Trends in parasite prevalence following 13 years of malaria interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea: 2004-2016, in: Malaria Journal, 2018, 17:62

Cowman, Alan F., Deborah L. Baldi, Julie Healer, Kerry E. Mills, Rebecca A. O'Donnell, Michael B. Reed, Tony Triglia, Mark E. Wickham, Brendan S. Crabb: Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells, in: FEBS Letters, 2000, 476, 84-88

Ferreira, MU. und Hartl, DL.: *Plasmodium falciparum*: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (*MSP-2*), in: Experimental Parasitology, 2007, 115 (1), 32–40

Funwei, Roland I., Bolaji N. Thomas, Catherine O. Falade, Olusola Ojurongbe: Extensive diversity in the allelic frequency of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins and glutamate-rich protein in rural and urban settings of southwestern Nigeria, in: Malaria Journal, 2018, 17:1

Gray, Julian C., Patrick H. Corran, Elena Mangia, Michael W. Gaunt, Qiuxiang Li, Kevin K. A. Tetteh, Spencer D. Polley, et al.: Profiling the Antibody Immune Response Against Blood Stage Malaria Vaccine Candidates, in: Clinical Chemistry, 2007, 53 (7), 1244–1253

Grobusch, M.P., und Kremser, P.G.: Uncomplicated Malari, in: *Malaria: Drugs, Disease and Post-Genomic Biology*, herausgegeben von: R. W. Compans, M. D. Cooper, T. Honjo, H. Koprowski, F. Melchers, M. B. A. Oldstone, S. Olsnes, et al., 81–104, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005

Guerra-Neira, Ana, José M. Rubio, Jesus Roche Royo, Jorge Cano Ortega, Antonio Sarrion Aunon, Pedro Berzosa Diaz, Austin Benito Llanes: *Plasmodium* diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa), in: *International Journal of Health Geographics*, 2006, 5:27

Guerra Carlos A., Godwin Fuseini, Olivier Tresor Donfack, Jordan M. Smith, Teresa Avingono Ondo Mifumu, Gninoussa Akadiri, Delicias Esono Mba Eyang, Consuelo Oki Ehuri, Liberato Motobe Vaz, Victor Mba Micha, Leonor Ada Okenve, Christopher R. Janes, Ramona Mba Andeme, Matilde Riloha Rivas, Wonder P. Phiri, Michel A. Slotman, David L. Smith, Guillermo A. García: Malaria outbreak in Riaba district, Bioko Island: lessons learned, in: *Malaria Journal*, 2020, Vol. 19, Artikelnr. 277

Guirou, Etienne A., Tobias Schindler, Salome Hosch, Olivier Tresor Donfack, Charlene Aya Yoboue, Silvan Krähenbühl, Anna Deal, Glenda Cosi, Linda Gondwe, Grace Mwangoka, Heavenlight Masuki, Nahya Salim, Maxmillian Mpina, Jongo Said, Salim Abdulla, Stephen L. Hoffman, Bonifacio Manguire Nlavo, Carl Maas, Carlos Cortes Falla, Wonder P. Phiri, Guillermo A. Garcia, Marcel Tanner, Claudia Daubenberger: Molecular malaria surveillance using a novel protocol for extraction and analysis of nucleic acids retained on used rapid diagnostic tests, in: *Scientific Reports*, 2020, 10, Artikelnummer. 12305

Gupta, Himanshu, Gloria Matambisso, Beatriz Galatas, Pau Cisteró, Lidia Nhamussua, Wilson Simone, Jane Cunningham, et al.: Molecular Surveillance of Pfh<sub>rp</sub>2 and Pfh<sub>rp</sub>3 Deletions in *Plasmodium Falciparum* Isolates from Mozambique, in: *Malaria Journal*, 2017, 16 (October)

Hamid, Muzamil Mahdi Abdel, Arwa F. Elamin, Musab M. Ali Albsheer, Abdelmohaymin A. A. Abdalla, Nouh S. Mahgoub, Shaza O. Mustafa, Mohamed Siddig Elatayeb Muneer, Mutaz Amin: Multiplicity of infection and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from patients with uncomplicated and severe malaria in Gezira Stat, Sudan, in: *Parasites Vectors*, 2016, 9:362

Holder, AA., und Blackman, MJ.: What is the function of *MSP-1* on the malaria merozoite? in: *Parasitology Today*, 1994, 10, 182–184

Hosch, Salome: Molecular characterization of *Plasmodium* ssp. Prevalence and investigation of *k13* mutants and *hrp2/hrp3* gene deletion carrying *P. falciparum* on Bioko Island, Master in Infection Biology. Swiss Tropical and Public Health Institute, Department of Medical Parasitology and Infection Biology, University of Basel, 2020

Kleinschmidt, Immo, Brian Sharp, Luis E. Benavente, Chris Schwabe, Miguel Torrez, Jaime Kuklinski, Natasha Morris, Jaishree Raman, and Joseph Carter: Reduction in Infection with *Plasmodium Falciparum* One Year After the Introduction of Malaria Control Interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea, in: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2006, 74 (6): 972–78

Kleinschmidt, Immo, Christopher Schwabe, Luis Benavente, Miguel Torrez, Frances C. Ridl, Jose Luis Segura, Paul Ehmer, and Gloria Nseng Nchama: Marked Increase in Child Survival After Four Years of Intensive Malaria Control, in: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2009, 80 (6): 882–888

Konate, L., J. Zwetyenga, C. Rogier, E. Bischoff, D. Fontenille, A. Tall, A. Spiegel, J.-F. Trape, O. Mercereau-Puijalon: Variation of *Plasmodium falciparum* *msp1* block 2 and *msp2* allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions, in: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1999, 93(S1):21-28

Kwenti, TE., AL. Moye, AB. Wiylynyuy, LA. Njunda, T. Nkuo-Akenji: Variation in the immune responses against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and apical membrane antigen-1 in children residing in the different epidemiological strata of malaria in Cameroon, in: Malaria Journal, 2017, 16:453

Marsh, K. und Kinyanjui, S.: Immune Effector Mechanisms in Malaria, in: Parasite Immunology, 2006, 28 (1-2), 51–60

Mawili-Mboumba, Denise Patricia, Noé Mbondoukwe, Elvire Adande, Marielle Karine Bouyou-Akotet: Allelic Diveristy of *MSP1* Gene in *Plasmodium falciparum* from Rural and Urban Areas of Gabon, in: Korean Journal of Parasitology, 2013, Vol. 53, No. 4, 413-419

Mayor, Alfredo, Azucena Bardají, Eusebio Macete, Tacilta Nhampossa, Ana Maria Fonseca, Raquel González, Sonia Maculuve et al.: Changing Trends in *P. Falciparum* Burden, Immunity, and Disease in Pregnancy, in: The New England Journal of Medicine, 2015, 373 (17), 1607-1617

Metoh, Theresia Njuabe, Ju-Hu Chen, Philip Fon-Gah, Xia Zhou, Roger Moyou-Somo, Xiao-Nong Zhou: Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and genetic profile in children affected by uncomplicated malaria in Cameroon, in: *Malaria Journal*, 2020, 19:155

Meyers, Jacob I., Sharmila Pathikonda, Zachary R. Popkin-Hall, Matthew C. Medeiros, Godwin Fuseini, Abrahan Matias, Guillermo Garcia, et al.: Increasing Outdoor Host-Seeking in *Anopheles Gambiae* over 6 Years of Vector Control on Bioko Island, in: *Malaria Journal*, 2016, 15 (April)

Miller, Max J.: Observations on the Natural History of Malaria in the Semi-Resistant West African, in: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1958, 52 (2): 152–168

Obeagu, Emmanuel Ifeanyi, Chijioke UO, Ekelozie IS: Malaria Rapid Test (RDTs), in: *Annals of Clinical and Laboratory Research*, 2018, Vol. 6. No. 4:275

Ogouyèmi-Hounto, Aurore, Dorothée Kinde Gazard, Nicaise Ndam, Elsa Topanou, Olivia Garba, Pancras Elegbe, Tatiana Hountohotegbe, Achille Massougbodji: Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from children in South of Benin, in: *Parasite*, 2013, 20, 37

Olasehinde, G.I., C.S. Yah, R. Singh, O. Olusola Ojuronbge, A.A. Ajayi, N. Valecha, A.O. Abolaji, A.O. Adeyeba: Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* field isolates from south western Nigeria, in: *African Health Sciences*, 2012, 12(3), 355-361

Owusu-Agyei, S., T. Smith, H.-P. Beck, L. Amenga-Etego, I. Felger: Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic inhabitants of a holoendemic malarious area in northern Ghana, in: *Tropical Medicine and International Health*, 2002, Vol. 7, No. 5, 421–428

Oyebola, Muyiwa, Emmanuel Idowu, Yetunde Olukosi, Chimere Agomo, Olusola Ajibaye, Monday Tola, Adetoro Otubanjo: Genetic Diversity and Complexity of *Plasmodium Falciparum* Infections in Lagos, Nigeria, in: *Journal of Bacteriology and Parasitology*, 2014, 5:4

Rehman, Andrea M., Andrea G. Mann, Christopher Schwabe, Michael R. Reddy, Irina Roncon Gomes, Michel A. Slotman, Lee Yellott, Abrahan Matia, Adalgisa Caccone, Gloria Nseng Nchama, Immo Kleinschmidt: Five years of malaria control in the continental region, Equatorial Guinea, in: *Malaria Journal*, 2013, 12:154

Robinson, Ailie, Annette O. Busula, Julian K. Muwanguzi, Stephen J. Powers, Daniel K. Masiga, Teun Bousema, Willem Takken, Jetske G. de Boer, James G. Logan, Khalid B. Beshir, Colin J. Sutherland: Molecular quantification of *Plasmodium* parasite density from the blood retained in used RDTs, in: *Nature*, 2019, 9:5107

Scudellari, Megan: Hijacking Evolution, in: *Nature*, 2019, Vol. 571, 160-162

Sharp, Brian L., Frances C. Ridl, Dayanandan Govender, Jaime Kuklinski, Immo Kleinschmidt: Malaria Vector Control by Indoor Residual Insecticide Spraying on the Tropical Island of Bioko, Equatorial Guinea, in: *Malaria Journal*, 2007, 6 (May): 52

Snounou, Georges, Zhu Xinping, Napaporn Siripoon, Willem Jarra, Sodsri Thaithong, K. Neil Brown, Sugnaya Viriyaksol: Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand, in: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 93, 369-374

Somé, Anyirékun Fabrice, Thomas Bazié, Issaka Zongo, R. Serge Yerbanga, Frédéric Nikiéma, Chathérine Neya, Liz Karen Taho, Jean-Bosco Ouédraogo: *Plasmodium falciparum msp1* and *msp2* genetic diversity and allele frequencies in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Bodo-Dioulasso, Burkina Faso, in: *Parasites Vectors*, 2018, 11:323

Smith, Thomas, H.-P. Beck, A. Kitua, I. Felger, N. Fraser-Hurt, A. Irion, P. Alonso, M. Tanner: Age dependence of multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity, in: *Medicine and Hygiene*, 1999, Vol. 93, Suppl. 1, 1-68

Veron, Vincent, und Carme, Bernard: Recovery and Use of *Plasmodium* DNA from Malaria Rapid Diagnostic Tests, in: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 74 (6), 941-943

Wanji, Samuel, Arnaud J. Kengne-Ouafo, Ebanga E. Joan Eyong, Helen K. Kimbi, Nicholas Tendongfor, Judith L. Ndamukong-Nyanga, Hugues C. Nana-Djeunga, Catherine Bourguinat, David D. Sofeu-Feugaing, Claude L. Charvet: Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 Block 2 in Sites of Contrasting Altitudes and Malaria Endemicities in the Mount Cameroon Region, in: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012, 86(5), 764-774

Weiss, Daniel J., Tim C. D. Lucas, Michele Nguyen, Anita K. Nandi, Donal Bisanzio, Katherine E. Battle, Ewan Cameron, et al.: Mapping the Global Prevalence, Incidence, and Mortality of *Plasmodium Falciparum*, 2000-17: A Spatial and Temporal Modelling Study, in: The Lancet, 2019, 394 (10195), 322–331

Wells, Timothy N.C, Rob Hooft van Huijsduijnen, Wesley C. Van Voorhis: Malaria medicines: a glass half full? in: Nature, 2015, Vol. 14, 424-442

Yavo, William, Abibatou Konaté, Denise Patricia Mawili-Mboumba, Fulgence Kondo Kassi, Marie L. Tshibola Mbuyi, Etienne Kpongbo Angora, Eby I. Hervé Menan, Marielle K. Bouyou-Akotet: Genetic Polymorphism of *msp1* and *msp2* in *Plasmodium falciparum* Isolates from Côte d'Ivoire versus Gabon, in: Journal of Parasitology Research, 2016, Artikelnr. 3074803

### **HarvardX Online Course: PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe**

Alonso, Pedro L.: Module 1: Setting the Stage for Malaria Elimination: Chapter 1: Past: A Historical Overview, Chapter 2: Global Technical Strategy: 2016-2030, Part 1, Chapter 3: Global Technical Strategy: 2016-2030, Part 2, Chapter 4: The Concept Underpinning the Future, PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, 2020

Catteruccia, Flamina: Module 3: Vector Biology and the Dynamics of Malaria Transmission: Chapter 4: Current Vector Control Methods, Chapter 5: Alternative Vector Control Methods, PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, 2020

Marti, Matthias: Module 4: The Dynamics of Malaria Transmission: Chapter1: The Malaria Transmission Cycle in Human and Mosquito, Chapter 2: Dynamics of Infection and Infectiousness, Chapter 4: Natural Transmission-Blocking Immunity and Intervention, PH425x: MalariaX: Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, 2020

Volkman, Sarah: Module 5, Chapter 1: Genetic Approaches to Malaria Elimination: Genetic Principles of Reduced Genetic Diversity with Declining Malaria Transmission, Chapter 2: Changes in Parasite Population Structure and Transmission Dynamics, Chapter 3: Genetic Toolkit and its Applications, PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, 2020

Wirth, Dyann: Module 2: The Biology of Malaria: Chapter1: General Introduction, Chapter 2: The Parasite Life Cycle in Detail, Chapter 3: The Human Malaria Parasites and Disease, Chapter 4: Diagnosis, Drugs, and Vaccines, Chapter 5: Malaria Eradication, PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, 2020

## Internet

### 1 Publikationen

Sysmex: Diagnostik

<https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/9.1.10.Malariadiagnostik.pdf>

20.9.2020

WHO: World Malaria Report 2019

<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721> 29.9.2020

<https://www.who.int/publications/i/item/world-malaria-report-2019> 29.9.2020

### 2 Statistik

Socscistatistics: Fisher-Test

<https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx> 21.9.2020

Socscistatistics: Chi Square-Test

<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default2.aspx> 21.9.2020

Socscistatistics: ANOVA-Test

<https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx> 21.9.2020

### 3 Allgemein

Biologie Schule: Gelelektrophorese

<http://www.biologieschule.de/gelelektrophorese.php#:~:text=Beim%20Erstellen%20eines%20genetischen%20Fingerabdrucks%20macht%20man%20sich%20die%20Gelelektrophorese%20zu%20Nutze%3A&text=Durch%20die%20Gelelektrophorese%20lassen%20sich,und%20bilden%20so%20einzelne%20Banden.> 27.9.2020

Bio-rad: OptiMAL-IT, Produktbeschreibung

<https://www.diagnostics-bio-rad.com/wp-content/uploads/2017/01/OptiMAL-Malaria-flyer.pdf>

23.9.2020

Centers for Disease Control and Prevention 2019 auf Wikipedia 2020): Plasmodien-Lebenszyklus

[https://de.wikipedia.org/wiki/Plasmodium#/media/Datei:Plasmodium\\_zyklus.png](https://de.wikipedia.org/wiki/Plasmodium#/media/Datei:Plasmodium_zyklus.png) 4.10.2020

Image-bank: Merozoiten-Freisetzung aus einem reifen Schizonten (Ausschnitt)  
<https://imagebank.hematology.org/image/20417/plasmodium-falciparum--schizonts-merozoites-and-haemozoin> 4.10.2020

Labor Gärtner: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  
<https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/polymerase/> 27.9.2020

Labor Gärtner: nPCR  
[https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/nested\\_pcr/](https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/nested_pcr/) 4.10.2020

learning EDX: Malaria-Ausbreitung  
<https://learning.edx.org/course/course-v1:HarvardX+PH425x+3T2019/block-v1:HarvardX+PH425x+3T2019+type@sequential+block@1aef1348d0a141b580eb7e04f463b31b/block-v1:HarvardX+PH425x+3T2019+type@vertical+block@b1b510528c9d4dd292b652065c21f6a1>  
4.10.2020

malariaatlas: Möglicher Lebensraum für *Plasmodium falciparum*  
<https://malariaatlas.org/explorer/#/> 4.10.2020

malariaatlas: Weltweit neu auftretende Malariafälle durch *Plasmodium falciparum*, 2000-2017  
<https://malariaatlas.org/explorer/#/> 4.10.2020

Malaria Atlas Project: *Plasmodium falciparum*-Prävalenz bei Kindern zwischen 2 und 10 Jahren, 2017  
<https://map.ox.ac.uk/> 4.10.2020

Morell, Virginia: Island Ark: a threatened African treasure  
<https://www.nationalgeographic.com/magazine/2008/08/island-ark-west-africa-bioko-island-animals/>  
23.8.2020

Our World in Data: DALY  
<https://ourworldindata.org/grapher/burden-of-disease-by-cause> 2.10.2020

Pflanzenforschung: Malaria  
<https://www.pflanzenforschung.de/de/pflanzenwissen/lexikon-a-z/malaria-1777> 29.9.2020

## Anhang

Kurs-Zertifikat:

PH425x: MalariaX: Defeating Malaria from the Genes to the Globe, online course of study by HarvardX, Verified Certificate of Achievement, 24.6.2020

Probenliste

Laborprotokoll

# VERIFIED

CERTIFICATE of ACHIEVEMENT

HarvardX

This is to certify that

**Koranan Blöchliger**

successfully completed and received a passing grade  
in

**PH425x: MalariaX: Defeating  
Malaria from the Genes to  
the Globe**

a course of study offered by HarvardX, an online  
learning initiative of Harvard University.

Núria Casamitjana, PhD  
Director of Training and Education  
*Barcelona Institute for Global Health*

Marcel Tanner, PhD  
Professor of  
Epidemiology and Medical  
Parasitology and Director Emeritus  
*Swiss Tropical and Public Health  
Institute*

Dyann F. Wirth, PhD  
Richard  
Pearson Strong Professor and Chair  
Department of Immunology and  
Infectious  
Diseases  
*Harvard T.H. Chan School of Public  
Health*



VERIFIED CERTIFICATE  
Issued 24 Juni, 2020

VALID CERTIFICATE ID

9aeafa10707e4ebc8c32c8648f163738

## Probenliste

Malaria Indicator Survey (MIS) von August bis Oktober 2018 auf Bioko Island, Äquatorial Guinea

1.Spalte: Barcode, 2.Spalte: Parasitendichte, 3.Spalte: Deletion von HRP2 und HRP3, 4.Spalte: Position der DNA-Proben auf den Platten, 5.Spalte: DNA auf einer Platte vorhanden (FALSE, d.h. Platte ist nicht leer)

Barcode	Parasitendichte	HRP2/HRP3 Deletion	Position	Probe aufgebraucht
DCB6	520.13	HRP3	P003 F03	nein
UCK988	117.32	no deletion	P004 D04	nein
GIN899	407.02	no deletion	P004 E06	nein
AWG221	1116.05	no deletion	P004 G10	nein
FWH518	1142.91	no deletion	P006 B08	nein
GWW846	2165.13	no deletion	P009 A09	nein
BXR659	125.55	no deletion	P010 F06	nein
RQI265	209.38	no deletion	P011 D03	nein
UCW596	6282.23	no deletion	P011 G09	nein
VLM425	8763.3	no deletion	P011 H03	nein
UWM790	192.74	no deletion	P014 D09	nein
TAJ877	1016.6	HRP3	P014 D11	nein
OQA509	564.49	HRP3	P014 E03	nein
YIZ827	951.93	no deletion	P014 F02	nein
BBJ902	86.84	no deletion	P014 F04	nein
YRJ113	56.35	no deletion	P014 F05	nein
SZS320	2493.46	no deletion	P014 F06	nein
EZI724	884.15	no deletion	P014 G01	nein
UDG48	875.86	no deletion	P014 G03	nein
OTS593	1063.19	no deletion	P014 G09	nein
CLU425	417.85	no deletion	P014 G10	ja
SGB411	1061.65	no deletion	P014 H09	ja
YEB7	57.27	no deletion	P020 D06	nein
MGI927	92	no deletion	P020 E02	nein
RBU331	967.63	no deletion	P020 E05	nein
FNE204	860.39	no deletion	P020 E10	nein
XRT438	93.21	no deletion	P020 E11	nein
EEW428	319.76	no deletion	P020 F03	nein
VKB364	286.29	no deletion	P020 F04	nein
EKN504	238.05	no deletion	P020 F08	nein
WWH356	55.99	no deletion	P020 F12	nein

DNH837	145.78	no deletion	P020 G04	nein
RBH293	5366.26	no deletion	P020 G07	ja
PVC875	49.89	no deletion	P020 G08	nein
KWP180	421.97	no deletion	P020 G10	nein
XOE457	708.74	no deletion	P020 H06	nein
HPY129	430.85	no deletion	P020 H08	nein
YXO958	753.51	no deletion	P021 H06	nein
HLS505	415.75	no deletion	P022 C04	nein
KLL663	17.17	HRP3	P022 C12	nein
IQI186	202.74	no deletion	P022 D06	nein
QXB151	522.05	no deletion	P022 E07	nein
WLM33	132.89	no deletion	P023 A12	nein
ZUC942	1122.39	no deletion	P023 D03	nein
EXO933	273.04	no deletion	P023 E06	nein
ESH764	1033.6	no deletion	P023 G01	nein
GOV995	53.24	no deletion	P023 G05	nein
ESR857	46.72	no deletion	P023 G06	nein
RZL322	164.18	no deletion	P023 G08	nein
CGK629	116.12	no deletion	P023 G09	nein

## **Laborprotokoll**

Ort: Labor der Clinical Immunology Unit, Swiss TPH Basel

Datum: 4.6.2020

Betreuungsperson: Salome Hosch

Name: Koranan Blöchliger

**Abkürzungen:** Die Namen von allelspezifischen Primer und den Alleltypen werden im praktischen Teil für eine bessere Übersicht über die verwendeten Materialien und die Resultate abgekürzt: für *msp1*: K1 = K, MAD20 = M, RO33 = R und für *msp2*: 3D7/IC = IC, FC27 = FC.

Versuch: **Nested PCR** (eine genspezifische PCR, gefolgt von einer allelspezifischen PCR) für *msp1* und *msp2* von den ersten **10 DNA-Proben** (Liste: Nr.1-10) von insgesamt 48 positiven Malaria Schnelltests aus dem „Malaria Indicator Survey 2018“ von Bioko Island, Äquatorial Guinea.

### **1.PCR (genspezifisch)**

Bei der 1.PCR wird die gesamte DNA jeweils für *msp1* und *msp2* amplifiziert.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer:**

1 Tube (1,5 ml) mit ***msp1* Outer Forward Primer (OFP)**

1 Tube mit ***msp1* Outer Reverse Primer (ORP)**

1 Tube mit ***msp2* OFP**

1 Tube mit ***msp2* ORP**

Thermocycler

Allgemein braucht es für die PCR immer Forward und Reverse Primer. Bei der 1.PCR werden äussere Primer (OP = OFP und ORP) benutzt. Die OP binden weiter aussen an der DNA als die inneren Primer (IP = IFP und IRP):

DNA-Strang

\_\_OFP\_IFP            IRP\_\_ORP\_\_

     ist das, was uns interessiert und was wir auf dem Gel sehen werden.

Die OP sind für *Plasmodium falciparum* in einer Lösung von 100µM konserviert: 10 µl OP und 90 µl Wasser ergeben 100 µl Wasser-Primer-Lösung. Dies entspricht 10 µM OP-Konzentration. Wir arbeiten mit dieser Konzentration.

- Alle 4 Tubes werden für 10 min in einem Thermocycler auf 70 °C erhitzt: Dies ist notwendig, da es zwischen den OP zu Wasserstoffbrückenbindungen kommen kann, z.B. können mehrere *msp1* OFP zusammenhängen. Durch Hitze werden diese **Wasserstoffbrückenbindungen** zwischen den OP getrennt:

OFP



OFP

Die OP liegen nun homogen im Wasser vor.

- **Vortexen:**

4 Tubes mit den verschiedenen OP  
fünffach konzentrierter (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix  
Vortexmixer

- Die Tubes mit den jeweiligen OP werden mittels eines Vortexmixers geschüttelt, damit sich die Primer gut im Wasser verteilen.

Würde man dies nicht tun, könnte es sein, dass man beim Pipettieren keine OP erwischt. Ohne die OP funktioniert die nested PCR nicht.

- Der (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix wird ebenfalls zur Homogenisierung seiner Komponente gevortext. Er enthält DNA-Polymerase, Nukleotide A, T, G, C, Magnesiumchlorid (10 mM MgCl<sub>2</sub>), bovine serum enhancer (das verbessert die PCR).

Der Mix wurde zuvor tiefgefroren, damit seine Komponenten für mehrere Anwendungen erhalten bleiben. Beim Gefriervorgang ist es möglich, dass die Komponenten nicht homogen gefroren wurden. Das Vortexen sorgt dafür, dass sie sich gleichmässig im Mix verteilen.

- **Mastermix:**

4 Tubes mit den OP (Konzentration je 10 µM)

2 leere Tubes (1,5 ml)

10 µl-Pipette

100 µl-Pipette

1000 µl-Pipette

3 Tube Strips (jedes hat 8 voneinander getrennte Röhrchen)

- Je 12 Proben für *msp1* und *msp2*: **10 DNA-Proben** mit je **1 Negativ-** und **1 Positivkontrolle**. Es bräuchte zwar 12 Reaktionen, aber es werden 13 Reaktionen vorbereitet, damit genug Reaktionsmaterial vorhanden ist, weil beim Pipettieren Ungenauigkeiten möglich sind.
- Wasser, Firepol Mix und OP werden im Verhältnis vermischt, sodass die Primerkonzentration **0,125 µM** entspricht.

Mastermix 1:

175,5 µl Wasser

3,25 µl von ***msp1* OFP**

3,25 µl von ***msp1* ORP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:

175,5 µl Wasser

3,25 µl von ***msp2* OFP**

3,25 µl von ***msp2* ORP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 1 befindet sich in einem weissen Tube, Mastermix 2 in einem blauen Tube.

- Von den 3 Tube Strips wird eines halbiert:

Eineinhalb 8er Tube Strips für *msp1* OP und eineinhalb 8er Tube Strips für *msp2* OP ergeben je ein 12er Tube Strip (12 Röhrchen).

- Mit einer 100 µl-Pipette werden je 18 µl von **Mastermix 1** mit *msp1* OP in die 12 Röhrchen pipettiert. Vorgang mit **Mastermix 2** mit *msp2* OP genau gleich:

**weiss** = *msp1*      **blau** = *msp2*



Abbildung 1: Tube Strip mit Mastermix 1 mit *msp1* OP (uniscience 2020a)



Abbildung 2: Tube Strip mit Mastermix 2 für *msp2* OP (uniscience 2020b)

Die Farbmarkierungen für *msp1* und *msp2* bleiben immer gleich.

Die 12 Röhren sind nummeriert, das ist vor allem für das Pipettieren der DNA-Proben wichtig, damit man weiss, wo was hinein pipettiert wurde.

- **Entnehmen der DNA-Proben:**

Zentrifuge

Mikrotiterplatten Nr. 3, 4, 6, 9, 10, 11 (darin sind DNA-Proben enthalten)

Liste (mit den zu untersuchenden 50 positiven Malariaschnelltests)

10 µl-Pipette

2 12er Tube Strips mit je *msp1* und *msp2* OP

Meine Betreuungsperson hat auf einer A4-Seite 50 Malariaschnelltests aufgelistet, bei denen es uns von früheren Experimenten interessiert, ob es sich um Infektionen von einem Parasitenstamm oder von mehreren handelt. Wir arbeiten anhand dieser Liste:

DCB6	520.13	HRP3	P003 F03	FALSE
UCK988	117.32	no deletion	P004 D04	FALSE
GIN899	407.02	no deletion	P004 E06	FALSE
AWG221	1116.05	no deletion	P004 G10	FALSE
FWH518	1142.91	no deletion	P006 B08	FALSE
GWW846	2165.13	no deletion	P009 A09	FALSE
BXR659	125.55	no deletion	P010 F06	FALSE
RQI265	209.38	no deletion	P011 D03	FALSE
UCW596	6282.23	no deletion	P011 G09	FALSE
VLM425	8763.3	no deletion	P011 H03	FALSE
UWM790	192.74	no deletion	P014 D09	FALSE
TAJ877	1016.6	HRP3	P014 D11	FALSE
OQA509	564.49	HRP3	P014 E03	FALSE
YIZ827	951.93	no deletion	P014 F02	FALSE
BBJ902	86.84	no deletion	P014 F04	FALSE
YRJ113	56.35	no deletion	P014 F05	FALSE
SZS320	2493.46	no deletion	P014 F06	FALSE
EZI724	884.15	no deletion	P014 G01	FALSE
UDG48	875.86	no deletion	P014 G03	FALSE
OTS593	1063.19	no deletion	P014 G09	FALSE
CLU425	417.85	no deletion	P014 G10	WAHR
SGB411	1061.65	no deletion	P014 H09	WAHR
YEB7	57.27	no deletion	P020 D06	FALSE
MGI927	92	no deletion	P020 E02	FALSE
RBU331	967.63	no deletion	P020 E05	FALSE
FNE204	860.39	no deletion	P020 E10	FALSE
XRT438	93.21	no deletion	P020 E11	FALSE
EEW428	319.76	no deletion	P020 F03	FALSE
VKB364	286.29	no deletion	P020 F04	FALSE
EKN504	238.05	no deletion	P020 F08	FALSE
WWH356	55.99	no deletion	P020 F12	FALSE
DNH837	145.78	no deletion	P020 G04	FALSE
RBH293	5366.26	no deletion	P020 G07	WAHR
PVC875	49.89	no deletion	P020 G08	FALSE
KWP180	421.97	no deletion	P020 G10	FALSE
XOE457	708.74	no deletion	P020 H06	FALSE
HPY129	430.85	no deletion	P020 H08	FALSE
YXO958	753.51	no deletion	P021 H06	FALSE
HLS505	415.75	no deletion	P022 C04	FALSE
KLL663	17.17	HRP3	P022 C12	FALSE
IQI186	202.74	no deletion	P022 D06	FALSE
QXB151	522.05	no deletion	P022 E07	FALSE
WLM33	132.89	no deletion	P023 A12	FALSE
ZUC942	1122.39	no deletion	P023 D03	FALSE
EXO933	273.04	no deletion	P023 E06	FALSE
ESH764	1033.6	no deletion	P023 G01	FALSE
GOV995	53.24	no deletion	P023 G05	FALSE
ESR857	46.72	no deletion	P023 G06	FALSE
RZL322	164.18	no deletion	P023 G08	FALSE
CGK629	116.12	no deletion	P023 G09	FALSE

- Die ersten 10 DNA-Proben werden benötigt. Sie befinden sich auf den sechs Mikrotiterplatten mit den Nummern 3, 4, 6, 9, 10, 11.
- Die sechs Mikrotiterplatten werden in einer Zentrifuge geschleudert, damit sich die DNA am Boden sammelt und nichts an der Alufolie hängen bleibt (Platten sind mit einer Aluminiumfolie verschweisst). Das garantiert, dass man beim Herauspipettieren auch wirklich DNA erwischt.
- Die DNA-Proben werden nacheinander von den sechs Platten entnommen. Auf der Liste wird abgelesen, auf welcher Position sich die DNA-Proben befinden. Anschliessend wird mit einer 10 µl-Pipette je 2 µl DNA heraus pipettiert:

Nr.	barcode	quant_µl	hrp	position	Empty
1.	DCB6	520.13	HRP3	P003 F03	FALSE
2.	UCK988	117.32	no deletio	P004 D04	FALSE
3.	GIN899	407.02	no deletio	P004 E06	FALSE
4.	AWG221	1116.05	no deletio	P004 G10	FALSE
5.	FWH518	1142.91	no deletio	P006 B08	FALSE
6.	GWW846	2165.13	no deletio	P009 A09	FALSE
7.	BXR659	125.55	no deletio	P010 F06	FALSE
8.	RQI265	209.38	no deletio	P011 D03	FALSE
9.	UCW596	6282.23	no deletio	P011 G09	FALSE
10.	VLM425	8763.3	no deletio	P011 H03	FALSE

DNA-Proben auf Mikrotiterplatten (Nr.1-10):

**Nr.1) Platte 3**, Position F3

**Nr.2) Platte 4**, Position D4

**Nr.3) Platte 4**, Position E6

**Nr.4) Platte 4**, Position G10

**Nr.5) Platte 6**, Position B8

**Nr.6) Platte 9**, Position A9

**Nr.7) Platte 10**, Position F6

**Nr.8) Platte 11**, Position D3

**Nr.9) Platte 11**, Position G9

**Nr.10) Platte 11**, H3

- Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben mit dem Mastermix (Kombination von Polymerase, Nukleotiden und OP für *msp1 + 2*) in den Rörchen vermischt:

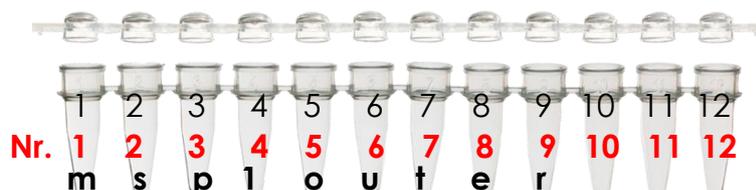




Abbildung 3: Vermischen der DNA mit Mastermix

- Bei beiden Tube Strips wird in Röhrcchen Nr.11 **NF54** (DNA eines bestimmten Parasitenstamms von *Plasmodium falciparum*) pipettiert: Nr.11 bildet die **Positivkontrolle**, die bei der späteren Agarose-Gelelektrophorese angibt, ob die PCR funktioniert hat oder nicht.
- Es wird nichts in Röhrcchen Nr.12 pipettiert. Man könnte jedoch 2 µL Wasser dazu pipettieren, damit das Volumen im Röhrcchen gleich gross ist wie bei den anderen.

Röhrcchen Nr.12 bildet die **non template control (NTC = Negativkontrolle)** und gibt bei der Gelelektrophorese an, ob sauber gearbeitet wurde und/oder eine Kontamination vorliegt.



Abbildung 4: NF54 und NTC

### • PCR im Thermocycler:

Thermocycler

2 12er Tube Strips mit DNA und Mastermix

- Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 1.PCR platziert.  
PCR program 1st PCR:

95 °C 12 min

95 °C 1 min

58 °C 2 min

72 °C 2 min

72 °C 2 min



Das wird 25x wiederholt.

Am Schluss gibt es 25

Verdoppelungen der DNA.

Dauer: Insgesamt 2h 40 min (2h 20 min für die PCR und 20 min für das Abkühlen und Erhitzen in den Übergängen)

Produkte 1.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1*\_outer\_1**

**Amplifizierte DNA für *msp2*\_outer\_1**

## **2.PCR (allelspezifisch)**

Die **2.PCR** ist spezifisch für jeden Alleltyp (*msp1*: K, M, R; *msp2*: IC, FC). Es werden allelspezifische Primer benötigt.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer:**

1 Tube mit ***msp1* K Forward Primer** (KFP), 1 Tube mit ***msp1* K Reverse Primer** (KRP)

1 Tube mit ***msp1* MF Primer** (MFP), 1 Tube mit ***msp1* MR Primer** (MRP)

1 Tube mit ***msp1* RF Primer** (RFP), 1 Tube mit ***msp1* RR Primer** (RRP)

1 Tube mit ***msp2* ICF Primer** (ICFP), 1 Tube mit ***msp2* ICR Primer** (ICRP)

1 Tube mit ***msp2* FCF Primer** (FCFP), 1 Tube mit ***msp2* FCR Primer** (FCRP)

Thermocycler

- Alle Tubes mit den verschiedenen Primer werden für 10 min in einem Thermocycler auf 70 °C erhitzt.

- **Vortexen:**

5 Tubes mit den verschiedenen Primer

(5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Vortexmixer

- Die Primer werden mittels eines Vortexmixer geschüttelt. Ebenso (5x) der HOT FIREPol® MultiPlex Mix.

- **Mastermix:**

5 Tubes mit Primer  
5 leere Tubes (1,5 ml)  
10 µl-Pipette  
100 µl-Pipette  
1000 µl-Pipette  
5 12er Tube Strips

Mastermix 1:

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* KFP**  
3,25 µl von ***msp1* KRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* MFP**  
3,25 µl von ***msp1* MRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 3:

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp1* RFP**  
3,25 µl von ***msp1* RRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 4:

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp2* ICFP**  
3,25 µl von ***msp2* ICRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 5:

175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***msp2* FCFP**  
3,25 µl von ***msp2* FCRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

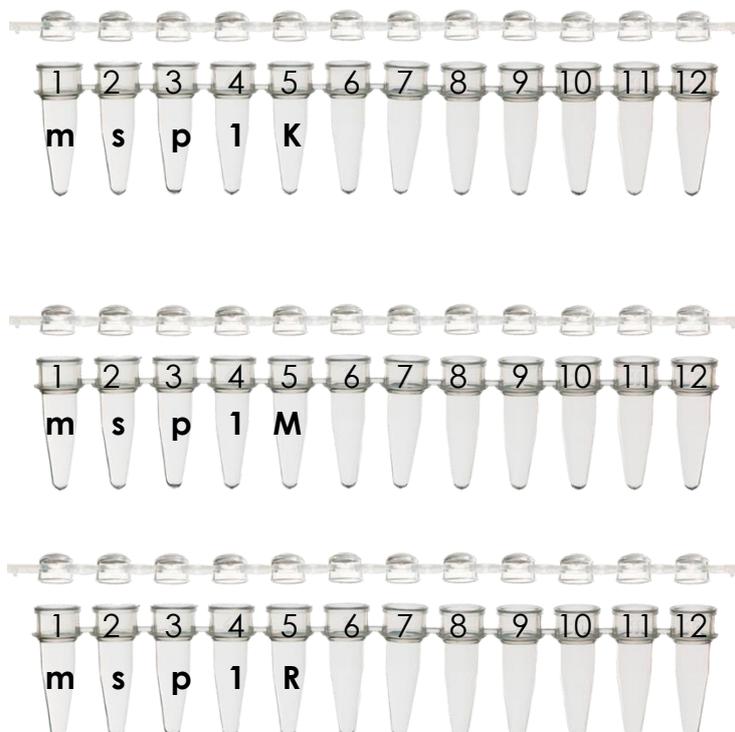
Pro Tube ein Mastermix:



Abbildung 5: Mix 1 mit *msp1 K*, Mix 2 mit *msp1 M* und Mix 3 mit *msp1 R* in weissen Tubes. Mix 4 mit *msp2 IC* und Mix 5 mit *msp2 FC* in blauen Tubes.

- Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von **Mastermix 1** (mit *msp1 K* Primer) in die 12 Röhren pipettiert.
- Es werden je 18 µl von **Mastermix 2** (mit *msp1 M* Primer) in die 12 Röhren eines Tube Strips pipettiert.

Analoges Vorgehen bei den weiteren Mastermix 3-5:



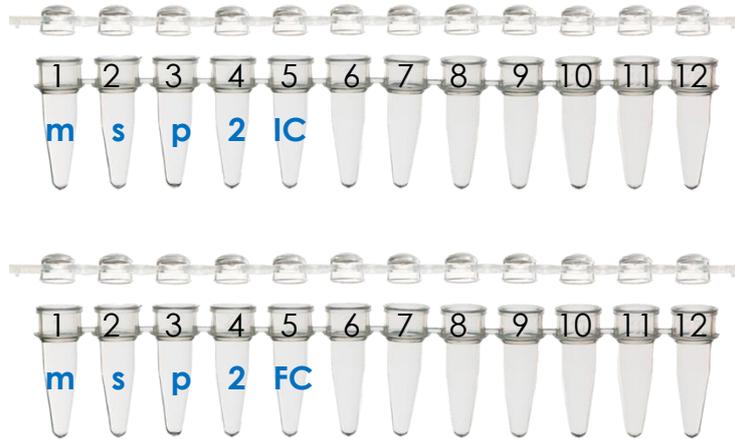


Abbildung 6: 5 Tube Strips für die 5 allelspezifischen Primer

- **Vermischen der Produkte mit Mastermix:**

2 12er Tube Strips mit den Produkten aus der **1.PCR**

12-Pipettenhalter

5 12er Tube Strips mit den Mixen für die **2.PCR**

Produkte 1.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_1* und *msp2\_outer\_1*

- Die Produkte werden mit den allelspezifischen Primer im Mastermix vermischt: Je 2 µl von ***msp1\_outer\_1*** wird mit einem 12-Pipettenhalter nacheinander in die 3 weissen Tube Strips pipettiert und ***msp2\_outer\_1*** in die 2 blauen Tube Strips gefüllt.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

5 12er Tube Strips mit PCR-Produkten und Mastermix

- Alle 5 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 2.PCR platziert.  
PCR program 2nd PCR:

95 °C 12 min

95 °C 30 sek

58 °C 30 sek

72 °C 40 sek

72 °C 2 min



Das wird 35x wiederholt.

Dauer: Insgesamt 1h 40 min

Die 2.PCR braucht weniger lang für die Amplifikation der DNA, da kürzere DNA-Fragmente vervielfältigt werden: Man rechnet mit ca. 1 Minute **Elongation time** pro 1000 Basenpaare für die Polymerase plus zusätzlich einige Sekunden zur Sicherheit.

Produkte 2.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_2***  
**Amplifizierte DNA für *msp1\_M\_2***  
**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_2***  
**Amplifizierte DNA für *msp1\_IC\_2***  
**Amplifizierte DNA für *msp1\_FC\_2***

Die Länge der DNA-Fragmente ist allelspezifisch.

Ort, Datum: Basel, 5.6.2020

Versuch: 3.PCR von **weiteren 10 DNA-Proben** (Liste: Nr. 11-20). Anschliessend Durchführung der **1.Agarose-Gelelektrophorese**.

### **3.PCR (genspezifisch)**

Die **3.PCR** ist vom Prinzip her gleich wie die 1.PCR.

Materialien und Methoden

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix**
- **Entnehmen der DNA:**

11.	UWM790	192.74	no deletic	P014 D09	FALSE
12.	TAJ877	1016.6	HRP3	P014 D11	FALSE
13.	OQA509	564.49	HRP3	P014 E03	FALSE
14.	YIZ827	951.93	no deletic	P014 F02	FALSE
15.	BBJ902	86.84	no deletic	P014 F04	FALSE
16.	YRJ113	56.35	no deletic	P014 F05	FALSE
17.	SZS320	2493.46	no deletic	P014 F06	FALSE
18.	EZI724	884.15	no deletic	P014 G01	FALSE
19.	UDG48	875.86	no deletic	P014 G03	FALSE
20.	OTSS593	1063.19	no deletic	P014 G09	FALSE

- Nur Platte Nr. 14 wird verwendet.
- Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben (Nr.11-20 auf der Liste) mit dem Mastermix in zwei 12er Tube Strips vermischt:

Röhrchen Nr.11 mit NF54, Röhrchen Nr.12 mit NTC.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

2 12er Tube Strips mit DNA und Mastermix

- Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 3.PCR (entspricht 1.PCR) platziert.

PCR program 1st PCR

Dauer: 2h 40 min

Produkte 3.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_3***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_3***

## 1. Agarose-Gelelektrophorese

Pro Gel ist es möglich, zwei Kämmen zu verwenden. Diese ergeben 2 Reihen mit je 13 Kammern im Gel. Pro Reihe wird ein Allel angeschaut. Die 13 Kammern sind mit 10 DNA-Proben, einer Positiv- und Negativkontrolle und zusätzlich einer DNA-Leiter, um die Grösse der Fragmente zu bestimmen, beladen. Auf einem Gel haben 2 Produkte Platz.

2 Gels werden hergestellt, weshalb nur 4 von den 5 Produkten aus der **2.PCR** darauf beladen werden können.

### Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

- 1,5 g Agarosepulver

- 150 ml 0,5x konzentrierter TBE Buffer (aus 100 ml fünffachkonzentrierter (5x) TBE Buffer und 900 ml Wasser)

- 500 ml-Erlenmeyerkolben

- Waage

- 50 ml-Messzylinder

- Magnetstäbchen

- Mikrowelle

- Magnetrührer

- 1,5 g Agarose wird auf einer Waage abgewogen.
- Im Messzylinder wird dreimal 150 ml 0,5x konzentrierter TBE Buffer abgefüllt.
- 1,5 g Agarosepulver, 150 ml (0,5x) TBE Buffer und ein Magnetstäbchen werden in den Erlenmeyerkolben gefüllt.
- Die Agarose-Buffer-Lösung wird im Erlenmeyerkolben anschliessend für ca. 5 Minuten in einer Mikrowelle aufgeheizt. Pulverstückchen werden dadurch in der Lösung aufgelöst.
- Der Erlenmeyerkolben wird dann für 15-20 min bei Raumtemperatur zum Abkühlen auf einem Magnetrührer stengelassen. Das Magnetstäbchen in der Lösung wird vom Magnetrührer magnetisch angeregt und es beginnt sich zu drehen. Das sorgt für ein gleichmässiges Abkühlen der gesamten Lösung. Danach kann das Agarosegel in zwei Gestelle gegossen werden.

2 Gelelektrophorese-Gestelle  
4 Kämme  
Wasserwaage

- Es werden zwei Gelelektrophorese-Gestelle vorbereitet: In jedes Gestell werden 2 Kämme eingerastet (2 Gels, 4 Kämme). Die Bereiche der Kämme sind gleich gross. Mit einer kleinen Wasserwaage wird kontrolliert, ob das Gestell ganz eben ist oder nicht. Falls nötig, wird ein kleines Papierfetzchen unter das Gestell gelegt, damit es überall gleich eben ist.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels:**

2 Gelelektrophorese-Gestelle  
2 Gelelektrophorese-Geräte  
4 Kämme  
Erlenmeyerkolben mit dem Gel  
(0,5x) TBE Buffer

- Das Agarosegel wird in zwei Gelelektrophorese-Gestelle gegossen. Dann wird für 15 Minuten gewartet, damit das Gel fest werden kann.
- Danach wird die Oberfläche des Gels mit (5x) TBE Buffer benetzt.
- Die 4 Kämme werden aus den Gels herausgehoben. Pro Gel gibt es zwei waagrechte Reihen mit je 13 Kammern, die beladen werden.
- Jedes Gestell mit Gel wird in ein Gelelektrophorese-Gerät gelegt:
- Zwei Gelelektrophorese-Geräte werden mit (0,5x) TBE Buffer gefüllt, sodass die Gels vollständig mit Buffer bedeckt sind.

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading Dye 10-fach konzentriert)  
DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)  
Mikrotiterplatte  
10 µl-Pipette  
Pipettenhalter  
4 12er Tube Strips mit Produkten aus der **2.PCR**

- Auf einer Mikrotiterplatte werden 4 von 8 waagrechten Reihen mit Beladungspuffer gefüllt. Jede Reihe besitzt 12 Röhrrchen. Mit einer 10 µl-Pipette wird 1 µl Beladungspuffer in die 12 Röhrrchen jeder Reihe pipettiert:

Der Puffer sorgt dafür, dass die PCR-Produkte in den Kammern des Gels bleiben und sich nicht im Buffer verteilen. Beladungspuffer ist viskoser als TBE Buffer.

- Mit einem Pipettenhalter werden **4 Produkte aus der 2.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt:

4 Produkte 2.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_2*, *msp1\_M\_2*, *msp1\_R\_2* und *msp2\_IC\_2*

Auf der Mikrotiterplatte sind 4 Reihen mit Beladungspuffer gefüllt. Pro Reihe wird ein Produkt mit Beladungspuffer vermischt. 4 µl PCR Produkt wird zu 1 µl Puffer pipettiert. Um beides zu mischen, wird hoch und runter pipettiert. Danach kann das Gel beladen werden.

- Ein Gel wird mit ***msp1\_R\_2*** und ***msp1\_M\_2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_R\_2*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_M\_2*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp1\_K\_2*** und ***msp2\_IC\_2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_K\_2*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_IC\_2*.
- Kammer Nr.12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit DNA-Leiter (3 µl) beladen.

Anhand der DNA-Leiter kann später im Geldokumentationssystem auf den Gels abgelesen werden, wie lange die verschiedenen DNA-Fragmente jeder Kammer sind.

- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern wandern für 40 min auf den Gels.

- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

2 GE-Geräte mit den 2 Gels  
 GelRed  
 Geldokumentationssystem  
 PC

- Die Gels werden aus den zwei Geräten herausgenommen und für 20 min in GelRed gelegt.

Das ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der interkalierend an DNA bindet.

- Im Quantum ST5 Gel Documentation System, einem Geldokumentationssystem, werden die DNA-Fragmente auf den zwei Agarosengels mit UV-Licht bestrahlt.

Das an das PCR-Produkt gebundene GelRed fluoresziert mit einem orangen Farbton, wenn es UV-Licht ausgesetzt wird. Die Länge der DNA-Fragmente kann mit Hilfe der DNA-Leiter abgelesen werden: Die verschiedenen DNA-Fragmente sind aus den Kammern verschieden weit migriert. Sie sind als Banden (= waagrechte Striche) im Gel zu sehen. Wenn mehrere Banden in einer Kammer zu sehen sind, bedeutet dies, dass für die DNA mehrere Parasitenstämme vorliegen.

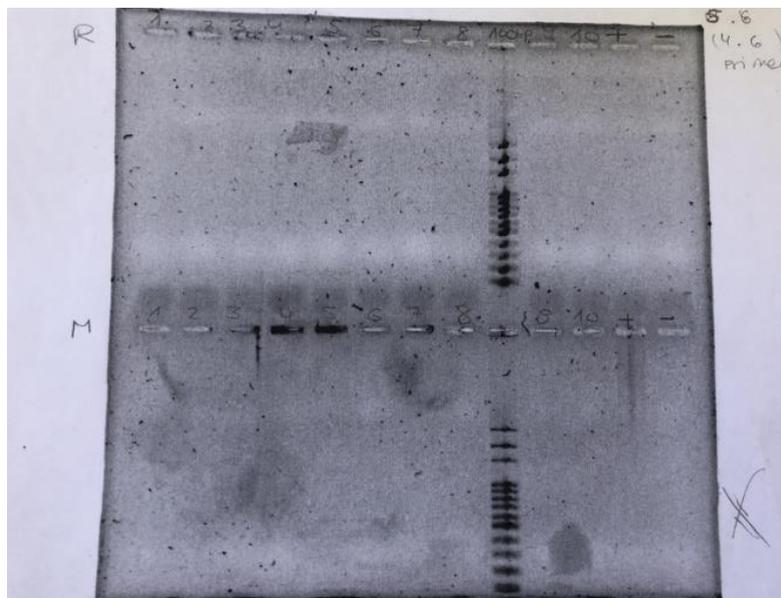


Abbildung 7: 1.GE, Alleltyp R und M

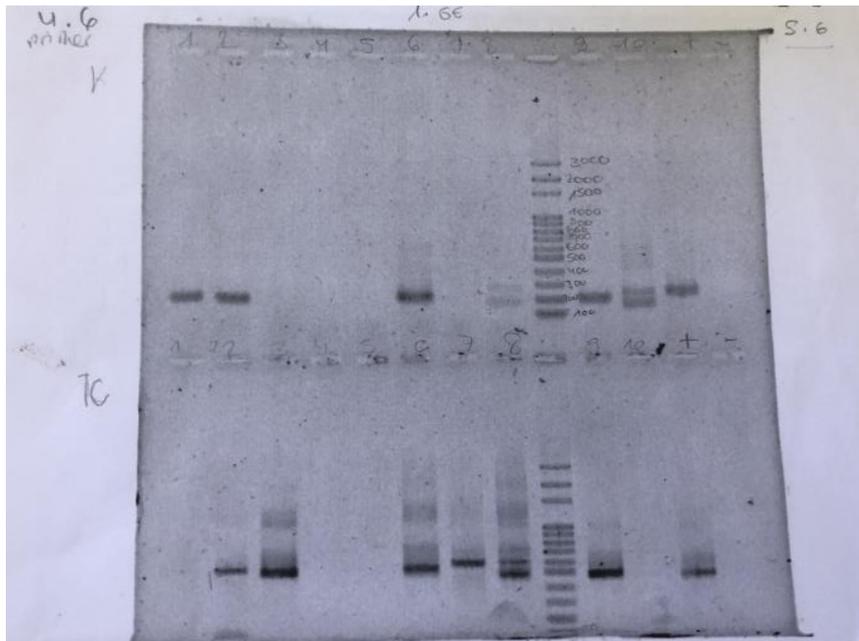


Abbildung 8: 1.GE, Alleltyp K und IC

Für die Alleltypen *msp1* M und R sind **keine Banden** zu sehen. Wir wiederholen deshalb die 2.PCR mit höherer Primerkonzentration für *msp1* M, R und auch gleich für K.

Ort, Datum: Basel, 8.6.2020

Versuch: Bei der 4.PCR wird die 2.PCR für ***msp1* Outer Produkt aus der 1.PCR** wiederholt, gleichzeitig wird die 2.PCR für die **Outer Produkten aus der 3.PCR** durchgeführt. Anschliessend Durchführung der **2. und 3. Gelelektrophorese.**

#### **4.PCR (allelspezifisch)**

Die **4.PCR** ist vom Prinzip gleich wie die **2.PCR**.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**

- **Mastermix:**

Tubes mit den verschiedenen Primer  
5 leere Tubes (1,5 ml)  
10 µl-Pipette  
100 µl-Pipette  
1000 µl-Pipette  
Mikrotiterplatte

Wir arbeiten jetzt mit der doppelten Primerkonzentration (**von 0.125 µM auf 0.25 µM**) für alle *msp1* Primer, da beim ersten Versuch die Banden für *msp1* zu schwach waren.

Da wir die **2.PCR** für die *msp1* OP der 1.PCR und für die OP der 3.PCR gleichzeitig durchführen, wird das doppelte Volumen des Mastermix für *msp1* benötigt.

Je 24 Reaktionen für *msp1* und je 12 Reaktionen für *msp2*.

Mastermix 1:

338 µl Wasser,  
13 µl von ***msp1* KFP**  
13 µl von ***msp1* KRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:

338 µl Wasser,  
13 µl von ***msp1* MFP**  
13 µl von ***msp1* MRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 3:

338 µl Wasser  
13 µl von ***msp1* RFP**  
13 µl von ***msp1* RRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 4:  
175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***m*sp2 ICFP**  
3,25 µl von ***m*sp2 ICRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 5:  
175,5 µl Wasser  
3,25 µl von ***m*sp2 FCFP**  
3,25 µl von ***m*sp2 FCRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Es gibt pro Tube einen Mastermix.

- **Beladen der Mikrotiterplatte:**

- Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von jedem Mastermix in Vertiefungen der Platte pipettiert. Jede der 8 Reihen hat einen bestimmten Mix:

- **Vermischen der Produkte mit Mastermix:**

1 12er Tube Strip mit *m*sp1 Outer Produkt aus der **1.PCR**  
2 12er Tube Strips mit den Outer Produkten aus der **3.PCR**  
Mikrotiterplatte mit Mastermixen  
12-Pipettenhalter

Je 2 µl von *m*sp1\_outer\_1 wird mit einem 12-Pipettenhalter in die Reihen C, E und G pipettiert.

- *M*sp1\_outer\_3 wird in die Reihen D, F und H pipettiert.
- *M*sp2\_outer\_3 wird in die Reihen A und B pipettiert:

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler  
Mikrotiterplatte mit den PCR-Produkten und Mastermix

- Die Mikrotiterplatte wird in den Thermocycler für die 4.PCR (entspricht 2.PCR) platziert.

PCR program 2nd PCR

Dauer: 1h 40 min

Produkte 4.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_4.1***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_M\_4.1***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_4.1***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_4.2***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_M\_4.2***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_4.2***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_IC\_4.2***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_FC\_4.2***

## 2. Agarose-Gelelektrophorese

Die **2.GE** ist vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels**

Es werden 2 Gels hergestellt für insgesamt 4 Produkte aus der 2. und 4.PCR.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

Mikrotiterplatte mit Produkten aus der **4.PCR**

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

1 12er Tube Strip mit Produkten aus der **2.PCR** (für *msp2\_FC\_2* hatte es bei den vorgängigen GE keinen Platz)

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.

- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 2. und 4.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Ein Gel wird mit ***msp1\_M\_4.1*** und ***msp1\_R\_4.1*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_M\_4.1*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_R\_4.1*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp2\_FC\_2*** und ***msp1\_K\_4.1*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp2\_FC\_2*. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_K\_4.1*.
- Kammer Nr.12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 40 min auf den Gels.
- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

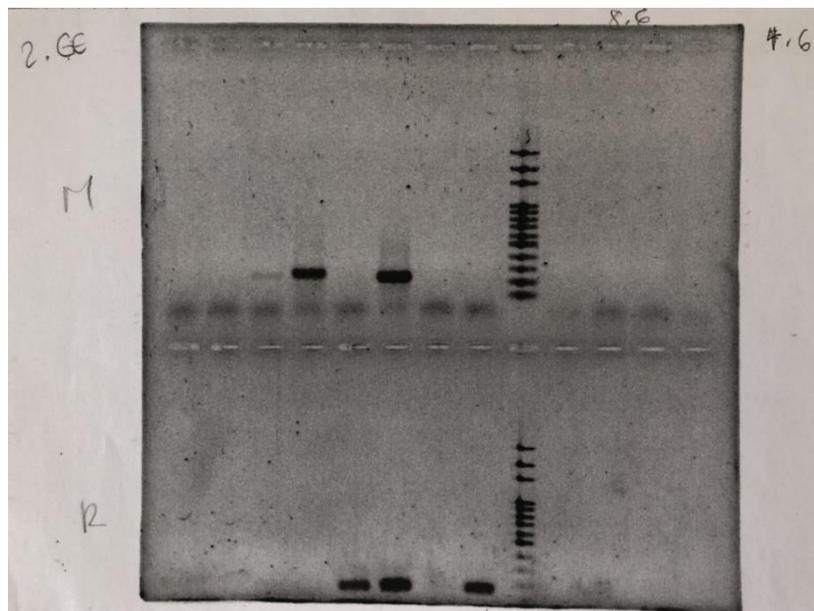


Abbildung 9: 2.GE, Alleltyp M und R



Abbildung 10: 2.GE, Alleltyp FC und K

Die 4.PCR funktionierte für die 4 Alleltypen, da bei allen Banden vorliegen. Mit einer Primerkonzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  für die *msp1* Primer erhalten wir gute Ergebnisse für die Alleltypen K, M und R.

### 3. Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**
- Es werden 2 Gels hergestellt für 4 Produkte aus der 4.PCR.
- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**
- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

Mikrotiterplatte mit Produkten aus der **4.PCR**

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

2 Gelelektrophorese-Gestelle

4 Kämme

Wasserwaage

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 4.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Ein Gel wird mit ***msp1\_K\_4.2*** und ***msp1\_M\_4.2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_K\_4.2*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 werden mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_M\_4.2*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp1\_FC\_4.2*** und ***msp2\_IC\_4.2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_FC\_4.2*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_IC\_4.2*.
- Kammer Nr.12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 40 min auf den Gels.

- Gel unter dem Geldokumentationssystem:

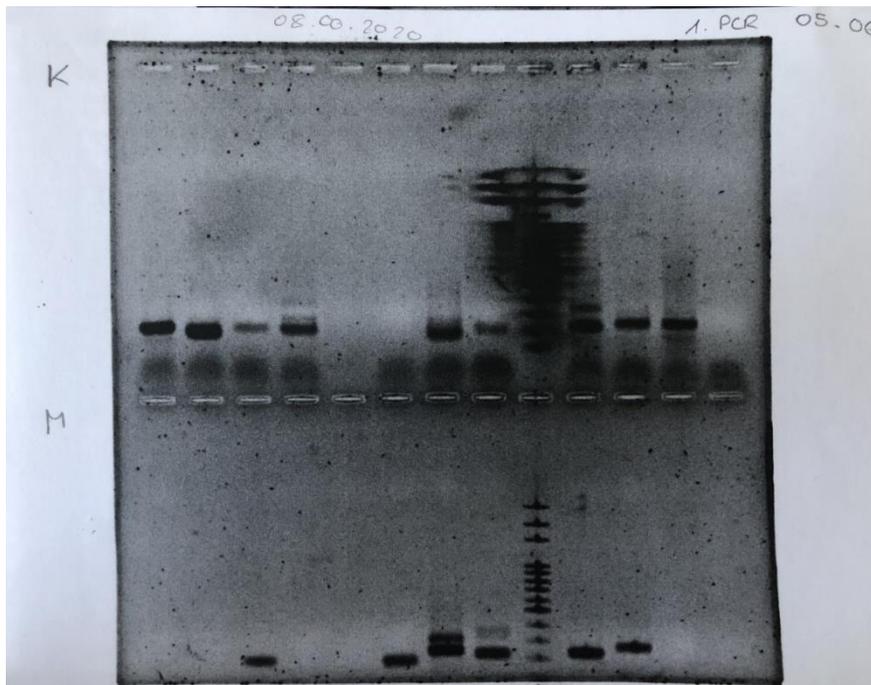


Abbildung 11: 3.GE, Alleltyp IC und M

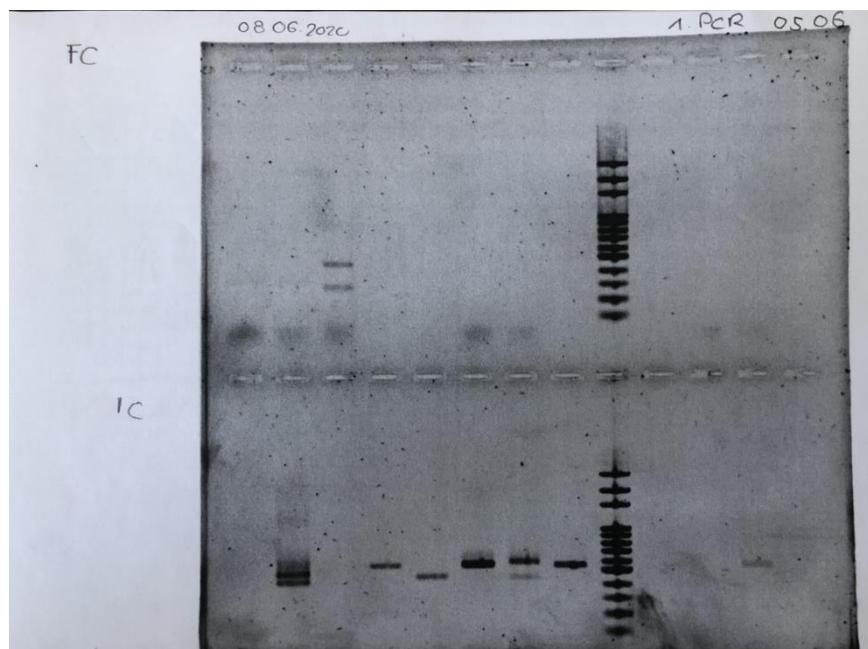


Abbildung 12: 3.GE, Alleltyp FC und IC

Ebenfalls gute Ergebnisse bei den Alleltypen K, M respektive FC, IC. Die Alleltypen von *msp1* haben höhere Primerkonzentration.

Die DNA-Leiter ist leicht verschmiert, da beim Beladen des Gels nicht genau in die Kammer pipettiert wurde.

Ort, Datum: Basel, 9.6.2020

Versuch: 5.PCR von **weiteren 10 DNA-Proben** (Liste: Nr. 21-30).

### 5.PCR (genspezifisch)

Vom Prinzip gleich wie die **1.PCR**.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix**
  
- **Entnehmen der DNA:**

21.	YEB7	57.27	no deletic	P020 D06	FALSE
22.	MGI927	92	no deletic	P020 E02	FALSE
23.	RBU331	967.63	no deletic	P020 E05	FALSE
24.	FNE204	860.39	no deletic	P020 E10	FALSE
25.	XRT438	93.21	no deletic	P020 E11	FALSE
26.	EEW428	319.76	no deletic	P020 F03	FALSE
27.	VKB364	286.29	no deletic	P020 F04	FALSE
28.	EKN504	238.05	no deletic	P020 F08	FALSE
29.	WWH356	55.99	no deletic	P020 F12	FALSE
30.	DNH837	145.78	no deletic	P020 G04	FALSE

- Nur Platte Nr.20 wird verwendet.
- Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben (Nr.21-30 auf der Liste) mit dem Mastermix in den Tube Strips vermischt.

Röhrchen Nr.11 = NF54, Röhrchen Nr.12 = NTC

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

2 12er Tube Strips mit DNA und Mastermix

- Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 5.PCR platziert.

PCR program 1st PCR

Dauer: 2h 40 min

Produkte 5.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_5***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_5***

Ort, Datum: Basel, 10.6.2020

Versuch: 6.PCR mit den **Outer Produkten** aus der **5.PCR** Anschliessend Durchführung der **4.** Und **5.Gelelektrophorese.**

### **6.PCR (allelspezifisch)**

Vom Prinzip gleich wie die **2.PCR.**

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix:**

Tubes mit den verschiedenen Primer

5 leere Tubes (1,5 ml)

10 µl-Pipette

100 µl-Pipette

1000 µl-Pipette

5 12er Tube Strips

- Wir arbeiten ab jetzt **immer mit einer höheren Primerkonzentration von 0.25 µM**, da damit bei *msp1* gute Resultate erzielt wurden. Die Primerkonzentration für *msp2* wird deshalb ebenfalls auf 0,25 µM erhöht.

Mastermix 1:

169 µl Wasser

6,5 µl von ***msp1* KFP**

6,5 µl von ***msp1* KRP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:

169 µl Wasser,

6,5 µl von ***msp1* MFP**

6,5 µl von ***msp1* MRP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 3:

169µl Wasser

6,5 µl von ***msp1* RFP**

6,5 µl von ***msp1* RRP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 4:

169 µl Wasser,

6,5 µl von ***msp2* ICFP**

6,5 µl von ***msp2* ICRP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 5:

169 µl Wasser

6,5 µl von ***msp2* FCFP**

6,5 µl von ***msp2* FCRP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Es gibt pro Tube einen Mastermix.

- Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von **Mastermix 1** (mit *msp1* K Primer) in die 12 Röhren eines Tube Strips pipettiert.

Analoges Vorgehen mit den weiteren Mastermix 2, 3, 4 und 5, d.h. insgesamt 5 Tube Strips für 5 Mastermixe.

- **Vermischen der Produkte mit Primer:**

2 12er Tube Strips mit den Outer Produkten aus der **5.PCR**

12-Pipettenhalter

5 12er Tube Strips mit den Mixturen

Produkte 5.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_5* und *msp2\_outer\_5*

- Die Produkte werden mit den allelspezifischen Primer im Mastermix vermischt: Je 2 µl von ***msp1\_outer\_5*** wird mit einem 12-Pipettenhalter nacheinander in die 3 weissen Tube Strips pipettiert. ***Msp2\_outer\_5*** wird in die 2 blauen Tube Strips gefüllt.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler,

5 12er Tube Strips mit Outer Produkt und Mastermix

- Die 5 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 6.PCR platziert.

PCR program 2nd PCR

Dauer: 1h 40 min

Produkte 6.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_6***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_M\_6***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_6***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_IC\_6***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_FC\_6***

#### 4. Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es werden 2 Gels hergestellt für 4 Produkte aus der 6.PCR.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

4 12er Tube Strips mit Produkten aus der **6.PCR**

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 6.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Ein Gel wird mit ***msp1\_K\_6*** und ***msp1\_M\_6*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_K\_6*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_M\_6*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp1\_FC\_6*** und ***msp2\_IC\_6*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_FC\_6*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_IC\_6*.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 40 min auf den Gels.

- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

Die Gelelektrophorese für die Alleltypen *msp1* K, M und *msp2* IC, FC funktionierte nicht, da bei allen keine Banden zu sehen waren. Es wurden deshalb keine Gelbilder ausgedruckt.

## 5. Agarose-Gelelektrophorese

### Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es wird nur 1 Gel hergestellt für 2 Produkte aus der **4.PCR** und der **6.PCR**.

Geplant war, dass Produkt *msp1\_R\_4.2* und Produkt *msp2\_FC\_4.2* aus der 4.PCR verwendet werden, da es für *msp1\_R\_4.2* keinen Platz auf den Gels der vorgängigen Gelelektrophorese hatte und für *msp2\_FC\_4.2* die Banden nicht genug deutlich waren. Beide **Produkte sind jedoch auf der Mikrotiterplatte** verpufft, weil sie im Kühlschrank mit der Aluminiumfolie nicht gut genug luftdicht verschweisst waren.

Für 1 Gel braucht es die Hälfte der Menge des Agarosepulvers sowie des (5x) TBE Buffers.

0,75 g Agarosepulver  
75 ml (5x) TBE Buffer  
500 ml-Erlenmeyerkolben  
Waage, 50 ml-Messzylinder  
Magnetstäbchen  
Mikrowelle  
Magnetrührer

- Im Erlenmeyerkolben wird die Lösung aus 0,75g Agarosepulver und 75 ml (0,5x) TBE Buffer für 2-3 min in einer Mikrowelle aufgeheizt.
- Der Erlenmeyerkolben mit der Lösung wird dann für 15-20 min bei Raumtemperatur zum Abkühlen auf einem Magnetrührer stehen gelassen.
- Nach 15-20 min erhalten wir durch das Abkühlen der Lösung das Agarosegel.

1 GE-Gestelle  
2 Kämme  
Wasserwaage

- Es werden zwei GE-Gestelle vorbereitet

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels:**

1 GE-Gestell  
1 GE-Gerät  
2 Kämme, Erlenmeyerkolben mit dem Gel  
(5x) TBE Buffer

- Das Agarosegel wird in ein GE-Gestell gegossen.
- Danach wird die Oberfläche des Gels mit (0,5x) TBE Buffer benetzt.
- Im Gestell werden zwei Kämme herausgehoben.
- Die Gestelle mit den Gels werden in ein GE-Gerät gelegt.
- Das GE-Gerät wird mit (0,5x) TBE Buffer gefüllt, sodass das Gel vollständig mit Buffer bedeckt ist.

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)  
DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)  
Leere Mikrotiterplatte  
10 µl-Pipette  
Pipettenhalter  
Mikrotiterplatte mit Produkt aus der **4.PCR**  
1 12er Tube Strip mit Produkt aus der **6.PCR**

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 2 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **2 Produkte aus der 4. und 6.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***m<sub>sp</sub>1\_R\_6*** und ***m<sub>sp</sub>2\_IC\_4.2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *m<sub>sp</sub>1\_R\_6*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *m<sub>sp</sub>2\_IC\_4.2*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.

- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 40 min auf den Gels.

- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

Für den Alleltyp *msp1* R sind keine Banden zu sehen. Die Banden vom Alleltyp *msp2* IC sind identisch mit den Banden von der 3. Gelelektrophorese. Es wurden hierfür keine Gelbilder ausgedruckt, da wir keine neuen bzw. unterschiedlichen Ergebnisse erhalten haben.

Ort, Datum: Basel, 22.6.2020

Versuch: 6.GE mit den **Produkten aus der 6.PCR**. Anschliessend Durchführung der **7.PCR** für die **nächsten 10 DNA-Proben** (Liste: Nr. 31-40).

## 6. Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **5.GE**.

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es wird nur 1 Gel benötigt.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

2 12er Tube Strip mit Produkten aus der **6.PCR**

Die GE für Produkte *msp1\_K\_6* und *msp1\_M\_6* funktionierte nicht, da für die Alleltypen K und M keine Banden zu sehen waren. Deshalb Wiederholung.

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 2 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.

- Mit einem Pipettenhalter werden die **2 Produkte aus der 6.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***msp1\_K\_6*** und ***msp2\_M\_6*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_K\_6*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_M\_6*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 40 min auf den Gels.
- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

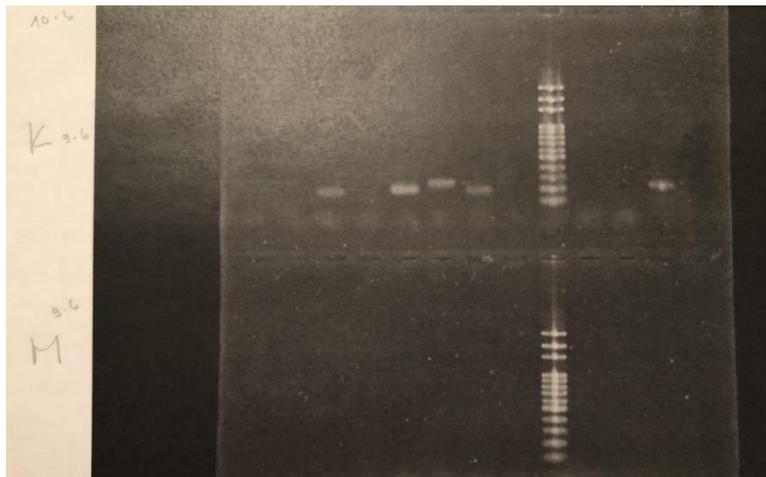


Abbildung 13: 6.GE, Alleltyp K und M

Für Alleltyp M sind keine Banden zu sehen. Für K sind die Banden nicht ganz deutlich zu sehen.

## 7.PCR (genspezifisch)

Vom Prinzip gleich wie die 1.PCR. **10 weitere DNA-Proben** (Nr.31-40).

### Materialien und Methoden

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix**
- **Entnehmen der DNA:**

31.	PVC875	49.89	no deletic	P020 G08	FALSE
32.	KWP180	421.97	no deletic	P020 G10	FALSE
33.	XOE457	708.74	no deletic	P020 H06	FALSE
34.	HPY129	430.85	no deletic	P020 H08	FALSE
35.	YXO958	753.51	no deletic	P021 H06	FALSE
36.	HLS505	415.75	no deletic	P022 C04	FALSE
37.	KLL663	17.17	HRP3	P022 C12	FALSE
38.	IQI186	202.74	no deletic	P022 D06	FALSE
39.	QXB151	522.05	no deletic	P022 E07	FALSE
40.	WLM33	132.89	no deletic	P023 A12	FALSE

- Die Platten Nr.20, 21, 22 und 23 werden verwendet.
- Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben (Nr. 31-40 auf der Liste) mit dem Mastermix für *msp1* und *msp2* Outer Produkte in den Tube Strips vermischt.

Röhrchen Nr.11 = NF54, Röhrchen Nr.12 = NTC.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler  
2 12er Tube Strips mit DNA und Mastermix

Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 7.PCR platziert.

PCR program 1st PCR

Dauer: ca. 2h 30 min

Produkte 7.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1*\_outer\_7**

**Amplifizierte DNA für *msp2*\_outer\_7**

Ort, Datum: Basel, 23.6.2020

Versuch: Wiederholung 2.PCR für ***msp1* R Produkt aus der 4.PCR**, gleichzeitig 2.PCR für **2 Produkte aus der 7.PCR**. Anschliessend Durchführung der **7.GE**.

### **8.PCR (allelspezifisch)**

Vom Prinzip gleich wie die **2.PCR**. Es werden allelspezifische Primer benötigt.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix:**

• Tubes mit den verschiedenen Primer

• 5 leere Tubes (1,5 ml)

• 10 µl-Pipette

• 100 µl-Pipette

• 1000 µl-Pipette

• 5 12er Tube Strips

- Da wir die 2.PCR für *msp1* R Primer vom 8.6. und für die *msp1* und *msp2* OP vom 23.6. gleichzeitig durchführen, wird das doppelte Volumen des Mastermix für *msp1* R benötigt.

Je 12 Reaktionen für *msp1* K, M und *msp2* IC, FC, doch 24 Reaktionen für *msp1* R:

Mastermix 1:

169 µl Wasser,

6,5 µl von ***msp1* KFP**

6,5 µl von ***msp1* KRP**

52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:  
169 µl Wasser  
6,5 µl von ***msp1* MFP**  
6,5 µl von ***msp1* MRP**  
169 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 3:  
338 µl Wasser,  
13 µl von ***msp1* RFP**  
13 µl von ***msp1* RRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 4:  
169 µl Wasser  
6,5 µl von ***msp2* ICFP**  
6,5 µl von ***msp2* ICRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 5:  
169 µl Wasser,  
6,5 µl von ***msp2* FCFP**  
6,5 µl von ***msp2* FCRP**  
52 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Es gibt pro Tube einen Mastermix.

- Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von **Mastermix 1** (mit *msp1* K Primer) in die 12 Röhren eines Tube Strips pipettiert.

Analoges Vorgehen mit den weiteren Mastermix 2, 4 und 5.

- **Mastermix 3** (mit *msp1* R Primer) wird in zwei Tube Strips pipettiert.

Es liegen insgesamt 6 Tube Strips vor.

- **Vermischen der Produkte mit Primer:**

1 12er Tube Strip mit Outer Produkt aus der **3.PCR**  
1 12er Tube Strips mit Outer Produkten aus der **7.PCR**  
12-Pipettenhalter  
5 12er Tube Strips mit den Mixturen

Produkt 3.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_3*

Produkt 7.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_7* und *msp2\_outer\_7*

- Das Outer Produkt aus der 4.PCR wird mit dem Mastermix mit *msp1* R Primer vermischt: Je 2 µl von ***msp1\_outer\_3*** wird mit einem 12-Pipettenhalter in die 3 weissen Tube Strips pipettiert.
- Die Outer Produkte aus der 7.PCR werden mit den allelspezifischen Primer im Mastermix vermischt: Je 2 µl von ***msp1\_outer\_7*** wird mit einem 12-Pipettenhalter in die 3 weissen Tube Strips pipettiert. ***Msp2\_outer\_7*** wird in die 2 blauen Tube Strips gefüllt.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

6 12er Tube Strips mit Outer Produkte und Mastermix

- Die 6 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 8.PCR platziert.
- PCR program 2nd PCR

Dauer: ca. 1h 30 min

Produkte 8.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_8.1***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_M\_8.1***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_8.1***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_IC\_8.1***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_FC\_8.1***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_8.2***

## 7. Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es werden 2 Gels hergestellt für 4 Produkte aus der **8.PCR**.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

4 12er Tube Strips mit Produkten aus der 8.PCR

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 8.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***msp1\_K\_8.1*** und ***msp1\_M\_8.1*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_K\_8.1*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_M\_8.1*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp2\_FC\_8.1*** und ***msp2\_IC\_8.1*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp2\_IC\_8.1*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_FC\_8.1*.
- Kammer Nr. 12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 40 min auf den Gels.

- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

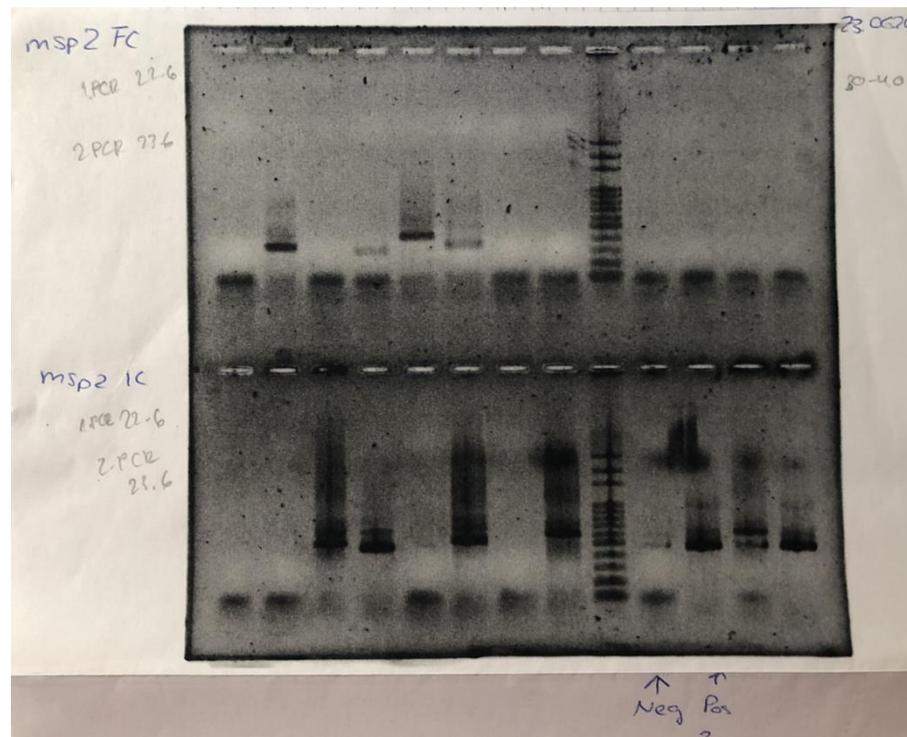


Abbildung 14: 7.GE, Alleltyp FC und IC

Für die Alleltypen *msp1* M und K sind keine Banden zu sehen. Für *msp2* IC und FC schon, deshalb wird nur ein Gelbild ausgedruckt.

Es ist möglich, dass hier beim Beladen der Kammern des Gels mit DNA aus Versehen von **Nr.13-10 anstelle von Nr.10-13** pipettiert wurde, da bei der Positiv- sowie der Negativkontrolle eine Bande zu sehen ist. Falls nicht falsch pipettiert wurde, könnte es auch sein, dass eine Kontamination vorliegt, da die Positivkontrolle eine Bande hat.

### 9.PCR (genspezifisch)

Vom Prinzip gleich wie die **1.PCR**. Wiederholung 1.PCR der DNA-Proben (**Nr.21-23, 27, 34, 35, 37-39**).

Diesmal mit einer **Annealing-Temperatur von 56 °C** (2 Grad weniger als bei den vorgängigen PCR). Wir wollen herausfinden, ob mit dieser Temperatur bessere Resultate erzielt werden können.

Das Anhängen der Primer an die DNA ist temperaturabhängig: je mehr allelspezifische Primer sich an die DNA-Fragmente anhängen, desto mehr können allelspezifische DNA

amplifiziert werden. Am Schluss sollten die Banden für die verschiedenen Alleltypen auf den Gels besser zu sehen sein.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix**
- **Entnehmen der DNA:**

21.	YEB7	57.27	no deletic	P020 D06	FALSE
22.	MGI927	92	no deletic	P020 E02	FALSE
23.	RBU331	967.63	no deletic	P020 E05	FALSE
27.	VKB364	286.29	no deletic	P020 F04	FALSE
34.	XOE457	708.74	no deletic	P020 H06	FALSE
35.	HPY129	430.85	no deletic	P020 H08	FALSE
37.	HLS505	415.75	no deletic	P022 C04	FALSE
37.	KLL663	17.17	HRP3	P022 C12	FALSE
38.	IQI186	202.74	no deletic	P022 D06	FALSE
39.	QXB151	522.05	no deletic	P022 E07	FALSE
40.					

Nur die Proben (Nr.21-23, 27, 34, 35, 37-39), die am 9.6. und 22.6. noch nicht verbraucht wurden.

- Die Platten Nr.20 und 22 werden verwendet.
- Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben mit dem Mastermix für *msp1* und *msp2* Outer Produkte in den Tube Strips vermischt.

**Fehler:** Bei Tube Strip mit *msp2* OP wurde von Nr.12-9 pipettiert anstelle von Nr.9-12.

Röhrchen Nr.11 mit NF54, Röhrchen Nr.12 mit NTC.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

2 12er Tubes Strips mit DNA und Mastermix

Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 9.PCR platziert.

PCR program 1st PCR: angepasst auf Annealing-Temperatur 56°C

95 °C 12 min  
95 °C 30 sek  
**56 °C 1 min**  
72 °C 2 min  
72 °C 2 min

} Das wird 25x wiederholt.

Dauer: ca. 2h

Produkte 9.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_9***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_9***

Ort, Datum: Basel, 24.6.2020

Versuch: 10.PCR für die **Outer Produkte aus der 9.PCR**. Anschliessend Durchführung der **8.GE**.

### **10.PCR (allelspezifisch)**

Vom Prinzip gleich wie die **2.PCR**.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer:**
- **Vortexen**
- **Mastermix**
- **Vermischen der Produkte mit Primer:**

2 12er Tube Strips mit Outer Produkten aus der 9.PCR

5 12er Tube Strips mit den Mixturen für die 10.PCR

12-Pipettenhalter

Produkte 9.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_9* und *msp2\_outer\_9*

- Die Outer Produkte aus der 9.PCR werden mit den allelspezifischen Primer im Mastermix vermischt: Je 2 µl von ***msp1\_outer\_9*** wird mit einem 12-Pipettenhalter in die 3 weissen Tube Strips pipettiert. ***Msp2\_outer\_9*** wird in die 2 blauen Tube Strips gefüllt.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

5 12er Tube Strips mit Outer Produkte und Mastermix

- Die 5 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 10.PCR platziert.

PCR program 2nd PCR: hier auch Annealing-Temperatur 56 °C

Dauer: ca. 1h 30 min

Produkte 10.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_K\_10***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_M\_10***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_R\_10***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_IC\_10***

**Amplifizierte DNA für *msp1\_FC\_10***

## 8. Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es werden 2 Gels hergestellt für 4 Produkte aus der 10.PCR.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

4 12er Tube Strips mit Produkte aus der **10.PCR**

10 µl-Pipette, Pipettenhalter

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 10.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***msp1\_M\_10*** und ***msp1\_K\_10*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_M\_10*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_K\_10*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp2\_FC\_10*** und ***msp2\_IC\_10*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp2\_fC\_10*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_IC\_10*.
- Kammer Nr.12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für **35 min** auf den Gels.

Wir haben bei den vorgängigen Gelelektrophoresen bei den Geräten eine Laufzeit von 40 min eingestellt, jedoch ist eine **Laufzeit 35 min geeigneter**, da die Banden in dieser Zeit nicht zu weit auf dem Gel laufen und in den Bereich der anderen Kammer „laufen“. Die Banden würden sich überschneiden, was nicht zu guten Ergebnissen führt.

Die Banden im Bereich der unteren Kammer würden bei einer längeren Laufzeit sogar aus dem Gel wandern.

- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

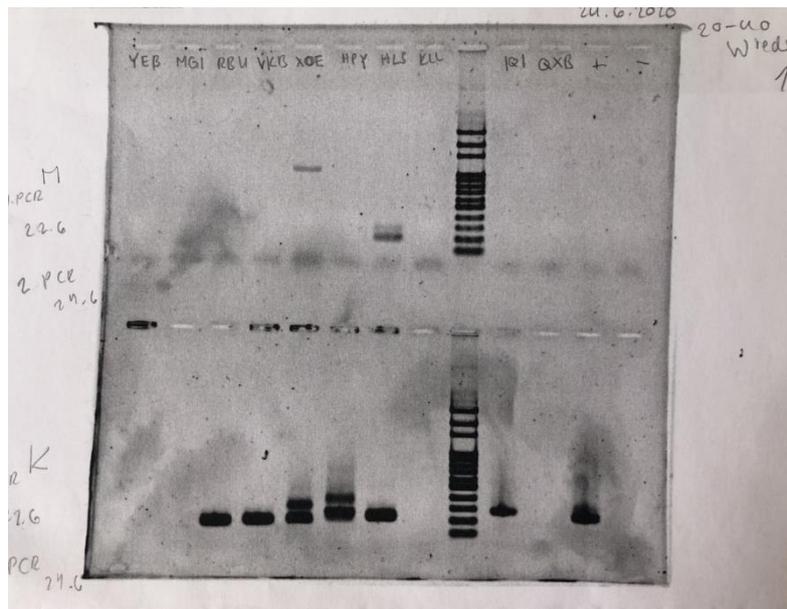


Abbildung 15: 8.GE, Alleltyp M und K

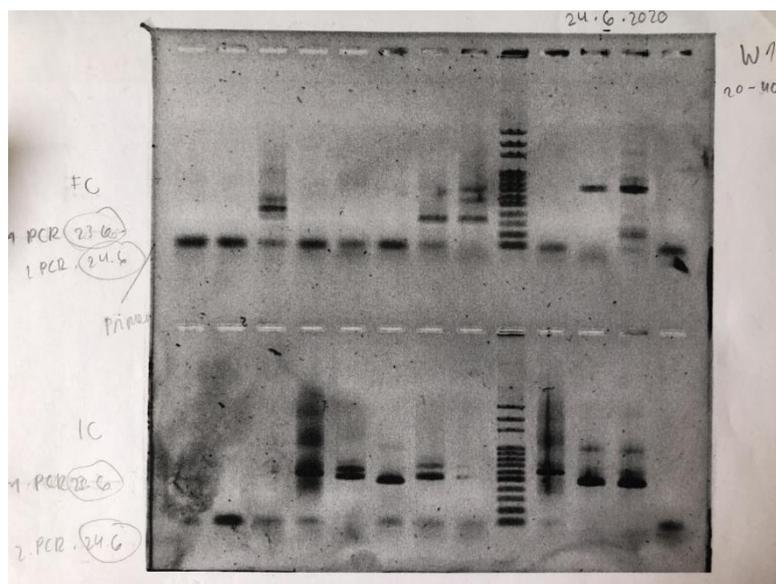


Abbildung 16: 8.GE, Alleltyp FC und IC

Es hat Banden bei allen 4 Alleltypen. Das zeigt, dass die PCR mit der Annealing-Temperatur von 56 °C gut funktioniert hat.

Die Banden bei *msp2* FC und IC sind zwar zu sehen, jedoch nicht ganz deutlich. Für *msp2* werden wir beim nächsten Mal wieder eine Annealing-Temperatur von 58°C verwenden, da bei 56°C für *msp2* unspezifische Amplifikation vorliegt.

Ort, Datum: Basel, 25.6.2020

Versuch: **11.PCR** für die **letzten 10 DNA-Proben** (Liste: Nr. 40-47 und 3 weitere DNA-Proben, die nicht auf der Liste sind).

Bei der **12. PCR** wird die 2.PCR für ***msp2* Produkte** aus der 8.PCR wiederholt, gleichzeitig 2.PCR für ***msp2* Outer Produkt** aus der 11.PCR.

Bei der **13.PCR** wird die 2.PCR für die ***msp1* Outer Produkte** aus der 11.PCR durchgeführt.

Anschliessend Durchführung der **9.GE**.

### 11.PCR (genspezifisch)

Vom Prinzip gleich wie die **1.PCR**

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer**
- **Vortexen**
- **Mastermix**
- **Entnehmen der DNA:**

40.	WLM33	132.89	no deletic	P023 A12	FALSE
41.	ZUC942	1122.39	no deletic	P023 D03	FALSE
42.	EXO933	273.04	no deletic	P023 E06	FALSE
43.	ESH764	1033.6	no deletic	P023 G01	FALSE
44.	GOV995	53.24	no deletic	P023 G05	FALSE
45.	ESR857	46.72	no deletic	P023 G06	FALSE
46.	RZL322	164.18	no deletic	P023 G08	FALSE
47.	CGK629	116.12	no deletic	P023 G09	FALSE

- Es werden nur 7 Proben von der Liste verwendet, da 3 DNA-Proben von den ursprünglich 50 leer sind:
- Nur Platte 23 wird verwendet.
- Nebst der 7 DNA-Proben auf der Liste werden zusätzlich 3 DNA-Proben (NF54, Dd2 und HB3) verwendet, damit es insgesamt 10 Proben sind.

Jede sind definierte Parasitenstämme von *Plasmodium falciparum*, die im Labor kultiviert wurden.

- Mit der 10 µl-Pipette werden je 2 µl der DNA-Proben mit den *msp1* und *msp2* OP in den Tube Strips vermischt.

Röhrchen Nr.9 = NF54, Röhrchen Nr.12 = NTC.

In Röhrchen Nr.10 befindet sich Dd2.

In Röhrchen Nr.11 befindet sich HB3.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

2 12er Tube Strips mit DNA und Mastermix

Die 2 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 11.PCR platziert.

PCR program 1st PCR: Annealing-Temperatur = **58 °C**

Dauer: ca. 2h 30 min

Produkte 11.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1\_outer\_11***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_11***

## **12.PCR (allelspezifisch)**

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer:**

1 Tube mit ***msp2 ICF*** Primer, 1 Tube mit ***msp2 ICR*** Primer

1 Tube mit ***msp2 FCF*** Primer, 1 Tube mit ***msp2 FCR*** Primer

Thermocycler

- **Vortexen**
- **Mastermix:**

Tubes mit den verschiedenen Primer

5 leere Tubes (1,5 ml)

10 µl-Pipette

100 µl-Pipette

1000 µl-Pipette

5 12er Tube Strips

- Da wir die 2.PCR für ***msp2 IC\_10*** und ***FC \_10*** aus der 10.PCR und ***msp2\_outer\_11*** aus der 11.PCR gleichzeitig durchführen, wird das doppelte Volumen des Mastermix für *msp2* IC und FC benötigt.

Je 24 Reaktionen für *msp2*:

Mastermix 1:

338 µl Wasser

13 µl von ***msp2 ICFP***

13 µl von ***msp2 ICRP***

104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:

338 µl Wasser,

13 µl von ***msp2 FCFP***

13 µl von ***msp2 FCRP***

104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Es gibt pro Tube einen Mastermix.

- Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von **Mastermix 1** (mit *msp2* IC Primer) in zwei Tube Strips pipettiert.

Analoges Vorgehen mit Mastermix 2.

Es liegen insgesamt 4 Tube Strips vor: 2 blaue Tubes Strips und 2 grüne Tube Strips.

- **Vermischen der Produkte mit Primer:**

1 12er Tube Strip mit Outer Produkt aus der **7.PCR**  
1 12er Tube Strip mit Outer Produkt aus der **11.PCR**  
4 12er Tube Strips mit den Mixturen für die 12.PCR  
12-Pipettenhalter

Produkt 7.PCR: Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_7*

Produkt 11.PCR: Amplifizierte DNA für *msp2\_outer\_11*

- Das Outer Produkt aus der 7.PCR wird mit dem Mastermix mit *msp2* OP vermischt: Je 2 µl von ***msp2\_outer\_7*** wird mit einem 12-Pipettenhalter in die 2 grünen Tube Strips pipettiert.
- Gleiches Vorgehen für das Outer Produkt aus der 11.PCR: ***Msp2\_outer\_11*** wird in die 2 blauen Tube Strips gefüllt.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler  
4 12er Tube Strips mit Outer Produkte und Mastermix

- Die 4 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 12.PCR platziert.
- PCR program 2nd PCR: Annealing-Temperatur = 58 °C

Dauer: ca. 1h 40 min

Produkte 12.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp2\_IC\_12.1***  
**Amplifizierte DNA für *msp2\_FC\_12.1***

**Amplifizierte DNA für *msp2\_IC\_12.2***  
**Amplifizierte DNA für *msp2\_FC\_12.2***

### 13.PCR (allelspezifisch)

Wir führen die 2.PCR für die ***msp1* Outer Produkte** aus der **11.PCR** durch.

Materialien und Methoden:

- **Erhitzen der Primer:**

1 Tube mit ***msp1* KF** Primer, 1 Tube mit ***msp1* KR** Primer  
1 Tube mit ***msp1* MF** Primer, 1 Tube mit ***msp1* MR** Primer  
1 Tube mit ***msp1* RF** Primer, 1 Tube mit ***msp1* RR** Primer

- **Vortexen**

- **Mastermix:**

Tubes mit den Primer  
3 leere Tubes (1,5 ml)  
10 µl-Pipette  
100 µl-Pipette  
1000 µl-Pipette  
3 12er Tube Strips

Je 12 Reaktionen für *msp1*:

Mastermix 1:

338 µl Wasser  
13 µl von ***msp1* KFP**  
13 µl von ***msp1* KRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 2:

338 µl Wasser,  
13 µl von ***msp1* MFP**  
13 µl von ***msp1* MRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Mastermix 3:

338 µl Wasser  
13 µl von ***msp1* RFP**  
13 µl von ***msp1* RRP**  
104 µl von (5x) HOT FIREPol® MultiPlex Mix

Es gibt pro Tube einen Mastermix.

- Mit der 100 µl-Pipette werden je 18 µl von **Mastermix 1** (mit *msp1* K Primer) in ein Tube Strip pipettiert.

Analoges Vorgehen mit Mastermix 2 und 3.

Es liegen insgesamt 3 Tube Strips vor.

- **Vermischen der Produkte mit Primer:**

1 12er Tube Strip mit Produkt aus der **11.PCR**

3 12er Tube Strips mit den Mixturen für die 13.PCR

12-Pipettenhalter

Produkt 11.PCR: Amplifizierte DNA für *msp1*\_outer\_11

- Das *msp1* Outer Produkt aus der 11.PCR wird mit Mastermix 1 vermischt: Je 2 µl von ***msp1*\_outer\_11** wird mit einem 12-Pipettenhalter in ein weisses Tube Strip pipettiert. Gleiches Vorgehen gleich mit Mix 2 und 3.

- **PCR im Thermocycler:**

Thermocycler

3 12er Tube Strips mit Outer Produkt und Mastermix

Die 3 Tube Strips werden in den Thermocycler für die 13.PCR platziert.

PCR program 2nd PCR: Die Annealing-Temperatur = 58 °C.

Dauer: ca. 1h 50 min

Produkte 13.PCR:

**Amplifizierte DNA für *msp1*\_K\_13**

**Amplifizierte DNA für *msp1*\_M\_13**

**Amplifizierte DNA für *msp1*\_R\_13**

## 9. Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es werden 2 Gels hergestellt für 4 Produkte aus der 12.PCR.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

4 12er Tube Strips mit Produkte aus der **12.PCR**

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 12.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***msp2\_IC\_12.1*** und ***msp2\_FC\_12.1*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp2\_IC\_12.1*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_FC\_12.1*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp2\_IC\_12.2*** und ***msp2\_FC\_12.2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp2\_IC\_12.2*. In der unteren Reihe befindet sich *msp2\_FC\_12.2*.
- Kammer Nr.12 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.

- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 35 min auf den Gels.
- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

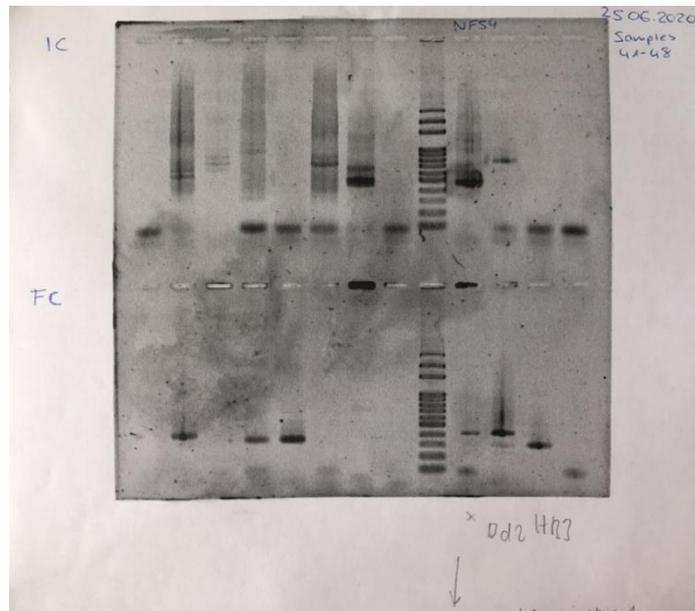


Abbildung 17: 9.GE, Alleltyp IC und FC

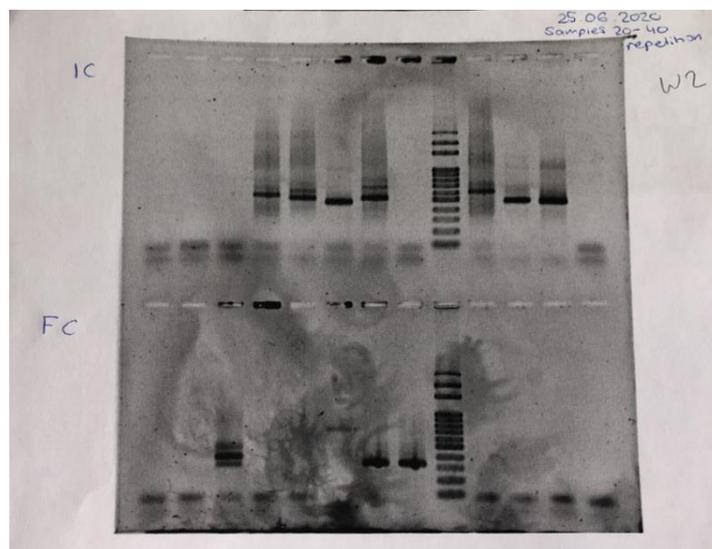


Abbildung 18: 9.GE, Alleltyp IC und FC

Es sind zwar Banden bei allen zu sehen, jedoch sind sie nicht ganz deutlich. Über einigen Banden sind noch weitere Banden leicht zu sehen. Das liegt an der Annealing-Temperatur von 56 °C.

Ort, Datum: Basel, 26.6.2020

Versuch: 10.G mit *msp1* Produkt aus der **10.PCR** und **Produkte** aus der **13.PCR**.  
Anschliessend Durchführung der **11.GE** mit **Produkt aus der 8.PCR**.

## 10.Agarose-Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **1.GE**.

Materialien und Methoden:

- **Herstellung des Agarosegels:**

Es werden 2 Gels hergestellt für 4 Produkt aus der **10.** und **13.PCR**.

- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**

- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

1 12er Tube Strip mit Produkt aus der **10.PCR**

3 12er Tube Strips mit Produkten aus der **13.PCR**

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2 µl Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 10. und 13 PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***msp1\_R\_10*** und ***msp1\_R\_13*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_R\_10*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_R\_13*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Analoges Vorgehen bei den zwei weiteren PCR-Produkten: Das zweite Gel wird mit ***msp1\_M\_13*** und ***msp1\_K\_13*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_M\_13*. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_K\_13*.

- Kammer Nr.10 = NF54, Kammer Nr.13 = NTC.
- Kammer Nr.11 befindet sich Dd2.
- Kammer Nr.12 befindet sich HB3.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3 µl) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 35 min auf den Gels.
- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

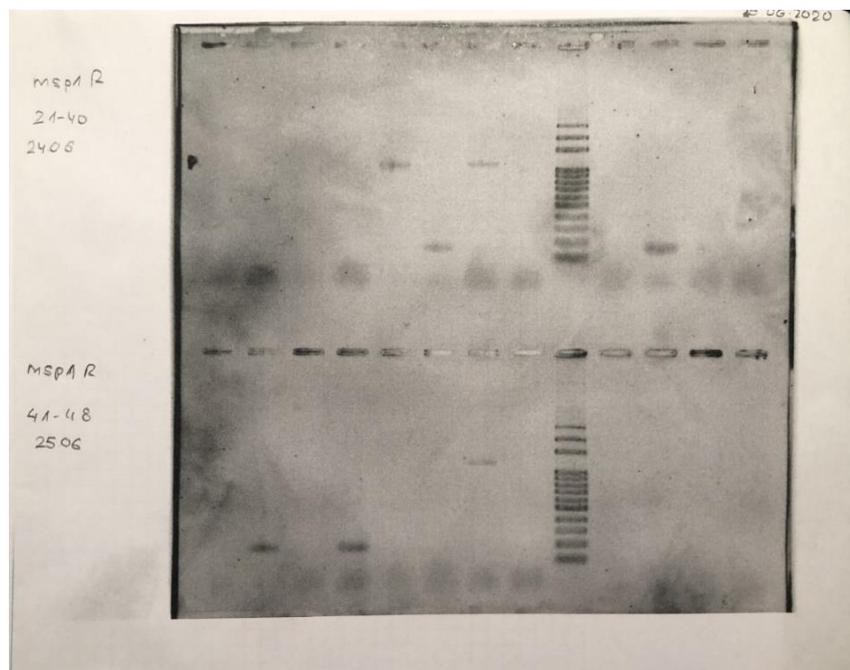


Abbildung 19: 10.GE, Alleltyp R und R

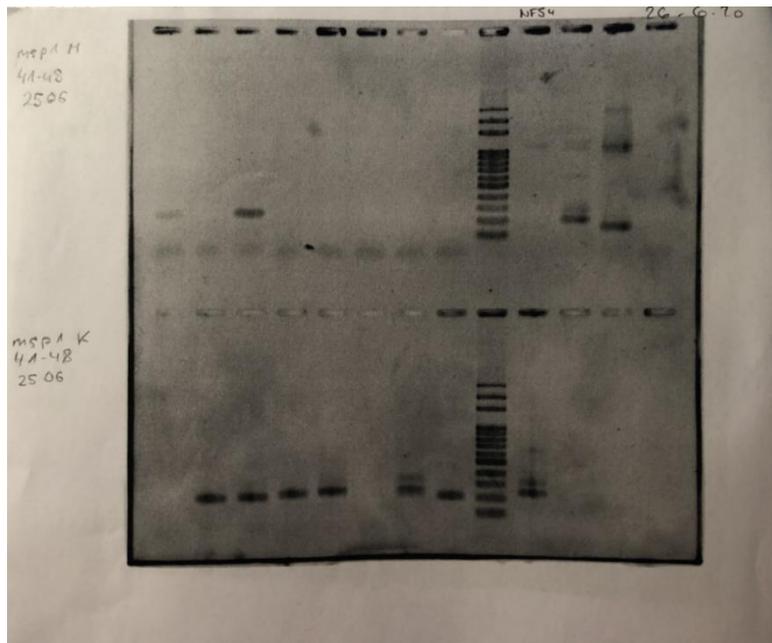


Abbildung 20: 10.GE, Alleltyp M und K

Es sind zwar Banden bei allen zu sehen, jedoch sind sie nicht ganz deutlich. *Msp1*R (10.PCR) und *msp1*R (13.PCR) haben feine Banden.

## 11. Gelelektrophorese

Vom Prinzip gleich wie die **5.GE**.

- **Herstellung des Agarosegels:**
- **Vorbereitung zur Beladung der Gels**
- **Beladen der Gels:**

Beladungspuffer (= DNA-Loading 10-fach konzentriert)

DNA-Leiter (100 Basenpaarleiter)

Leere Mikrotiterplatte

10 µl-Pipette

Pipettenhalter

1 12er Tube Strip mit Produkt aus der **4.PCR**

1 12er Tube Strip mit Produkt aus der **8.PCR**

- Es werden auf einer Mikrotiterplatte 4 von 8 waagrechten Reihen mit je 2  $\mu$ l Beladungspuffer gefüllt.
- Mit einem Pipettenhalter werden die **4 Produkte aus der 4 und 8.PCR** mit Beladungspuffer auf der Mikrotiterplatte vermischt.
- Das Gel wird mit ***msp1\_R\_4.2*** und ***msp1\_R\_8.2*** beladen. In der oberen Reihe befindet sich *msp1\_R\_4.2*. Die Kammern Nr.1-8, Nr.10 und 11 mit dem PCR-Produkt gefüllt. In der unteren Reihe befindet sich *msp1\_R\_8.2*. Gleicher Vorgang beim Beladen der Kammern.
- Kammer Nr.11 = NF54, Kammer Nr.12 = NTC.
- Kammer Nr.9 wird mit der DNA-Leiter (3  $\mu$ l) beladen.
- Nachdem die 2 Gels beladen wurden, werden die Gelelektrophorese-Geräte mit einem Deckel verschlossen. Die DNA in den Kammern „laufen/wandern“ für 35 min auf den Gels.
- **Gel unter dem Geldokumentationssystem:**

Es sind keine Banden zu sehen, deshalb wurden auch keine Gelbilder gemacht.

## Referenzen

uniscience: Tube Strip mit Mastermix 1 mit *msp1* OP, 2020a

<https://unisciencecorp.com/products/combo-pack-12-strip-pcr-tubes-and-domed-caps-clear> 22.8.2020

uniscience: Tube Strip mit Mastermix 2 für *msp2* OP, 2020b

<https://4vector.com/free-vector/eppendorf-opened-clip-art-111147> 22.8.2020

## Abbildungen

Abbildung 1 Tube Strip mit Mastermix 1 mit *msp1* OP

Abbildung 2 Tube Strip mit Mastermix 2 für *msp2* OP

Abbildung 3	Vermischen der DNA mit Mastermix
Abbildung 4	NF54 und NTC
Abbildung 5	Mix 1 mit <i>msp1</i> K, Mix 2 mit <i>msp1</i> M und Mix 3 mit <i>msp1</i> R in weissen Tubes. Mix 4 mit <i>msp2</i> IC und Mix 5 mit <i>msp2</i> FC in blauen Tubes
Abbildung 6	5 Tube Strips für die 5 allelspezifischen Primer
Abbildung 7	1.GE, Alleltyp R und M
Abbildung 8	1.GE, Alleltyp K und IC
Abbildung 9	2.GE, Alleltyp M und R
Abbildung 10	2.GE, Alleltyp FC und K
Abbildung 11	3.GE, Alleltyp K und M
Abbildung 12	3.GE, Alleltyp FC und IC
Abbildung 13	6.GE, Alleltyp K und M
Abbildung 14	7.GE, Alleltyp IC und FC
Abbildung 15	8.GE, Alleltyp M und K
Abbildung 16	8.GE, Alleltyp FC und IC
Abbildung 17	9.GE, Alleltyp IC und FC
Abbildung 18	9.GE, Alleltyp IC und FC
Abbildung 19	10.GE, Alleltyp R und R
Abbildung 20	10.GE, Alleltyp M und K

## **Redlichkeitserklärung**

Ich bestätige, dass ich die Arbeit selbständig durchgeführt habe, sämtliche Eigen- und Fremdleistungen deklariert und die verwendeten Quellen nach den Regeln wissenschaftlichen Arbeitens nachgewiesen habe.

Koranan Blöchliger