

Aus dem
Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

Sektion Humanparasitologie
Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner

**Asymptomatische *Plasmodium falciparum* Infektion
erwachsener Männern in Lambaréné, Gabun**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kai Buscalavida Köster
aus Wolfratshausen
2008

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrith

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Iftner

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	4
2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	6
2.1	Abbildungen.....	6
2.2	Tabellen.....	6
3	Abkürzungen.....	7
4	Malaria.....	9
4.1	Geschichtlicher Hintergrund.....	9
4.2	Kreislauf zwischen Mensch und Mücke.....	10
4.3	Krankheitsbilder und Pathophysiologie.....	13
4.3.1	Symptomatische Infektion mit <i>P. falciparum</i>	13
4.3.2	Asymptomatische Infektion mit <i>P. falciparum</i>	14
4.4	Labortechnische Verfahren zur Diagnosestellung.....	15
4.4.1	Mikroskopische Diagnose.....	16
4.4.2	Diagnose durch Antigen-Bestimmung.....	17
4.4.2.1	HRP-2 (Histidin-Rich-Protein II).....	17
4.4.2.2	Aldolase.....	18
4.4.3	Genetische Diagnosestellung mittels PCR.....	20
4.4.3.1	Gen-Amplifikation.....	20
4.4.3.2	Nested-PCR.....	21
4.4.3.3	Auswertung der PCR mittels Gel-Elektrophorese.....	21
4.4.3.4	STEVR-Gene als diagnostisches Merkmal.....	22
5	Screening-Studie: Problemstellung, Zielsetzung und Durchführung.....	24
5.1	Untersuchungsgebiet.....	26
5.1.1	Lambaréné und das Hospital Albert Schweitzers.....	28
5.2	Methoden, Technik und Material.....	29
5.2.1	Auswahl der Probanden.....	29
5.2.2	Therapeutische Aspekte des Screenings.....	32
5.2.3	Diagnostische Methoden.....	33
5.2.4	Blutentnahme und "Dicker Tropfen".....	33
5.2.4.1	Technik, verwendetes Material und weitere Bearbeitung....	33
5.2.4.2	Zählverfahren.....	35
5.2.4.3	Technik und Material.....	36
5.2.5	Now® Malaria Schnell-Test.....	36
5.2.5.1	Schnell-Test, verwendete Materialien.....	38
5.2.6	STEVR-PCR/Gelelektrophorese.....	38
5.2.6.1	Technik und Material.....	40
5.3	Statistik.....	40
5.3.1	Sensitivität, Spezifität und Prädiktionswerte.....	40
5.3.2	Prüfung der Stichproben-Unterschiede.....	41
5.3.3	χ^2 und p -Wert Berechnung.....	42

6	Befundauswertung	42
6.1	Testergebnisse.....	44
6.2	Resultatkonstellationen.....	46
6.3	Vierfeldertafeln Mikroskopie & Schnell-Test vs. STEVOR-PCR.....	47
6.4	Sensitivität, Spezifität und Prädiktionswerte von Mikroskopie & Schnell-Test.....	48
6.5	STEVOR-PCR vs. Kombinationsdiagnostik von Mikroskopie & Schnell-Test.....	49
6.6	Parasitämien	51
6.7	Altersverteilung asymptomatischer Träger	53
6.8	Geografische Verteilung asymptomatischer Träger	57
7	Diskussion	60
7.1	Asymptomatische <i>P. falciparum</i> Träger	60
7.2	Vergleich der drei Test-Methoden	61
7.2.1	Mikroskopie	61
7.2.2	Schnell-Test	62
7.2.3	Stevor PCR	63
7.3	Weitere Untersuchungen	64
7.3.1	Altersverteilung asymptomatischer Träger	64
7.3.2	Geografische Verteilung asymptomatischer Träger	65
7.4	Schlussfolgerung	68
8	Zusammenfassung	71
9	Anhang	73
9.1	Rechenformeln	73
9.1.1	Statistische Maßzahlen	73
9.1.2	Konfidenzintervall-Berechnung.....	73
9.1.3	Bonferroni-Methode	74
9.2	Rechtliches	74
9.3	Verwendete Software	75
9.4	besuchte Websites.....	76
9.5	Angaben zu den kartografischen Abbildungen.....	76
10	Literaturverzeichnis	78
11	Danksagung	84
12	Lebenslauf: Kai B. Köster	86

2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

2.1 Abbildungen

Abb.1:	Entwicklungszyklus <i>P. falciparum</i>	10
Abb. 2:	Zyklus PCR	21
Abb. 3:	Gabun, geografische Lage	26
Abb. 4:	Übersicht Lambaréné	28
Abb. 5	Übersicht Ortschaften	30
Abb. 6 (a/b):	Blutentnahme	34
Abb. 7:	Beschickung Teststreifen	37
Abb. 8:	Malaria Test Kit	37
Abb. 9:	Internet Berechnungstafel	42
Abb. 10:	<i>P. falciparum</i> Verteilungen (Detektionsverfahren)	45
Abb. 11:	Altersverteilungen (gesamt)	54
Abb. 12:	Altersverteilungen (einzeln)	56
Abb. 13:	Geografische Verteilung (gesamt)	57
Abb. 14:	Geografische Verteilung (einzeln)	59

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abbildungen unterliegen, sofern nicht anders angegeben, den alleinigen Urheberrechten des Verfassers Kai Buscalavida Köster.

2.2 Tabellen

Tab. 1:	Befunde der Detektionsverfahren	44
Tab. 2:	Parasitenfreie Proben vs. positive Befunde	45
Tab. 3:	Resultatkonstellationen	46
Tab. 4:	Vierfeldertafel Mikroskopie vs. STEVOR-PCR	47
Tab. 5:	Vierfeldertafel Schnell-Test vs. STEVOR-PCR	47
Tab. 6:	Leistungswerte Mikroskopie und Schnell-Test	48
Tab. 7:	Vierfeldertafel Kombinationsdiagnose	50
Tab. 8:	Leistungswerte der STEVOR-PCR	50

Tab. 9:	Fallzahlen nach Parasitämienstärke	52
Tab. 10:	Fallzahlen je Parasitämie-Gruppe	52
Tab. 11:	Alterskategorien und Befunde	54
Tab. 12a:	X^2 - Test Altersgruppen	54
Tab. 12b:	X^2 - Test Altersgruppen	55
Tab. 13:	Geografische Verteilung	55
Tab. 14a/b:	X^2 -Unabhängigkeitstest geografischer Verteilung	58

3 Abkürzungen

%	Prozent
Σ	Summe
°C	Grad Celsius, Temperatureinheit
μ	micro, = $\times 10^{-6}$
A	Adenin, Nukleinsäure, Bestandteil der Nukleotide
Abb.	Abbildung
ALA	Alanin, eine Aminosäure
ASP	Asparagin, eine Aminosäure
b	Englisch: bases, genetisches Längenmaß in Basen
C	Cytosin, Nukleinsäure, Bestandteil der Nukleotide
d.h.	dass heißt
DDT	Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan
DNA	Desoxy-Ribo-Nucleic-Acid, übliche englische Kurzform für Desoxy-Ribo Nukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acet-Säure
G	Guanin, Nukleinsäure, Bestandteil der Nukleotide
GPS	Global Positioning System
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBS	Allel für eine Hämoglobin-Protein-Variante, bei Homozygoten Trägern des Allels Auslöser der Sichelzellanämie
HIS	Histidin, eine Aminosäure
HIV	Human Immune-deficiency Virus
HRP	Histidin-Rich-Protein oder histidinreiches Protein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Kilo, = $\times 10^3$
Kb	genetisches Längenmaß in Kilo-Basen, 1Kb=1000b

m	milli, = $\times 10^{-3}$
mmHg	Blutdruck-Messungs-Einheit, Messung mittels geeichter Quecksilbersäule
mol	Teilchenzahl: $6,02214 \times 10^{23}$ (Avogadro-Zahl N_A)
P. falc.	Plasmodium falciparum
P.	Plasmodium
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
p_i HRP	für <i>P. falciparum</i> spezifisches Histidin-Rich-Protein
Pfu	Pyrococcus furiosus
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen Konzentration
Pwo	Pyrococcus woesei
rif	Gen-Gruppe für „repetitive-interspersed“ Protein-Familie von <i>P. falciparum</i>
RNA	Ribosomal-Nucleic-Acid, übliche englische Kurzform für Ribosomale-Nukleinsäure
STEVOR	sub-telomeric-variable-reading-frame, Gensequenzen von <i>P. falciparum</i>
T	Tyrosin, Nukleinsäure, Bestandteil der Nukleotide
Tab.	Tabelle
Taq	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
v.Chr.	vor Christi Geburt
var	Gen-Gruppe für „variant cytoadherence molecule“ von <i>P. falciparum</i>
WHO	World Health Organisation - Weltgesundheitsbehörde

4 Malaria

4.1 Geschichtlicher Hintergrund

So weit historische Aufzeichnungen zurückreichen sind menschliche Populationen von Krankheiten bedroht, dezimiert oder ausgelöscht worden. Auch heute noch, im Zeitalter eines sprunghaft beschleunigten Fortschritts von Medizin und Technik, wird der Mensch von einer Unzahl- für das bloße Auge oft- unsichtbarer Erreger gefährdet. Unter diesen kommt den als Plasmodien bekannten, hoch angepassten Parasiten der Wirbeltiere, eine besondere Bedeutung zu. Plasmodien zählen zu den Sporentierchen (=Apicomplexa), in deren Untergruppe der Kokzidien (=Coccidia) zu den Haemosporidien gehörende Blutparasiten, sind *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. falciparum*, die vor allem in den tropisch-feuchtwarmen Gebieten der Erde weit verbreiteten Erreger der Malaria des Menschen.¹

Die wahre Ursache der Malaria blieb bis Anfang des letzten Jahrhunderts unbekannt. Erst 1881 gelang dem französischen Militärarzt Charles Louis Alphonse Laveran während seines Kriegseinsatzes in Algerien die Entdeckung von Plasmodien im Blut von Patienten.^{2,3}

Sechzehn Jahre später erkannte Sir R. Ross (1897) vom Indian Medical Service Plasmodien in Mägen von *Anopheles*-Mücken und entdeckte so den Krankheitsüberträger der Malaria.⁴ Der italienische Pathologe Amico Bignami (1899) deckte schließlich mit seinen Untersuchungen an der Königlichen Universität in Rom den Infektionsweg der Malaria über den Stich mit Plasmodien infizierten Mücken auf.⁵

Die Entwicklung hoch auflösender Mikroskope, revolutionäre Erkenntnisse in der Biochemie und der große Fortschritt der Genforschung haben in den vergangenen drei Jahrzehnten ein vertieftes Verständnis der Biologie des Erregers, seiner Pathophysiologie, sowie die Mechanismen der Krankheitsübertragung ermöglicht.

4.2 Kreislauf zwischen Mensch und Mücke

Etwa 30 Mückenarten der Gattung *Anopheles* (Fam. *Culicidae*) sind als Vektor für eine Infektion des Menschen mit Malaria von Bedeutung. Auf dem afrikanischen Kontinent vor allem zu den Arten *Anopheles gambiae* und *Anopheles funestus*^{6, 7}; die Mücken werden zu Überträgern der Krankheit, indem sie über ihre Blutmahlzeit aus dem Krankheits-Reservoir eines bereits mit Plasmodien infizierten Menschen die Erreger aufnehmen, die dann im Mücken-Organismus einen besonderen Entwicklungsprozess durchlaufen und bei einem erneuten Stich über den Mückenspeichel weitere Menschen befallen können.

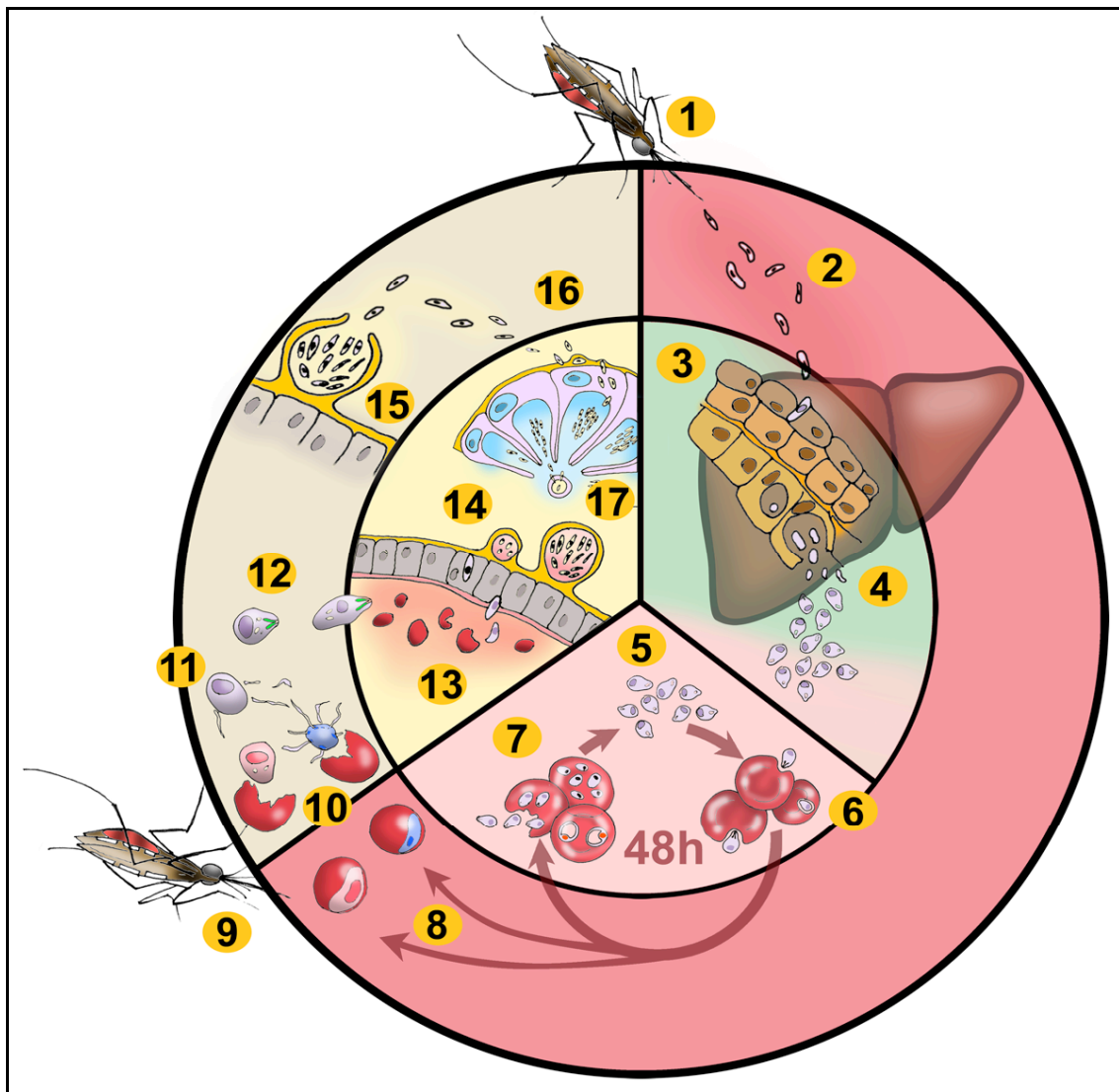


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *P. falciparum* (nach Sherman 1998).

Dieser komplexe Zusammenhang zwischen dem parasitären Einzeller, dem Vektor Insekt, und dem Menschen als Wirt, soll am Beispiel des Infektions- und Entwicklungskreislaufs der *Malaria Tropica* (*P. falciparum*) schematisch dargestellt (Abb. 1), und in seinen wesentlichen Zügen kurz beschrieben werden.

Durch den Stich einer von *P. falciparum* befallenen Mücke (1), gelangen Plasmodium-Sporozoitien aus der Speicheldrüse der Mücke in den Blutkreislauf des Menschen. Über den Blutstrom gelangen diese Entwicklungsstadien des Parasiten daraufhin in die Leber (2), wo sie sich an die Kupfer-Zellen des Leberparenchyms binden, und dann auf einem wissenschaftlich derzeit noch nicht vollends geklärten Weg die Hepatozyten invadieren (3). Nach asexueller Reproduktion und Reifung bilden sich innerhalb von etwa 6 Tagen aus den Sporozoitien von *P. falciparum* hepatische Schizonten, welche die befallenen Leberzellen zerstören und Tausende von Merozoiten in den Blutstrom freisetzen (4)^{a 8}. Diese binden an Erythrozyten (5) und gelangen durch Eigenbewegungen und ein kompliziertes Zusammenspiel diverser Oberflächenproteine und ausgeschütteter Enzyme, über Invagination (Einstülpung) der Erythrozytenmembran in die roten Blutkörperchen (6). Dort verwandelt sich jeder Merozoit in die mikroskopisch auffällige Ringform des Parasiten und wird später zum Trophozoiten, der wiederum nach asexueller Reproduktion und weiterer Reifung als Blut-Schizont, eine neue Generation von Merozoiten bildet. Schließlich werden durch Ruptur der roten Blutkörperchen (7) etwa 16 Merozoiten pro Erythrozyt in den Blutstrom entlassen. Diese befallen wiederum neue Erythrozyten (6) und so kommt es bei *P. falciparum* zu Reinfektions-Zyklen mit einer Dauer von ca. 48 Stunden^{b 9}, die bei ungenügend immunologischer Abwehr und Ausbleiben medikamentöser Therapie, in der Regel innerhalb weniger Tage zu einer

^a Im Gegensatz zu *P. falciparum*, können *P. vivax* und *P. ovale* in der Leber Ruhestadien (Hypnozyten) entwickeln die noch Wochen bis Monate nach der ersten Infektion für Krankheitsrückfälle sorgen können.

^b In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß der erythrozytäre Fortpflanzungszyklus beim Erreger der Malaria Tertiana (*P. vivax*) und ihrer Varianten (*P. ovale*) ebenfalls in 48 Stunden abläuft, während er bei der Malaria Quartana (*P. malariae*) etwa 72 Stunden dauert. Auch Mischinfektionen sind möglich.

ausgeprägten Anämie mit lebensbedrohlichen Organschäden führen. Unabhängig davon entstehen aus einigen der Merozoiten im Erythrozyten langlebige, geschlechtliche Formen, die Gametozyten (8). Wird ab diesem Zeitpunkt der an *P. falciparum* erkrankte Mensch von einer weiblichen Mücke gestochen (9), so können durch die Blutmahlzeit männliche und weibliche Gametozyten in den Verdauungstrakt der Mücke gelangen. Die sich durch den plötzlichen Übertritt vom Blut des homoiothermen Menschen in den Darm der poikilothermen Mücke ergebende Abnahme von 2 bis 5° C in der Temperatur der Umgebung des Parasiten, löst dann bei einer gleichzeitigen Veränderung der pH-Werte dieser Umgebung, seine Gametogenese (10) aus: Die männlichen Gametozyten entwickeln sich mit Exflagellation zu Mikrogameten, während die weiblichen Gametozyten innerhalb kürzester Zeit ihr Volumen deutlich vergrößern und zu Makrogameten heranwachsen. Daraufhin bildet ein eher geringer Anteil dieser Gameten, nach geschlechtlicher Fusion und dem Verlust ihrer Flagellen, im Verlauf von etwa einer Stunde Zygoten aus (11), die in den folgenden 18 bis 36 Stunden zu mobilen Ookineten werden (12), welche sich an die peritrophische Schicht der Darmwand der Mücke anbinden (13), diese penetrieren und das Darmepithel durchwandern.

In einem Zeitraum von 1 - 15 Tagen wächst dann ein wiederum nur kleiner Teil dieser Ookineten zwischen Darmepithel und Basallamina zu Oozysten heran (14).

Durch Zellteilung entsteht daraufhin aus der Oozyste ein Sporoblast, der nach abgeschlossener Reifung lysiert (Selbstaflösung) (15), und dabei eine Vielzahl von Sporozoiten in das Hämozoel der Mücke entlässt. Von dort aus gelangen diese Sporozoyten dann in die Speicheldrüsen der Mücke (16), indem sie erst die Basallamina dieser Drüsen durchdringen, und anschließend die Speichelzellen penetrieren. Nach erfolgter Durchwanderung des Zellplasmas, treten die Sporozoiten dann am apikalen Ende der Speicheldrüsenzellen in das Lumen der Speicheldrüsen aus, wo sie sich bündelartig organisieren (17), um beim nächsten Stich der Mücke mit deren gerinnungshemmendem Speichel in den menschlichen Blutkreislauf injiziert zu werden (1).¹⁰

4.3 Krankheitsbilder und Pathophysiologie

4.3.1 Symptomatische Infektion mit *P. falciparum*

Das klinisch unspezifische Krankheitsbild der Malaria ist Konsequenz der asexuellen Fortpflanzung humanpathogener Plasmodien in ihrer erythrozytären Phase, die beginnende Krankheit äußert sich dabei häufig in Unwohlsein, Appetitverlust, Kopfschmerzen und Fieber.¹¹

Der Krankheitsverlauf wird maßgeblich von der Erreger-Art und der immunologischen Abwehrlage des betroffenen Individuums bestimmt. Bei mangelhafter Abwehrlage des Immunsystems verschlechtert sich das Befinden des Erkrankten progressiv. Es kommt zum Erscheinen von Symptomen wie starkem Schüttelfrost, Schweißausbrüchen, Gelenkschmerzen, hochgradiger Erschöpfung, Übelkeit und Erbrechen. Insbesondere im Falle der von *P. falciparum* ausgelösten *Malaria Tropica* kann beim medikamentös oder immunologisch Ungeschützten die Krankheit mit Hyperlaktatämie^{12, 13} und Hypoglykämie, akuten Nierenschäden durch Tubulusnekrose¹⁴, Netzhaut-, Knochenmark- oder Herzmuskelschäden¹⁵, einen fulminanten Verlauf mit letalem Ausgang nehmen.

Im Fall der explosiven Vermehrung von *P. falciparum* kommt es dabei zu einer generalisierten, schubweisen Zerstörung der roten Blutkörperchen, mit anschließender Freisetzung von deren zellulären Bestandteilen ins Serum; gemeinsam mit Antigenen des Parasiten, können diese Stoffe dann eine starke Immunreaktion des Körpers auslösen, bis hin zum Kreislaufschock.

Die dabei deutliche Erhöhung bestimmter Zytokine im Blutkreislauf, insbesondere Tumor-Nekrose-Faktor TNF- α ¹⁶ und pro-inflammatorische Interleukine, wie IL-1 β und IL-6¹⁷, sowie die vermehrte Freisetzung von Stickstoffmonoxid und freien Sauerstoffradikalen weisen Parallelen zu einem septischen Syndrom mit überschießender Immunreaktion auf.¹⁸

Die besondere Pathogenität von *P. falciparum* ergibt sich auch aus den Eigenschaften der Oberfläche des Parasiten, die ihm die Sequestration, d.h. die Anheftung, am Endothel von Kapillaren und Venolen ermöglichen; diese

Zytoadhärenz führt in den befallenen Organen zur disseminierten Störung der Mikrozirkulation.¹⁹

Parasitämien von über 500.000 Parasiten/ μ l sind ein Befund der aufgrund einer drohenden, ausgedehnten Hämolyse die unmittelbare medizinische Behandlung des Erkrankten fordert.²⁰

Die gefährlichste Form einer Infektion mit *P. falciparum* ist die Zerebrale Malaria.²¹ Dabei führt die Sequestration der Parasiten in Kapillaren des Zentralen Nervensystems zu Störungen der Blutperfusion und -gerinnung, zu Gefäßpermeabilität und Defekten der Blut-Hirn-Schranke. Es kommt zu Ödemen in den betroffenen Hirnarealen, zu Infarkten und Hämorrhagien, die sich klinisch mit Fieberschüben, Bewusstseinstörung, Konvulsionen und dem Übergang in komatöse Zustände manifestieren können.²²

4.3.2 Asymptomatische Infektion mit *P. falciparum*

Nicht jede Infektion mit *P. falciparum* führt zu einer schweren Erkrankung, insbesondere in Bevölkerungsgruppen, die über lange Zeiträume schutzlos Malariaerregern ausgesetzt waren oder sind, findet sich eine oft große Zahl symptomfrei Infizierter.²³

Einerseits erscheint dies durch frühere Infektionen mit diesem Parasiten, und eine sich daraus ergebende, von niedrigen Parasitämien mit sexuellen und/oder asexuellen Plasmodien-Formen charakterisierte Teil-Immunität dieser Menschen erklärbar, andererseits aber dürften auch deren durch den starken Selektionsdruck der Krankheit bedingten genetischen Ausgangsbedingungen mit verbesserten immunologischen Abwehrvoraussetzungen, oder physiologische und hämatologische Besonderheiten dafür von Bedeutung sein.²⁴

Bei der Abwehr der Parasiten hat die Produktion von spezifischen Immunglobulinen vom IgG-Typ einen wesentlichen Einfluss, denn das menschliche Immunsystem erkennt und zerstört den Parasiten hauptsächlich aufgrund seiner Antigen-Konfigurationen.²⁵

Bisher kann der Mensch gegen *P. falciparum* jedoch nur teilweise immun

werden.²⁶ Die nahezu unendlichen Kombinations- und Rekombinationsmöglichkeiten der Antigene dieses Blutparasiten lassen eine vollständige Resistenz gegen ihn derzeit noch unmöglich erscheinen; jeder seiner Stämme bildet durch inter-clonale Variation seine eigenen, spezifischen Antigen-Kombinationen und kann diese mittels intra-clonaler Variation auch innerhalb des gleichen Stammes noch modifizieren, somit kann das Immunsystem des Wirts jeweils nur eine spezifische, und dann auch nur zeitliche begrenzte Resistenz gegen einzelne Stämme seines Parasiten aufbauen.²⁷

Die relative Seltenheit asymptomatischer Träger von *P. falciparum* unter Kleinkindern, weist auf die entscheidende Rolle der spezifischen Immunabwehr und der altersgebundenen Reifung^{28, 29}, des Immunsystems dieser Kinder hin, doch auch in diesem Alter reichen bereits zwei überlebte Malaria-Episoden, um einen Schutz vor schwersten Formen der Malaria aufzubauen.³⁰

4.4 Labortechnische Verfahren zur Diagnosestellung

Wegen der verhältnismäßig unspezifischen Krankheitssymptome der Malaria, ist ihre eindeutige Diagnose auf klinischem Weg auch heute noch unmöglich.³¹

In der Regel werden daher labortechnische Verfahren zur Diagnosestellung eingesetzt, vornehmlich die altbewährte und weltweit übliche, mikroskopische Untersuchung von Blutproben. In Folge der besonders während der letzten Jahrzehnte vor allem in den Bereichen Molekularbiologie und Genetik hinzugekommenen Erkenntnissen, stehen neuerdings jedoch auch die Möglichkeiten einer Diagnose dieser Krankheit durch Antigen-Bestimmung und ihre Erkennung anhand einer Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction: PCR) zur Verfügung.

Beide Verfahren sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

4.4.1 Mikroskopische Diagnose

Die **mikroskopische Diagnose** wird über die Untersuchung kleiner, laborchemisch eingefärbter Blutmengen auf gläsernen Objektträgern bei meist 100facher Vergrößerung durch ein Öl-Immersions-Objektiv im Mikroskop gestellt.

Bei der in dieser Studie verwendeten Methode mit Untersuchung des „Dicken Tropfen“ wird die auf den Objektträger aufgetragene Blutmenge nur geringfügig ausgestrichen, so dass die Erythrozyten- und Parasitendichte pro Blickfeld möglichst groß ist. Diese hohe Konzentration der Erythrozyten würde bei alkoholischer Fixierung zellulärer Bestandteile zu einer Undurchsichtigkeit der Probe führen, weshalb die Erythrozyten nach ihrer ersten Trocknung mit der darauf folgenden, 20minütigen Giemsa^c-Färbung osmotisch zerstört werden, so dass nach zweiter Trocknung und Betrachtung im Mikroskop etwaig vorhandene Parasiten frei vor durchsichtigen Schatten roter Blutkörperchen sichtbar sind.

Die quantitative Bestimmung der Plasmodien ergibt sich im Dicken Tropfen aus Verrechnung der in den Blickfeldern pro Leukozyt erfassten Parasiten mit der entweder labortechnisch bestimmten oder auf circa 8000 Zellen pro μL Blut geschätzten Konzentration der Weißen Blutkörperchen in der Probe.

Für dieses Verfahren ist die notwendige Erfassung zusätzlicher Blutwerte mit anderem Gerät von praktischem Nachteil.

^c Die nach dem Hamburger Chemiker Gustav Giemsa (1867-1948) benannte Giemsa-Färbung ist eine in der histopathologischen Diagnostik häufig verwendete Färbungsmethode, die in der mikroskopischen Detektion der Malaria-Parasiten, der Plasmodien eine wichtige Stellung eingenommen hat. Sie besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin. Zellkerne erscheinen im gefärbten Ausstrich durch Färbung der DNA leuchtend rot; das Zytoplasma stellt sich bläulich eingefärbt dar.

Am Forschungslabor in Lambaréné/Gabun wurde deshalb eine Modifikation der Methode des Dicken Tropfens entwickelt, die durch Auftragung einer definierten Menge Blut auf ein Feld definierter Größe auf dem Objektträger eine ausreichend einheitliche und bekannte Erythrozytendichte schafft, so dass die Parasitenkonzentration effizient und ohne weitere Untersuchungen bestimmt werden kann.³²

4.4.2 Diagnose durch Antigen-Bestimmung

Der für die mikroskopische Malariabestimmung notwendige zeitliche und technische Aufwand gemeinsam mit der vom diagnostizierenden Personal erforderten Erfahrung am Mikroskop hat in den vergangenen zwei Jahrzehnten zur wissenschaftlichen Suche alternativer Testmethoden geführt. Der große Fortschritt im Bereich der immunologischen Molekularbiologie hat es ermöglicht, dass heute hochspezifische Antikörper gegen bestimmte Antigene produziert werden können, um diese zu markieren und mittels Färbung, Fluoreszenz oder über radioaktive Markierung sichtbar zu machen. Mehrere einfach handhabbare Schnell-Test-Systeme sind heute in Form von Test-Kassetten oder Faltheftchen mit Teststreifen und beizufügenden Reagenzienlösungen auf dem Markt erhältlich. Diesen Diagnose-Verfahren unterschiedlicher Qualität und Leistung ist gemein, dass sie auf der immunologischen Erfassung und Präsentation bestimmter Moleküle basieren, die von einem oder mehreren Plasmodien-Typen produziert werden.³³

In den folgenden Abschnitten werden die zwei immunologisch markierbaren Moleküle beschrieben, die bei dieser Studie mit dem Binax NOW[®] Malaria Antigen-Test der pharmazeutischen Firma ICT eingesetzt wurden.

4.4.2.1 HRP-2 (Histidin-Rich-Protein II)

Die *Histidin-Rich-Proteins* (HRP) sind eine von Plasmodien sezernierte Proteingruppe, die zuerst bei der Untersuchung der von *P. lophurae*

verursachten Vogel-Malaria entdeckt und beschrieben wurden und aufgrund ihres hohen Anteils von bis zu 73% der Aminosäure Histidin zu ihrer Bezeichnung kamen.³⁴

Im Fall von *P. falciparum* handelt es sich bei dem teilweise Strukturhomologen p_fHRP-2 um das Zweite von drei bekannten p_fHRP, das zu 34% aus *Histidin*, zu 10% aus *Alanin* und zu 10% aus *Asparagin* besteht.³⁵ Die Sequenzen *Ala-His-His-Ala-Ala-Asp* und *Ala-His-His* sind im p_fHRP-2-Protein mehrfach vertreten.³⁶

Die Funktionen von HRP-2 *in vivo* sind noch nicht vollständig geklärt, doch aus Versuchen konnte abgeleitet werden, dass HRP-2 eine entscheidende Rolle bei der Degradation toxischer Abbauprodukte aus dem Stoffwechsel des Parasiten hat. Der Protein-Stoffwechsel der *Plasmodien* ist auf die Proteolyse des Hämoglobins im Erythrozyten angewiesen. Dieser Prozess setzt giftiges Häm frei, das bei Akkumulation in der parasitären Vakuole und dem erythrozytären Zytoplasma zur Membranzerstörung und Lyse des roten Blutkörperchens führt.

p_fHRP-2 wird von allen natürlich vorkommenden *P. falciparum* Stämmen produziert und wird deshalb als wichtiges Marker-Protein bei der Malaria-Diagnostik mit Antigen-Tests herangezogen.³⁷

Der im Rahmen dieser Studie eingesetzte NOW[®] Malaria Schnelltest bindet in Vollblut-Proben vorhandenes p_fHRP-2 an fixierte Antikörper auf Teststreifen.³⁸ Anschließend gelingt die optische Darstellung durch spezifische Färbung mit kolloidalen Goldpartikeln.

4.4.2.2 Aldolase

Der Stoffwechsel der *Hämosporidae* ist stark an die jeweiligen Wirtsorganismen angepasst. In der erythrozytären Phase der humanpathogenen Plasmodien ist deren Substrat für die Energiegewinnung auf die Inhalts- und Aufbaustoffe der roten Blutkörperchen beschränkt.

In Abstimmung mit dem Nährstoffangebot wird im parasitären Metabolismus nicht der Zitronensäure-Zyklus durchlaufen, sondern die Energiegewinnung fast ausschließlich über die Glykolyse erreicht.³⁹

Aufgrund der biochemischen Anforderungen an das Enzym bestehen große Übereinstimmungen im Aufbau der humanen und der plasmodialen Aldolase. Insbesondere die Aminosäurefolgen im aktiven Zentrum des Enzyms sind nahezu identisch. Trotzdem bestehen ausreichende Sequenzunterschiede, die eine spezifische immunochromatographische Detektion der *P. falciparum*-Aldolase möglich machen.^{40, 41, 42, 43}

Weiter konnte wissenschaftlich gezeigt werden, dass auch die für Aldolase codierenden Genomabschnitte verschiedener Stämme von *P. falciparum* hochkonserviert sind. Eine durch Antigenvariationen verfälschte Detektion ist daher als sehr unwahrscheinlich anzusehen.⁴⁴

Aus diesem Grund findet die Aldolase, gemeinsam mit HRP-2 und dem Enzym Laktat-Dehydrogenase, ihre Anwendung als spezifisches Antigen bei der vorwiegend qualitativen Bestimmung von Plasmodien in immunochromatographischen Testverfahren.⁴⁵

4.4.3 Genetische Diagnosestellung mittels PCR

4.4.3.1 Gen-Amplifikation

Die PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) ist eine von Kary Mullis 1983 entwickelte enzymatische Technik zur exponentiellen Vervielfältigung genetischen Materials *in vitro*.⁴⁶

Das PCR-Verfahren ist eine hochsensible Methode, bei der typischerweise etwa 10Kb kurze DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Sie verlangt sterile Arbeitsbedingungen und kommt bei molekularbiologischen Untersuchungen zur Detektion spezifischer DNA-Sequenzen in zahlreichen abgewandelten Verfahren und in vielen Arbeitsgebieten zum Einsatz. Das Verwendungsspektrum reicht dabei von Vaterschaftstests, über forensische Untersuchungen bis zur Synthese von Erbgut bei Gen-Manipulation.^{41,42,47}

Das PCR-Verfahren wird heutzutage üblicherweise in Thermozyklern durchgeführt. Diese Geräte verändern die Temperatur ihrer Reaktionskammer und der darin enthaltenen Reagenzien in definierbaren Sequenzen von Heiz- und Abkühlungsdauern. Während jedes Zyklus wird zuerst der DNA-Strang mit seiner zu vervielfältigenden Gensequenz in seine 2 komplementären Hälften denaturiert. Dieser Prozess findet bei der Erhitzung der Reaktionslösung auf 94-98°C statt und wird als Schmelzung der DNA bezeichnet. Anschließend wird die Reaktionslösung abgekühlt, so dass es zur Primerhybridisierung (engl. primer annealing) kommt: Die zwei spezifischen Primer, kurze, synthetische DNA-Stränge, die als Replikations-eingrenzende Elemente dem Gemisch beigefügt wurden, können an die korrespondierenden DNA-Abschnitte binden. Dieser Prozess der im Temperaturoptimum der gewählten Polymerase ablaufen sollte, wird als Elongation bezeichnet.^{41,42,48}

Hierbei werden Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* oder die Enzyme *Pwo* oder *Pfu* von Archaeobakterien verwendet.

Diese Enzyme überstehen die hohen Temperaturen der Reaktionszyklen im Thermozykler ohne Funktionsverlust.⁴⁹ Das beigemengte Puffergemisch stellt das geeignete Medium für die eingesetzten Polymerasen dar.^{47,48}

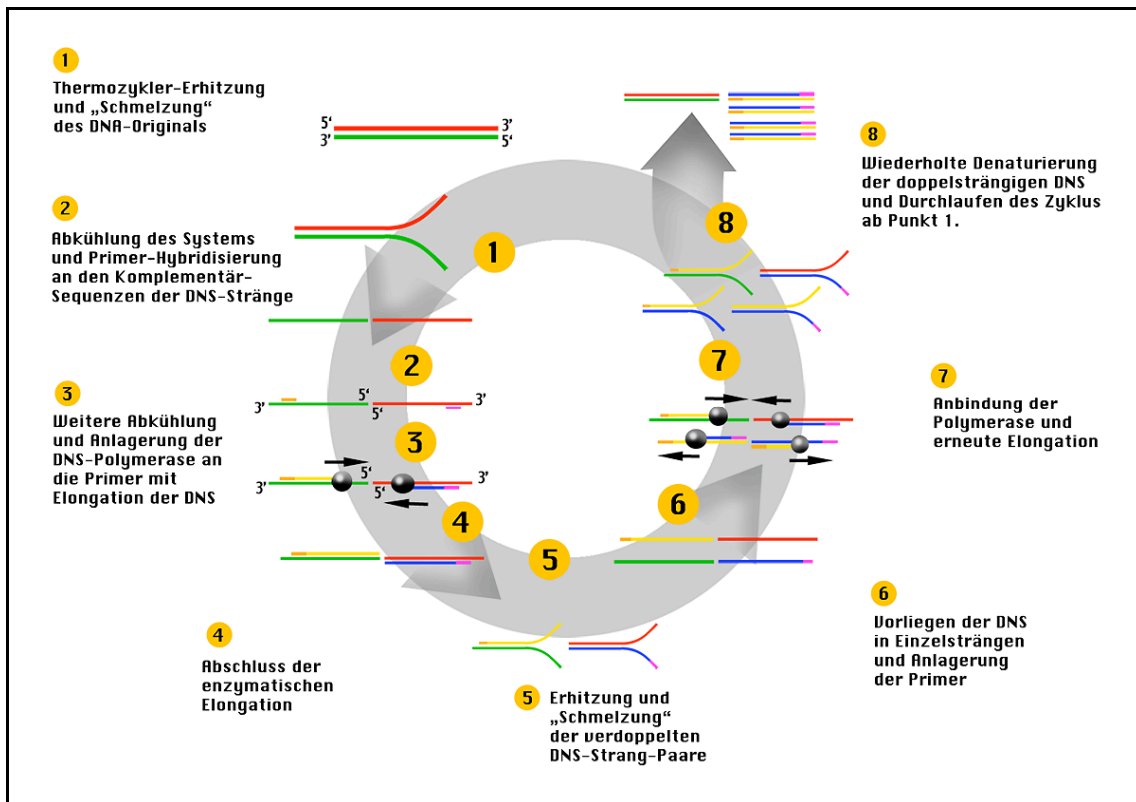


Abbildung 2: Schematischer PCR Ablauf (nach McPherson & Møller 2006).

4.4.3.2 Nested-PCR

Die „nested-PCR“ stellt eine Modifikation des PCR-Verfahrens mit zwei verschiedenen Primer-Paaren und zwei aufeinander folgenden Replikationssätzen dar. Zunächst wird mit dem ersten Primer-Paar eine größere DNA-Sequenz repliziert, bis diese in der erwünschten Menge verfügbar ist. Dieses Reaktionsprodukt dient als Matrize für das zweite Primer-Paar, das, innerhalb der im ersten Satz synthetisierten DNA-Stränge, eine kleinere DNA-Sequenz eingrenzt und replizieren lässt. Durch diese zwei Primer-verschiedenen Replikations-Sätze kann eine deutlich erhöhte Sensitivität bei erhöhter Kontaminationsanfälligkeit erreicht werden. auch nachteilig. ^{47, 48}

4.4.3.3 Auswertung der PCR mittels Gel-Elektrophorese

Die Diskriminierung des mittels PCR vervielfachten, genetischen Materials gelingt durch Einsatz der Gel-Elektrophorese, einer analytischen Methode der

Molekularbiologie zur Trennung verschiedener Moleküle. Die zu trennende Probenmischung der PCR-Produkte wird zur Sichtbarmachung mit einem an DNA bindenden Farbstoff vermischt und anschließend neben einer positiven Kontroll-Probe in ein Agarose-Gel gegeben. Dieser Gel-Träger ist in eine ionische Pufferlösung gebettet, und ein elektrischer Strom wird zwischen beiden Enden angelegt. Im elektrischen Feld kommt es zur elektrophoretischen Wanderung des Proben- und Kontrollmaterials, wobei die Gel-Matrix als Molekularsieb die Moleküle nach Größe, Ladung und Ladungsstärke unterschiedlich schnell wandern lässt. Diese Auftrennung der zu prüfenden Komponenten lässt im Gel mehrere Banden entstehen, die im Vergleich zu Kontrollbanden aus der positiven Begleitprobe den Beweis oder Ausschluss der gesuchten Gene in der Probe liefert.^{40, 41, 42, 47, 48, 50}

4.4.3.4 STEVOR-Gene als diagnostisches Merkmal

Zur Diagnose von *P. falciparum*-Genen im Probenmaterial können verschiedene, spezifische Gensequenzen des Erregers als diagnostisches Merkmal verwendet werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde am Institut für Tropenmedizin der Eberhard-Karls Universität zu Tübingen die STEVOR-PCR gemäß dem Protokoll von Cheng (1997)⁵¹ und der von Sylla (2000)⁵² beschriebenen Prozedur zur Diagnose von Plasmodien in menschlichem Blut angewendet.

Es handelt sich dabei um eine „nested-PCR“, die, bei Einsatz der folgenden Primer **P5**, **P18**, **P19** und **P20** in Phase I und **P17** und **P24** in Phase II, spezifische Gen-Abschnitte der 14 Chromosomen von *P. falciparum* repliziert. Diese Gen-Sequenzen sind auf den Chromosomen meist unterhalb der Telomere in etwa 50Kb Abstand zu diesen platziert und liegen auf dem Genom 34fach vor.

Die als STEVOR-(sub-telomeric variable open reading frame)-Gene bezeichneten Gensequenzen sind vermutlich Teil einer Superfamilie variabler Oberflächen-Antigene von *P. falciparum*.⁵³

Die genaue Funktion von *STEVOR* ist noch unklar, doch Untersuchungen ergaben, dass von *P. falciparum* *STEVOR*-Transkripte in unterschiedlichem Maße und über verschiedene Zelltransporte und Kompartimente in allen Stadien bereitgestellt werden.^{54,55}

Man vermutet, dass die *STEVOR*-Genfamilie für lebenswichtige und multifunktionale Proteine des Parasiten codiert, so dass die natürliche Existenz von *P. falciparum* Stämmen ohne *STEVOR*-Gene als sehr unwahrscheinlich erachtet wird.^{56,57}

Bei ordnungsgemäßer und steriler Vorgehensweise erlaubt daher die Verwendung von *STEVOR* als genetisches Erkennungsmerkmal eine sehr sichere Diagnostik des Erregers bis zu Konzentrationen von 0,01/µL.⁵¹

5 Screening-Studie: Problemstellung, Zielsetzung und Durchführung

Obwohl die Malaria vorwiegend in den Tropen der armen Länder beheimatet ist und pro Jahr ca. 1 Million Menschenleben⁵⁸ fordert, sollte sie nicht als ein nur auf tropische und subtropische Gebiete der Erde beschränktes Gesundheitsproblem des Menschen betrachtet werden.

Die explosive Zunahme der menschlichen Weltbevölkerung, die Flucht vor Hungersnot, politischer Unterdrückung und Verfolgung, Kriege oder Naturkatastrophen, aber auch internationale Arbeitssuche und Tourismus, gepaart mit der neuen Vielzahl an Reise- und Transportmöglichkeiten führen dazu, dass eine immer größere Zahl von Menschen zeitweise oder auch langfristig ihre Heimat verlässt und in andere Länder umsiedelt.⁵⁹ Alleine die Zahl der weltweit vertriebenen Flüchtlinge belief sich im Jahr 2005 auf geschätzte 20,8 Millionen Menschen.⁶⁰

Diese enormen Populationsverlagerungen bedeuten, dass Krankheiten in deren Folge über den gesamten Erdball und in alle seine Klimazonen verschleppt, und ihre mitreisenden Erreger unter dort für sie günstigen Bedingungen heimisch werden können. Finden sie geeignete Überträger, Zwischen- und Endwirte, kann sich die durch sie verursachte Krankheit über ehemals limitierende, natürliche Hürden wie Weltmeere, Wüsten oder Bergketten hinweg ausbreiten, um dann in der neuen Heimat zu einem dauerhaften Problem zu werden.

Die ab etwa dem 15. Jahrhundert durch spanische und portugiesische Eroberer erfolgte Verschleppung der Malaria (*P. malariae* & *P. vivax*) nach Südamerika kann hier als Beispiel herangezogen werden, ebenso das dortige, spätere Auftreten von *P. falciparum* in der Folge des Sklavenhandels mit Afrika; beides hatte verheerende Auswirkungen für die primär ungeschützten Ureinwohner dieses Kontinents, und fordert unter diesen auch heute noch viele Opfer.⁶¹

Angesichts der weltweiten Bedeutung der Malaria, als eine der am meisten verbreiteten und zugleich tödlichsten Krankheiten des Menschen⁶², sollte die Entwicklung von verhältnismäßig einfachen, billigen und auch treffsicheren Methoden für ihre rechtzeitige Erkennung, ein Ziel von globaler Wichtigkeit für heutige und zukünftige Generationen sein.

Hinsichtlich der verschiedenen Möglichkeiten eine Malaria, am symptomatisch Infizierten, korrekt zu diagnostizieren, hat es vor allem in den vergangenen Jahrzehnten große Erfolge in der medizinischen Wissenschaft und Forschung und auch in den Belangen der Labortechnik gegeben. Der Notwendigkeit hingegen, auch asymptomatische Träger dieser Krankheit sicher erkennen zu können ist bisher viel weniger Aufmerksamkeit geschenkt worden. Auch die Bedeutung dieser, möglicherweise in die Millionen gehenden, unauffällig Infizierten, für die weltweit fortschreitende Ausbreitung der Malaria und die Rolle dieser vermeintlich Gesunden als deren weitgehend unsichtbares Reservoir sind bisher unzureichend untersucht worden.⁶³

Angesichts dessen, und als Beitrag zum Schließen der hier noch bestehenden Wissenslücken, habe ich, in Zusammenarbeit mit einer am Forschungslabor des Albert Schweitzer Hospitals in Lambaréné tätigen, internationalen Gruppe von Wissenschaftlern aus Europa und Afrika, in den Jahren 2005 bis 2006 eine Screening-Untersuchung in dieser Stadt und ihrer Umgebung durchgeführt.

Das Hauptziel dieser Untersuchung war die Identifizierung von asymptomatischen Trägern von *P. falciparum* unter der erwachsenen, männlichen Bevölkerung, für eine Reihe geplanter, nachfolgender Medikamentenstudien.

Die von mir im und für den vorliegenden Text ausgewerteten Datensätze und interpretierten Resultate stammen aus diesem Screening.

5.1 Untersuchungsgebiet

Die Republik Gabun liegt auf Höhe des Äquators an der Westküste Zentralafrikas, zwischen Kamerun und Äquatorialguinea im Norden, und dem Kongo im Süden und Osten.

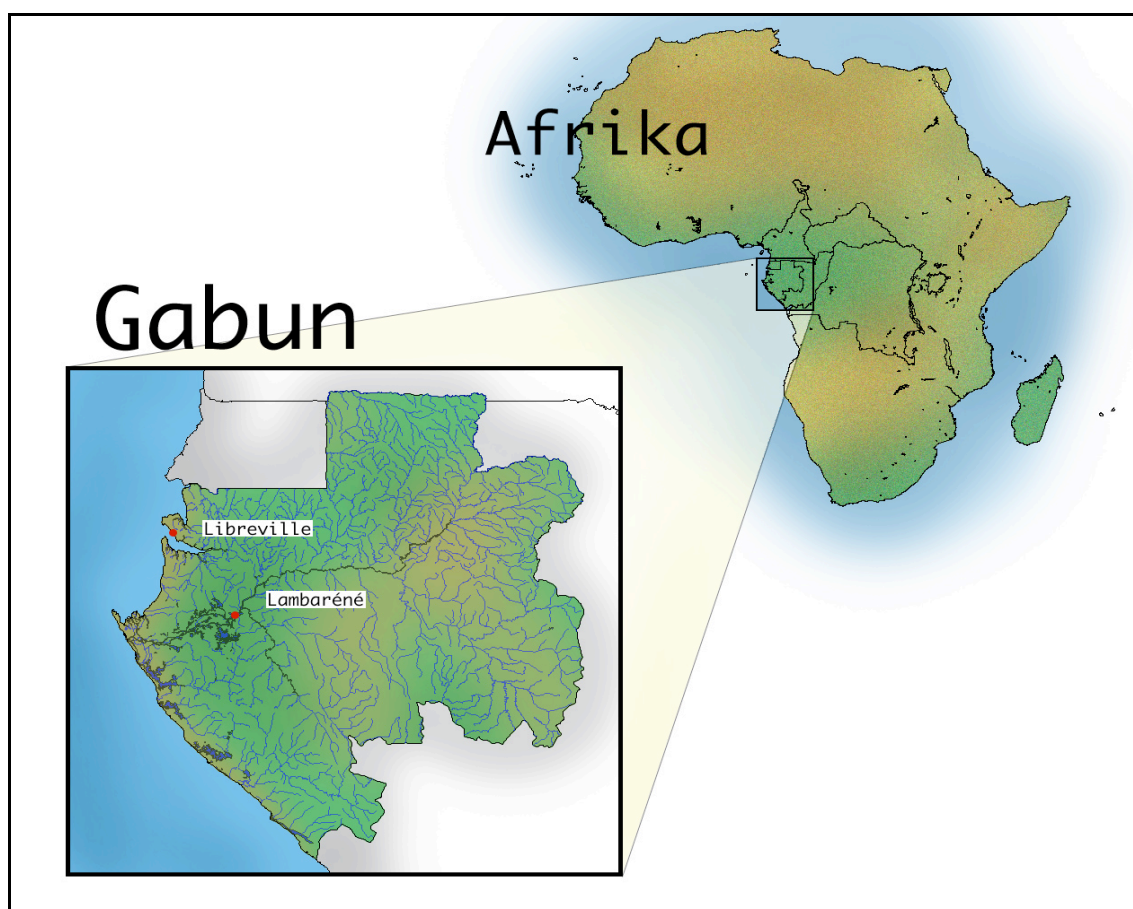


Abbildung 3: Die geografische Lage der Republik Gabun im Osten Zentralafrikas mit den angrenzenden Nachbarstaaten. In der Ansicht Gabuns (Teilausschnitt links unten), sind die Städte Libreville (Hauptstadt) und Lambaréné (Sitz des Albert-Schweitzer Hospitals), sowie das dichte Netz der Flussläufe zu sehen. (siehe Anhang 9.5)

Mit einem jährlichen Regenfall von etwa 2900 mm, einer Durchschnittstemperatur von 27°C und einer gemittelten Luftfeuchtigkeit von 85%, wird der größte Teil der etwa 267.670 Km² großen Grundfläche Gabuns zu etwa drei Vierteln von tropischem Ur- und Sekundärwald, von großen Fluss- und Seegebieten eingenommen. Die verbleibende Fläche, teils in

unmittelbarer Küstennähe, aber insbesondere im Osten Gabuns, besteht aus waldig durchsetzter Savanne. Die Große Regenzeit fällt in Gabun etwa zwischen die Monate Februar und Mai, die kürzere, jedoch intensivste Regenzeit, in die Monate September bis Dezember. Von Mai bis Mitte September tritt die große Trockenzeit ein, eine kurze Trockenperiode stellt sich von Dezember bis Januar ein. Die Gabunesische Republik war bis zum Jahr 1960 ein Teil von Französisch-Äquatorialafrika; die Amtssprache des Landes ist demnach Französisch, wenn auch von verschiedenen Bevölkerungsteilen weiterhin noch etwa vierzig einheimische Sprachen gebräuchlich sind. Die geschätzte Bewohnerzahl des Landes beträgt etwa 1,4 Millionen; von denen etwa 84% in Städten und größeren Ortschaften wie der Hauptstadt Libreville, Port Gentil, Franceville, Fougamou oder Lambaréné leben; circa 45% der heutigen Bevölkerung sind Kinder und Jugendliche. Dank seiner Bodenschätze, insbesondere Öl und Uran, des intensiven Holzabbaus und der Fischerei, zählt Gabun mit einem jährlichen pro Kopf Einkommen von etwa 3800,- € zu den wohlhabenden Ländern Afrikas; wenngleich dieser Wohlstand unter seiner Bevölkerung nur sehr ungleich verteilt ist.⁶⁴

5.1.1 Lambaréné und das Hospital Albert Schweitzers

Als viertgrößte Stadt Gabuns, liegt Lambaréné in der Provinz "Moyen-Ogooué", rund 50 Km südlich des Äquators, am Ogooué-Fluß.



Abbildung 4: Übersicht Lambaréné und seiner Stadtteile, (siehe Anhang 9.5)

Mit ganzjähriger, geringgradig schwankender Transmission der Malariaerreger, insbesondere durch die Vektoren *Anopheles gambiae* und *Anopheles moucheti*, zählt sie etwa 15.000 Einwohner und befindet sich in einem für *P. falciparum* hyperendemischen Gebiet mit den höchsten Übertragungsraten in der kurzen Regenzeit von September bis Dezember.⁵²

Der elsässische Theologe, Mediziner und Philosoph Albert Schweitzer gründete im Jahr 1913.

am Ogooué und etwas außerhalb des eigentlichen Ortes Lambaréné das Krankenhaus. Das heutige Albert Schweitzer Hospital, das zu etwa 50% von Spenden aus Deutschland und Frankreich unterhalten wird, versorgt mit seinen ca. 250 Patientenbetten, seinen Fachärzten für Chirurgie, Kinderheilkunde und Innere Medizin, den Ernährungs- und Gesundheitsberatern, Hebammen und Krankenschwestern, einen großen Teil der Bewohner Lambaréné und seiner Umgebung.

In enger Zusammenarbeit zwischen dem Tropeninstitut an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls Universität Tübingen und der vor rund 25 Jahren gegründeten "Unité de Recherches Médicales, Hôpital Albert-Schweitzer", sind dort zahlreiche Forschungsvorhaben durchgeführt, und die Ergebnisse im Rahmen medizinischer Publikationen veröffentlicht worden.

Im Umfeld dieser wissenschaftlichen Vorhaben, ist am erwähnten Forschungslabor auch die hier vorgestellte Screening-Studie und deren, der vorliegenden Dissertations-Arbeit als Ausgangspunkt dienende, Datensammlung entstanden.

5.2 Methoden, Technik und Material

5.2.1 Auswahl der Probanden

Im Hinblick auf mehrere, zunächst nur auf erwachsene Männer beschränkte, geplante Untersuchungen in Lambaréné über den Wirkungsgrad verschiedener, zur Behandlung von Malaria eingesetzter, Medikamente, waren als Probanden für die Screening-Studie nur den oben genannten, zwei Kriterien entsprechende Testpersonen im Stadtgebiet von Lambaréné ausgewählt und rekrutiert worden. Hinzu kamen Testpersonen aus Ortschaften, welche bis zu einer Entfernung von etwa 54 Km entlang der Hauptstraße von Libreville nach Fougamou gelegen waren.

Die Screeningstudie hatte im Vorfeld ein positives Votum der Ethik-Kommission des Hôpital Albert Schweitzer bekommen.

Zur Probandenrekrutierung und Blutentnahme wurden zwischen April 2005 und September 2006, insgesamt achtzig Tagesfahrten mit einem Fahrzeug der "Unité de Recherches" des Albert Schweitzer Hospitals im näheren Umfeld der Stadt Lambaréné und zu den in Abbildung 5 dargestellten Dörfern unternommen.

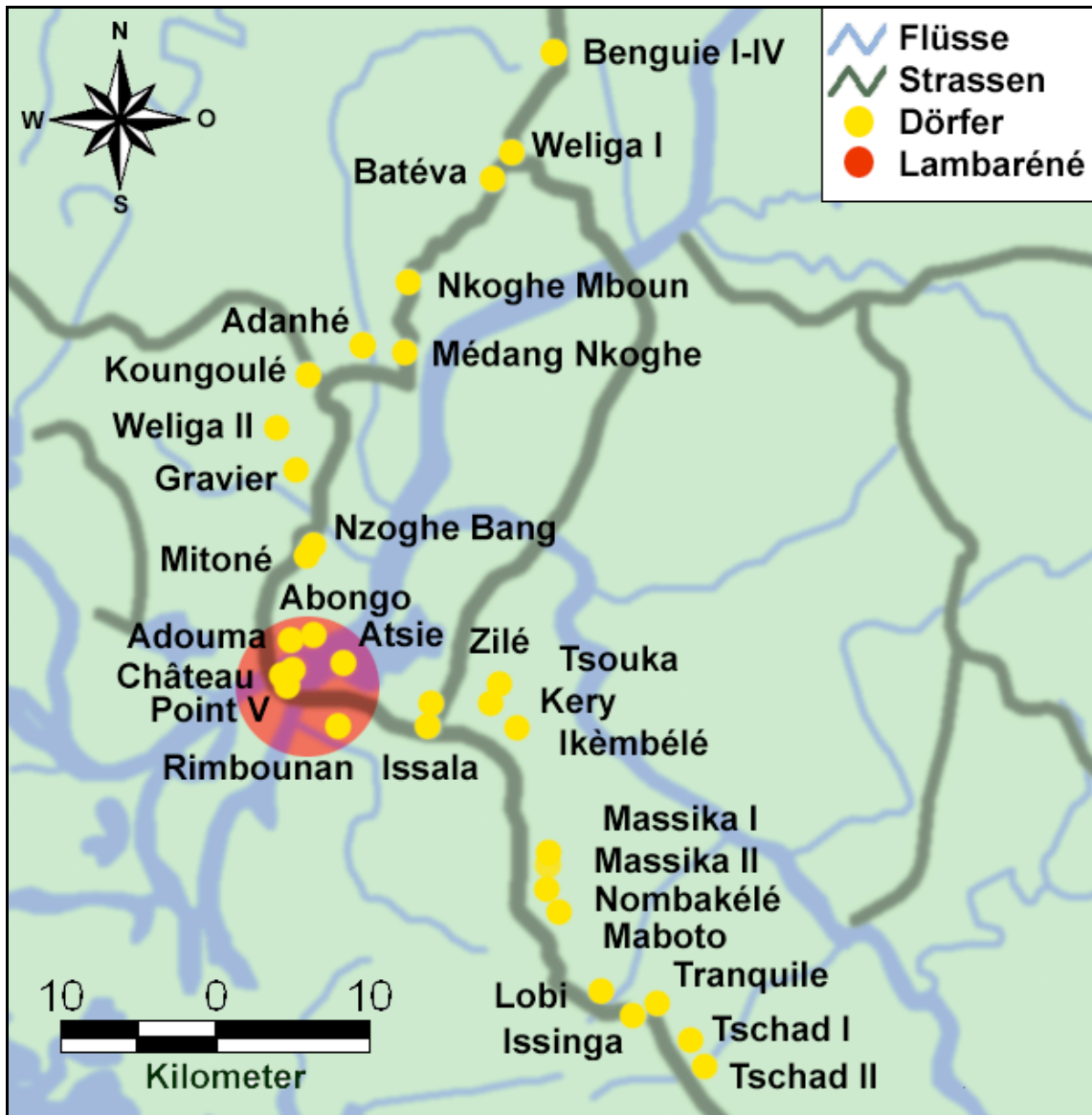


Abbildung 5: Übersicht der, zur Probandenrekrutierung besuchten, Ortschaften. (siehe Anhang 9.5)

Für einen reibungslosen Ablauf der Probanden-Befragungen und Probenentnahme wurde im Vorfeld das Einverständnis der jeweiligen "Chefs de Village" dieser Ortschaften eingeholt. Im Einzelgespräch, oder öfter noch umringt von den, dann an der Unterhaltung teilnehmenden, Dorfbewohnern, wurde jeder dieser Ältesten ausführlich über den Sinn des Screenings, die geplanten Befragungen und die Methode der Blutentnahme bei den Probanden aufgeklärt. Zusätzlich wurde bekannt gegeben, dass alle erwachsenen Männer einer Gemeinde, die an dieser Screening-Studie

teilnehmen würden, am Forschungslabor des Albert Schweitzer Hospital kostenlos behandelt werden könnten, sollte bei ihnen im Verlauf eine symptomatische Infektion mit Malaria festgestellt werden.

Sämtliche Ortsvorsteher erklärten sich ausnahmslos mit der Durchführung des Screenings in ihrer Dorfschaft einverstanden. Auch in den darauf folgenden Gesprächen mit den, für die Untersuchung in Frage kommenden Männern, in denen diese erneut, bzw. zusätzlich über das wissenschaftliche Vorhaben, den Untersuchungsaufbau und die Möglichkeit der unbezahlten Teilnahme als Proband in der Studie in Kenntnis gesetzt wurden, ergaben sich nur einige, wenige Absagen.

Hatte ein Kandidat grundsätzlich und mit schriftlicher Einverständniserklärung zugestimmt, wurde er zunächst nach allgemeinen gesundheitlichen Beschwerden, dann aber besonders nach dem etwaigen Auftreten von Malariaerscheinungen wie Fieber, Unwohlsein oder Kopfschmerzen während der vergangenen Tage befragt. Denjenigen, die sich nach eigenen Angaben vollkommen gesund fühlten, und auch vom Ärzteteam als gesundheitlich unauffällig eingestuft wurden, wurde anschließend die Möglichkeit geboten, an der Studie teilzunehmen. (Siehe hierzu auch Abschnitt 9.2 *Rechtliches* auf Seite 73)

Sobald der Proband nach nochmaliger ärztlicher Aufklärung in die dann fällige Blutentnahme eingewilligt hatte, wurden seine persönlichen Angaben (Name, Geburtsjahr, Wohnort, Datum der Probenentnahme) schriftlich festgehalten, und sofort mit den Daten aller anderen, in einer Teilnehmerliste gespeicherten Probanden der Screening-Studie verglichen, um dadurch eine möglicherweise wiederholte Teilnahme ein und derselben Person zu vermeiden.

Alle Probanden wurden ausführlich und mit schriftlicher Einverständniserklärung über die Ergebnisse der an ihnen gemachten Untersuchungen informiert, und im Fall *P. falciparum*-positiver Befunde über die möglichen Konsequenzen eines späteren Ausbruchs der Krankheit aufgeklärt.

5.2.2 Therapeutische Aspekte des Screenings

Da bei Beschwerdefreiheit der Probanden kein akuter medikamentöser Behandlungsbedarf bestand und die asymptomatische Präsenz von Plasmodien im Blut Erwachsener in Malaria-endemischen Gebieten sogar als positiver Stimulator ihres Immunsystems, somit also als protektiver Faktor gegen schwere Erkrankungsformen angesehen wird⁶⁵, wurde von einer unmittelbaren Therapie einer solchen Testpersonen abgesehen.

Im Verlauf des Screenings kam es mehrere Wochen nach der Probenentnahme bei fünf Testpersonen zum Auftreten von, mit Malaria assoziierbaren, Krankheitssymptomen. Nach klinischer Untersuchung der Patienten, sowie mikroskopischer und laborchemischer Untersuchung ihrer frisch gewonnenen Blutproben im "Laboratoire de Recherches" am Albert Schweitzer Hospital, wurden dann bei diesen fünf Probanden mit positivem *P. falciparum*-Befund die *Malaria Tropica* diagnostiziert. Unter ärztlicher Aufsicht, wurde den Betroffenen daraufhin das Medikament Artesunate (Arsumax[®] 50mg) des Herstellers Sanofi-Aventis[®] (Gentilly, Frankreich) über fünf Tage hinweg, mit 2x100mg am ersten Tag, und 2x 50mg an den folgenden vier Tagen, oral verabreicht.

Durch eine abschließende, körperliche und mikroskopische Kontrolluntersuchung der Patienten, konnte dann bei allen, durch Abklingen ihrer Krankheitssymptome und mittels negativem Dicken Tropfen, die erfolgreiche Abtötung der Malaria-Parasiten festgestellt werden. Gesundheitsschädliche Nebenwirkungen der verabreichten Medikamente konnten nicht beobachtet werden.

5.2.3 Diagnostische Methoden

Im Verlauf der Screenings der Testpersonen, wurden folgende diagnostische Methoden angewendet:

1. **Mikroskopische Diagnose** im Forschungslabor (Lambaréné) anhand des „Dicker Tropfen“ nach der Lambaréné-Methode.
2. **Schnell-Test-Diagnose *in situ*** unter Verwendung der NOW®-Malaria Test-Kits von Binax/ICT.
3. **Genetische Diagnose *a posteriori*** anhand der genommenen Proben unter Einsatz des STEVOR-PCR-Verfahrens am Tropenmedizinischen Institut der Eberhard Karls Universität zu Tübingen/Deutschland.

5.2.4 Blutentnahme und “Dicker Tropfen”

Konnte eine vorherige Teilnahme der Testperson am Screening ausgeschlossen werden, wurde eine ihrer Fingerbeeren mit einem in medizinischem Alkohol (70%ig) getränkten Wattetupfer gründlich gereinigt und dann mit einer sterilen Lanzette einmal kurz angestochen.

Der erste, sich dann durch Massieren des Fingers bildende Blutstropfen, wurde mit einem trockenen Wattetupfer abgewischt und vorsichtig ein zweiter, diesmal etwas größerer Blutstropfen, der so genannte "Dicke Tropfen", aus der Fingerbeere gepresst.

5.2.4.1 Technik, verwendetes Material und weitere Bearbeitung

- saubere Wattetupfer
- medizinischer, 70%iger Alkohol
- Lanzetten: Unistik 2 Normal (AT0702 single use capillary blood sampling devices, Copyright © 2006 Owen Mumford Ltd.)
- Kalibrierte 10-100µl Pipette z.B. Pipettenspitzen von Gilson plus.



Abbildung 6a/6b: Blutentnahme (6a, links) und Anfertigung des „Dicken Tropfen“ (6b, rechts) (Fotos: Kai B. Köster).

Dem so gewonnenen, frischen Blutstropfen, wurden mit einer geeichten Pipette 10 μ Liter Blut entnommen und auf einem sauberen Objektträger in einer definierten Fläche von 10x18mm (Lambaréné Methode) gleichmäßig aufgetragen. Zu diesem Zweck wurde eine Vorlage aus Papier mit einem aufgezeichneten Rechteck der oben genannten Seitenlängen unter den Objektträger gelegt.

Anschließend wurde der, auf diese Weise mit Blut beschickte Objektträger, in horizontaler Lage, staubfrei abgeschirmt und anschließend an der freien Luft oder im Inkubator des Labors bei 40°C mehrere Minuten lang vollständig getrocknet.

Danach wurde die Probe in einer weniger als 4-5 Stunden alten, gefilterten Färbungs-Lösung (20ml Giemsa-Lösung plus 80 ml Titrisol-Puffer) zwanzig Minuten lang eingefärbt und der Objektträger anschließend, ohne Abschwemmen der Blutschicht, vorsichtig in Leitungswasser gespült.

Zum Schluss wurde die auf diese Weise Giemsa-gefärbte Blutprobe erneut bis zu ihrer vollständigen Trocknung sicherheitshalber in einen Inkubator gelegt.

Die so behandelten Blutproben wurden daraufhin von drei Labormitarbeitern lichtmikroskopisch auf mögliche Fehler hin untersucht, bis auf nur 6 von 552 Ausnahmen waren alle technisch einwandfrei.

5.2.4.2 Zählverfahren

Wie bei dieser Technik erforderlich, fand die mikroskopische Auszählung der Parasiten unter Verwendung eines Öl-Immersionsobjektivs^d und bei Betrachtung von 100 Blickfeldern in 100facher Vergrößerung an den Orten der gleichmäßigsten Auftragung der Blutschicht auf dem Objektträger statt.

Waren keine Parasiten in den gelesenen Blickfeldern zu entdecken, wurde dies als negativer Befund (Parasitämie = 0) eingestuft; waren dagegen asexuelle oder sexuelle Formen der Plasmodien vorhanden, wurde dies als positiver Befund gewertet. Bei Vorliegen asexueller Stufen wurde zusätzlich die Parasitendichte des Probandenblutes (Plasmodien pro μL Blut) nach folgender Formel^e berechnet:

$$\text{Parasiten pro } \mu\text{L} = \frac{\text{Gesamtzahl der bestimmten asexuellen Formen} \times 600}{\text{Gesamtzahl der abgezählten Felder}}$$

Jede Blutprobe wurde mindestens zweimal, von zwei unabhängigen und in der Mikroskopie erfahrenen Labor-Mitarbeitern gelesen, und anschließend staubfrei archiviert. Eine dritte, dann von einem besonders auf diese Arbeit spezialisierten Mitarbeiter des Forschungslabors durchgeführte, Lesung der Blutprobe, fand statt wenn:

- Die vom ersten Mitarbeiter in der Blutprobe gelesene Parasitenzahl pro μL das dann in der gleichen Probe vom zweiten Mitarbeiter gelesene Ergebnis um den Faktor 1,5 übertraf.
- Nur einer der zwei mikroskopierenden Labormitarbeiter asexuelle Parasitenstufen erkannt hatte.
- Eine der zwei Lesungen unterlassen worden war.

^d CH30 und CX31 © 2006 Olympus®.

^e Der Multiplikationsfaktor **600** ergibt sich speziell für die im Forschungslabor verwendeten Olympus® CH30 oder CX31 Lichtmikroskope und muss für andere Mikroskope gesondert bestimmt werden.

-
- Beide Labormitarbeiter Parasitämien unter 300/ μ L bestimmt hatten, ihre jeweiligen Werte jedoch in einer Differenz von über 100 voneinander abwichen.

Die endgültige Stärke der Parasitämie in diesen Fällen wurde nur durch einen spezialisierten Mitarbeiter bestimmt. Erkannte dieser Experte in der 3. Lesung keine Parasiten, wurde die Blutprobe als negativer Befund (Parasitämie = 0) registriert. Dritt-Lesungen zur Gametozytenbestimmung wurden nicht durchgeführt eine Auszählung der Gametozyten mit Bestimmung einer sexuellen Parasitämie fand nicht statt und die Präsenz von Gametozyten wurde nur nach mikroskopischer Erkennung durch beide Labormitarbeiter oder durch den Experten als positiver Befund registriert.

5.2.4.3 Technik und Material

- Papiervorlage mit aufgezeichneter 10x18mm großer Fläche
- Objektträger: R. Langenbrinck 76x26mm Objektträger mit Mattrand, ISO 8037/1
- Giemsa R Lösung von Reactifs RAL, Ref. 320310-1000
- 1.09879 Titrisol[®] Puffer pH 7.2 \pm 0,005 (20°C) von Merck[®]
- Inkubator mit 40°C Innentemperatur
- Olympus[®] CH30 und CX31 Lichtmikroskope
- Olympus[®] Immersionsöl

5.2.5 Now[®] Malaria Schnell-Test

Weitere 15 μ L Blut wurden mittels eines im Test-Kit NOW[®] Malaria der Firma ICT enthaltenen EDTA-Kapillarröhrchens der Fingerbeere entnommen und direkt anschließend auf den unteren Teil des Nitro-Zellulose Teststreifens im Papp-Faltheftchen des Malaria-Test-Kits gegeben. Nach Herstellerangaben erfolgte daraufhin die dosierte Zugabe der Reagenz/Pufferlösung mit den an Gold-Kolloid gebundenen Antikörpern gegen HRP-2 und die Parasiten-spezifische Aldolase.

Die Interpretation des Schnell-Tests und die schriftliche Dokumentation erfolgten nach 15 Minuten.

Die folgenden Abbildungen illustrieren den eben beschriebenen Vorgang.

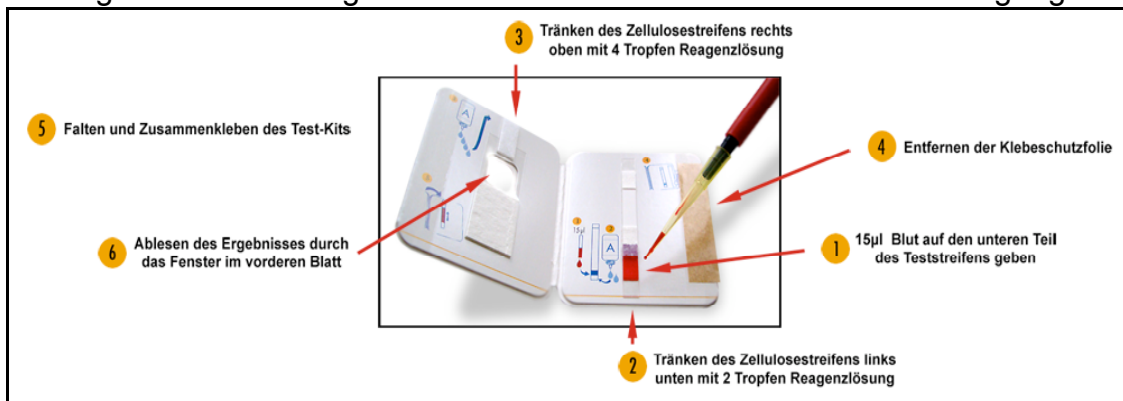


Abbildung 7: Die Beschickung des Teststreifens mit venösem EDTA-Blut und Pipette.

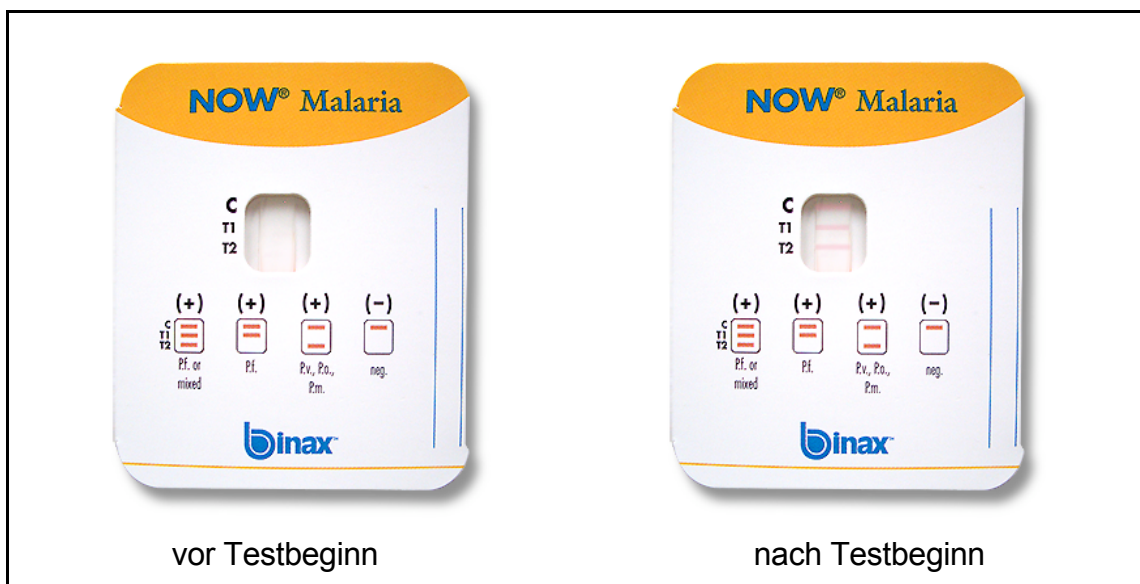


Abbildung 8: Zwei Phasen des erwähnten Malaria-Test-Kits während eines Schnell-Tests.

Die maximal drei entstehenden Banden zeigen an:

C: Kontrollbande

T1: spezifische HRP-2 reaktive Bande

T2: unspezifische Aldolase-reaktive Bande (panmalarial antigen)

So ergeben sich vier mögliche Kombinationen:

(+) Positiv - *P. falciparum* oder Mischinfektion

(+) Positiv - *P. falciparum* Infektion

(+) Positiv - *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*

(-) Negativ

Die Test-Streifen der eingesetzten Test-Heftchen lieferten gut ablesbare Diagnosen und wurden abschließend im Labor staubfrei archiviert. In vier Fällen entfielen aus dem Autor unbekanntem Gründen die Durchführung, Auswertung oder Dokumentation des Schnell-Tests, bzw. der Ergebnisse.

5.2.5.1 Schnell-Test, verwendete Materialien

- Binax NOW[®] ICT Malaria P.f/P.v. Test-Kit inklusive Reagenzlösung A in Dosierfläschchen und EDTA-Kapillarröhrchen.

5.2.6 STEVOR-PCR/Gelelektrophorese

Nach der in Abschnitt 6.2.4 beschriebenen Blutabnahme für den Schnell-Test wurden zusätzliche 30 µL Blut des Probanden auf eine Glasfaser-Filterscheibe von Schleicher & Schuell[®] getropft. Diese Proben wurden jeweils in kleinen Plastiktüten staubfrei verpackt, nach Rückkehr in das Forschungslabor über einen Zeitraum von mehreren Minuten im Inkubator getrocknet und anschließend wieder einzeln in einem mit Falz versiegelbaren Plastiktütchen verstaut.

Die gesammelten Filterpapiere wurden zum nächsten, frühestmöglichen Termin per Flugzeug nach Deutschland geflogen, um dort vom Laborpersonal des Tropeninstituts der Tübinger Karl-Wilhelms Universität zu Tübingen auf Plasmodien-Gene untersucht zu werden.

Die Identifikation der Plasmodien DNA erfolgte mittels STEVOR-PCR, einer im folgenden Text beschriebenen Form der „nested-PCR“.

Nach Reinigung der Blutproben wurde die Gen-Amplifikation mit dem Qlamp DNA-Purifikations-Kit des Herstellers Qiagen einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research, Watertown, MA am zuvor erwähnten Tropeninstitut durchgeführt.

In der ersten PCR-Amplifikationsphase wurden 5 μL (5.0-25 ng) DNA zu jeweils 1,5 μL der Primer P5, P18, P19 und P20 (10 μM) mit 5 μL 1:10 verdünnter (10x) Pufferlösung, 0,4 μL dNTP (25 mM), 20 μL MgCl_2 (25 mM) sowie 0,25 μL *Taq*-Polymerase (5 U/ μL) und 23,35 μL PCR Lichrosolv H_2O gegeben und 22 Zyklen (93°C für 30 Sekunden, 50°C für 50 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden) im Thermozykler durchlaufen (Initiale Erhitzung auf 93°C für drei Minuten, anschließend 22 Zyklen, Abkühlung auf 72°C für drei Minuten und Pause bei 10°C).

Im zweiten Durchgang wurden 2 μL des PCR-Produktes aus der ersten Phase jeweils 2 μL der Primer P17 und P24 (10 μM) mit 5 μL 1:10 verdünnter (10x) Pufferlösung, 0,8 μL dNTP (25 mM), 5 μL MgCl_2 (25 mM), 0,25 μL *Taq*-Polymerase (5 U/ μL) und 33 μL Lichrosolv H_2O zugefügt. Diese Reaktionslösung durchlief anschließend 30 Zyklen; 93°C für 30 Sekunden, 55°C für 50 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden (Initiale Erhitzung auf 93°C für drei Minuten, anschließend 30 Zyklen, Abkühlung auf 72°C für drei Minuten und Pause bei 10°C).

5 μL des endgültigen PCR-Produkts wurden zu 1 μL Sybr Green DNA-Färbung (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland), 2 μL 1:5 verdünntem (5x) Puffer und 2 μL destilliertem Wasser gegeben und bei angelegtem Gleichstrom auf 2% Agarose-Gel (Peqlab, Erlangen, Deutschland) wandern gelassen.

Jeder Durchlauf wurde von Negativ- und Positiv-Kontrollen begleitet.

Die Darstellung einer Bande mit DNA-Fragmenten im Träger-Gel wurde als positiver, ein Ausbleiben derselben als negativer Befund registriert.

Das Wissenschaftler-Team in Lambaréné wurde nach abgeschlossener PCR-Diagnostik der eingeschickten Proben per Email über die Ergebnisse in Kenntnis gesetzt.

Bis auf 29 Fälle konnten alle Proben erfolgreich untersucht werden. Die fehlenden Daten im Studiensatz ergeben sich aus 26 verworfenen Fällen mit Kontamination der Proben durch ein Auslaufen des verwendeten

Beschriftungsstifts mit Durchsetzung der Blutprobe und weiteren drei Fällen mit aus unklaren Gründen unterlassener Auswertung.

5.2.6.1 Technik und Material

- GF 51 Glasfaser-Filter von Schleicher & Schuell®, Ø 50mm, Ref Nr. 10428130
- staubfrei verschließbare Plastiktüte zur individuellen Filteraufbewahrung
- Purifikations Kit: Qlamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA)
- (10x) und (5x) Pufferlösung (10fach bzw. 5fach konzentrierte Pufferlösung)
- dNTP (25 mM), desoxyNucleosid-TriPhosphat
- MgCl₂ (25 mM)
- *Taq*-Polymerase (Thermus aquaticus DNA-Polymerase)
- SYBR® Green I –Sequenz-unspezifische, fluoreszierende DNA-Färbung (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Agarose-Gel 2% (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
- PCR Lichrosolv H₂O

Primer 1. Phase

- P5 `gggaattcTTTATTTGATGAAGATG` (tiefgestellt: kein Teil der STEVOR-Sequenz)
- P18 `TTTCA(C)TCACCAAACATTTCTT`
- P19 `AATCCACATTATCACAATGA`
- P20 `CCGATTTTAACATAATATGA`

Primer 2. Phase

- P17 `ACATTATCATAATGA(C/T)CCAGAACT`
- P24 `GTTTCCAATAATTCTTTTTCTATC`

5.3 Statistik

5.3.1 Sensitivität, Spezifität und Prädiktionswerte

Zur qualitativen Beurteilung einer diagnostischen Methode werden in der Statistik üblicherweise die Maßzahlen Sensitivität, Spezifität, sowie Positiver und Negativer Prädiktionswert verwendet.⁶⁶ Bei diesen vier Kenngrößen handelt sich um relative Häufigkeiten, die für Testverfahren mit dichotomen, d.h. mit zwei möglichen Testergebnissen berechnet werden können.

Hierzu werden zunächst die Resultate des zu beurteilenden Testverfahrens hinsichtlich ihrer Übereinstimmung oder Diskordanz mit bekannten, als wahrhaftig definierten Werten sortiert. Handelt es sich dabei um Resultate eines qualitativ übergeordneten Testverfahrens, so wird dieses Verfahren als Maßstab als für die zu prüfende Methode angewendet und im deutschen Sprachraum als **Gold-Standard** bezeichnet.

In dieser Studie waren die zwei relevanten Größen für Mikroskopie und Schnell-Test das Vorliegen, bzw. das Fehlen von *P. falciparum* in den untersuchten Proben.

Die, zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität, Prädiktionswerten, sowie der zugehörigen Konfidenzintervalle, verwendeten Formeln sind im Anhang Abschnitt *Rechenformeln* 9.1.1 und 9.1.2 auf Seite 72 aufgeführt.

5.3.2 Prüfung der Stichproben-Unterschiede

Zur Prüfung eines zwischen mindestens zwei Gruppen verteilten, beobachteten Unterschiedes hinsichtlich der Häufigkeit eines untersuchten Merkmals auf Zufälligkeit oder Übertragbarkeit auf die Grundgesamtheit n , kann der p -Wert als statistische Maßzahl berechnet werden.

Der p -Wert ist hierbei die Wahrscheinlichkeit in einer Stichprobe rein zufällig einen mindestens so großen wie den beobachteten Unterschied zu erhalten. Dabei wird die hypothetische Gleichheit der Gruppen aus n postuliert.

Für die Entscheidung für, bzw. gegen einen Unterschied in der Stichprobe wurde hier ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$, bzw. das nach Bonferroni korrigierten Niveau (Anhang Abschnitt 8.1.3) von $\alpha=0,017$ festgelegt.^{67,68}

Lag der p -Wert über diesem Niveau ($p>\alpha$) fiel die Entscheidung zugunsten der Aussage, dass kein Unterschied vorlag, bzw. der beobachtete Unterschied allein zufallsbedingt auftrat (Nullhypothese).

Bei einem p -Wert unterhalb des Signifikanzniveaus ($p<\alpha$) wurde die Gegenhypothese mit Behauptung eines real vorliegenden Unterschiedes angenommen.

5.3.3 χ^2 und p -Wert Berechnung

Die Berechnung des χ^2 -Wertes und der dazugehörigen, hier interessierenden p -Werte wurde mit dem unter <http://www.psych.ku.edu/preacher/chisq/chisq.html> aufrufbaren Rechenprogramm, einer unbeschränkten, kostenlosen Dienstleistung der akademischen Web-Site der nordamerikanischen Kansas-University, durchgeführt.⁶⁹

Auf der Internetseite war die Daten-Eingabe in einer bis 10x10 Felder großen Tafel möglich, das integrierte Statistik-Programm konnte dann den χ^2 -Wert (Chi-square), die **Freiheitsgrade** (Degrees of Freedom) und den **p -Wert** (p -value) berechnen. Zwei weitere ebenfalls kalkulierte, statistische Größen waren der χ^2 - und p -Wert nach Yates. Auf eine Betrachtung dieser Werte wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Group (Gruppe): hier geographische Einteilung der Probanden: Gp1=Norden, Gp2=Süden und Gp3=Lambaréné bzw. in Altersgruppen Gp1=18-29jährige, Gp2=30-40jährige und Gp3=41-51jährige

Condition (Zustand): hier
Cond. 1: *P. falciparum* positiv und
Cond. 2: *P. falciparum* negativ

Befehl-Taste zur Berechnung von χ^2

In diese Felder sind die Werte aus den jeweiligen Kontingenztafeln einzutragen.

χ^2 -Wert

p -Wert

Observes	Gp 1	Gp 2	Gp 3	Gp 4	Gp 5	Gp 6	Gp 7	Gp 8	Gp 9	Gp 10
Cond. 1:	148	22								17 ^f
Cond. 2:	115	35								15 ^f
Cond. 3:										0
Cond. 4:										0
Cond. 5:										0
Cond. 6:										0
Cond. 7:										0
Cond. 8:										0
Cond. 9:										0
Cond. 10:										0
	26	57	0	0	0	0	0	0	0	32 ^f

Output:

Calculate Reset all

Chi-square: 5.879
degrees of freedom: 1
p-value: 0.01532
Yates' chi-square: 5.19
Yates' p-value: 0.02271

Status: Status okay

Abbildung 9: Internet-Berechnungs-Tafel für den χ^2 und p -Wert[†].

6 Befundauswertung

^f In den ersten zwei bis drei Spalten „Gp 1“ bis „Gp 3“ wurde die Proben nach geographischer Herkunft (Abschnitt 7.4.8) bzw. nach Altersgruppen (Abschnitt 7.4.7) gruppiert eingefügt, wobei die Werte der *P. falciparum*-positiven Probanden in der ersten Zeile „Cond. 1“ und die der *P. falciparum*-negativen Proben in der zweiten Zeile „Cond. 2“ eingetragen wurden.

Das hier beschriebene und vom 08. April 2005 bis 14. September 2006, in drei Rekrutierungs-Abschnitten^g und 80 Tagen Feldarbeit durchgeführte Screening untersuchte 552 Probanden im Alter von 18 bis 51 Jahren.

Von September 2005 bis Dezember 2006 hatte ich die Gelegenheit, im Rahmen seiner wissenschaftlich-medizinischen Tätigkeit am "Laboratoire de Recherches" des Albert Schweitzer Hospitals in Lambaréné, Gabun, die Datensätze und Diagnose-Resultate dieses Screenings, sowie das dazugehörige, mikroskopische und digitale Archiv-Material für die Anfertigung der hier vorliegenden Dissertation zu untersuchen und auszuwerten.

^g

1. Abschnitt: 08. April bis zum 16. September 2005;
2. Abschnitt: 07. Dezember 2005 bis zum 31. März 2006;
3. Abschnitt: 07. September 2006 bis zum 14. September 2006

6.1 Testergebnisse

Die Ergebnisse der Probenuntersuchung sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 1: Befunde in Absolutzahlen und Prozentwerten.*

Mikroskopie			Schnell-Test			STEVOR-PCR		
Ereignis	Anzahl	Prozente	Ereignis	Anzahl	Prozente	Ereignis	Anzahl	Prozente
negativ	477	86,4	negativ	395	71,6	negativ	257	46,6
keine Daten	6	1,1	keine Daten	4	0,7	keine Daten	29	5,3
P.falciparum	60	10,9	P.falciparum	136	24,6	positiv	266	48,2
P.falc. + Gam.	1	0,2	P.falc. or mixed	17	3,1	Summe	552	100%
Gametozyten	3	0,5	Summe	552	100%			
P.falc. + P.ovale	1	0,2						
P.malariae	3	0,5						
P.ovale	1	0,2						
Summe	552	100%						

* Gametozyten	mikroskopisch erfasstes Vorliegen von ausschließlich sexuellen <i>P. falciparum</i> Stufen in der Probe.
keine Daten	fehlendes oder beschädigtes Probenmaterial; und/oder Unterbleiben der zwei- oder dreimal wiederholten, mikroskopischen Lesung wegen Verschmutzung der Proben.
negativ	keine Feststellung von Plasmodien.
P. falc. + Gam.	mikroskopisch erfasste, sexuelle und asexuelle Entwicklungsstadien von <i>P. falciparum</i> .
P. falc. or mixed	im Schnell-Test erfasste Mischinfektion von <i>P. falciparum</i> mit <i>P. ovale</i> und/oder <i>P. malariae</i> .
P. falciparum	mikroskopisch, bzw. im Schnell-Test erwiesenes Auftreten von <i>P. falciparum</i> .
P. malariae	mikroskopisch erfasstes Vorliegen von <i>P. malariae</i> .
P. ovale	mikroskopisch erfasstes Vorliegen von <i>P. ovale</i> .
P.falc. + P.ovale	mikroskopisch erfasste Mischinfektion von <i>P. falciparum</i> mit <i>P. ovale</i> .
positiv	Nachweis von <i>P. falciparum</i> Genmaterial.
Summe	Gesamtzahl untersuchter Proben.

Werden im Vergleich mit den parasitenfreien, also negativen Proben, die Proben mit nachgewiesenen Gametozyten und Mischinfektionen von *P. falciparum* mit anderen Plasmodien-Arten zusammengezählt und dann vereinfacht als positive Diagnose gewertet, ergibt sich folgende Tabelle.

Tabelle 2: Parasitenfreie Proben vs. positive Befunde.

	Mikroskopie	Schnell-Test	STEVOR-PCR
negativ	477 (87,4%)	395 (72,1%)	257 (49,1%)
P. falciparum	69 (12,6%)	153 (27,9%)	266 (50,9%)
Σ	546 (100%)	548 (100%)	523 (100%)

Im Fall der Mikroskopie (2. Spalte) waren demnach von 546 untersuchten Proben 477 (87%) frei von *P. falciparum*, während 69 (13%) Proben aller mikroskopierten Proben sexuelle und/oder asexuelle Stufen von *P. falciparum* aufwiesen.

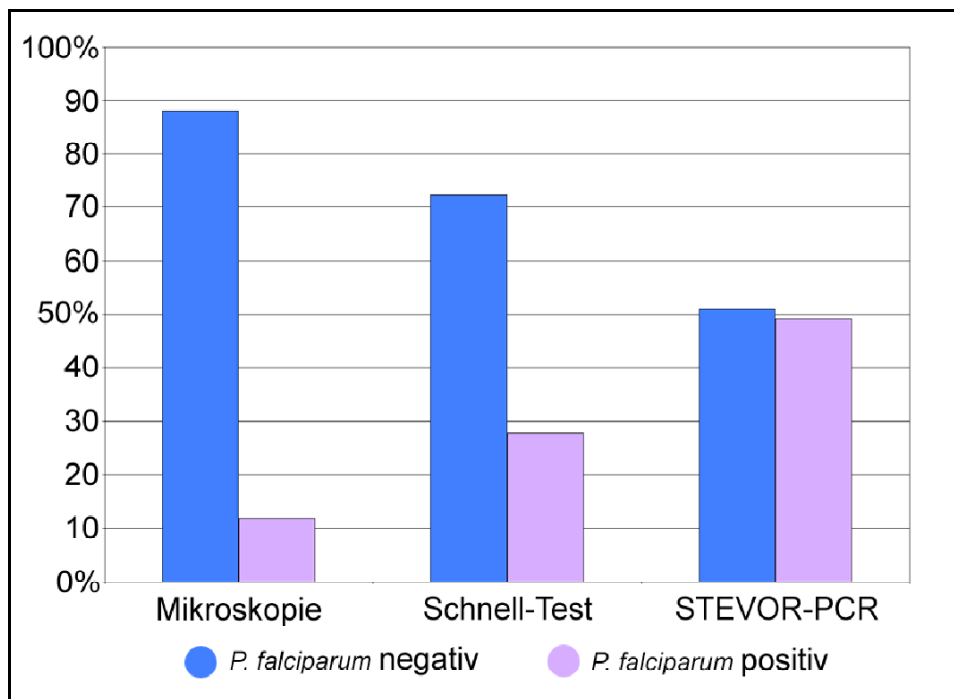


Abbildung 10: *P. falciparum* Verteilungen (Detektionsverfahren gegeneinander).

Wie in Abbildung 10 gut zu erkennen, war die Anzahl der vom STEVOR-PCR Verfahren gestellten, positiven Diagnosen, etwa um den Faktor 4 größer als die von der Mikroskopie erbrachten, und rund 1,8 mal höher als die Anzahl der vom Schnell-Test diagnostizierten.

6.2 Resultatkonstellationen

Zur Berechnung der qualitativen Maßzahlen für die Mikroskopie und den Schnell-Test wurden die Ergebnisse des Screenings nach den drei angewandten Testverfahren und ihren jeweils positiven oder negativen Befunden sortiert und tabellarisch in acht Zeilen untereinander angeordnet. Es ergab sich so die zahlenmäßige Verteilung der 8 Resultatkonstellationen auf Richtig-Positive, Richtig-Negative, Falsch-Positive und Falsch-Negative Befunde, die für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität, sowie der Prädiktionswerte bekannt sein müssen.

Tabelle 3: Resultatkonstellationen.

	Mikroskopie	Schnell-Test	Stevor-PCR	Anzahl	Prozent
1.	-	-	-	229	44,1
2.	+	-	-	3	0,6
3.	-	+	-	23	4,4
4.	+	+	-	0	0
5.	-	-	+	137	26,4
6.	+	-	+	3	0,6
7.	-	+	+	68	13,1
8.	+	+	+	56	10,8
9.			∑	519	100

* - negativer Befund (kein *P. falciparum*)
 + positiver Befund (*P. falciparum*)
 ∑(Summe) Proben-Gesamtzahl mit Resultaten für alle drei Testverfahren

Bei Betrachtung von Tab. 3 fällt in der 4. Zeile auf, dass sowohl Mikroskopie-, als auch Schnell-Test-positive Proben in keinem Fall PCR-negativ waren, was für dieses Screening bedeutet, dass eine kombinierte Diagnose aus Schnell-Test und Mikroskopie bei den untersuchten Proben keine falsch-positiven Resultate produzierte.

In drei Fällen diagnostizierte die Mikroskopie falsch-positive Ergebnisse (2. Zeile), während der Schnell-Test in 23 Proben *P. falciparum* detektierte (3. Zeile), die von der PCR nicht bestätigt wurden.

6.3 Vierfeldertafeln Mikroskopie & Schnell-Test vs. STEVOR-PCR

Mit den aus Tab. 19 entnommenen Test-Resultaten, können die, für die Berechnung von Sensitivitäts-, Spezifitäts- und Prädiktionswerten nötigen Zahlen in folgende Vierfeldertafeln zusammengestellt werden (Tab. 4; Tab. 5):

Tabelle 4: Vierfeldertafel Mikroskopie vs. STEVOR-PCR.

$n_{\text{Mik-ges}}=519^*$	PCR positiv	PCR negativ
Mikroskopie positiv	59	3
Mikroskopie negativ	205	252

* $n_{\text{Mik-ges}}=552-33$ (ohne PCR und Mikroskopie-Daten)

Für die Mikroskopie ergeben sich somit 59 richtig-positive, 3 falsch-positive, 205 falsch-negative und 252 richtig-negative Diagnosen.

Tabelle 5: Vierfeldertafel Schnell-Test vs. STEVOR-PCR.

$n_{\text{STges}}=519^*$	PCR positiv	PCR negativ
Schnell-Test positiv	124	23
Schnell-Test negativ	140	232

* $n_{\text{STges}}=552-33$ (ohne PCR und Schnell-Test-Daten)

Für den Schnell-Test ergeben sich damit 124 richtig-positive, 23 falsch-positive, 140 falsch-negative und 232 richtig-negative Diagnosen.

6.4 Sensitivität, Spezifität und Prädiktionswerte von Mikroskopie & Schnell-Test

Aus den obigen Vierfeldertafeln (Tab. 4 und 5) wurden mit den Formeln aus Abschnitt 6.3. folgende Werte (Sensitivität, Spezifität und Prädiktionswerte, bzw. ihre 95%-Konfidenzintervalle KI) berechnet.

Tabelle 6: Leistungswerte Mikroskopie und Schnell-Test.

	Mikroskopie	KI (95%)	Schnell-Test	KI (95%)
Sensitivität	22,3	17,3-27,4	47,0	40,9-53,0
Spezifität	98,8	97,5-100	91,0	87,5-94,5
Positiver Prädiktionswert	95,2	89,8-100	84,4	78,5-90,2
Negativer Prädiktionswert	55,1	50,6-59,7	62,4	57,4-67,3

Die Sensitivität der mikroskopischen Diagnostik betrug für das Screening 22%. Dies bedeutet, dass von fünf, laut STEVOR-PCR, *P. falciparum*-positiven Proben nur ungefähr eine auch als solche erkannt wurde. Der Schnell-Test hingegen zeigte, bei einer Sensitivität von 47%, eine mehr als doppelt so hohe Trefferquote. Die als Gold-Standard verwendete STEVOR-PCR hatte per Definition eine 100%ige Sensitivität.

Für die mikroskopische Detektion ergab sich eine Spezifität von 99%. Dies ist so zu verstehen, dass von 100 Nicht-Infizierten Probanden etwa 99 als solche richtig erkannt wurden, wogegen etwa 1 Proband fälschlicherweise als Träger von *P. falciparum* diagnostiziert wurde. Der Schnell-Test präsentierte hier eine Spezifität von 91%, so dass von 100 *P. falciparum* negativen Proben, in etwa 9 Fällen eine falsche, positive Diagnose gestellt wurde. Die als Gold-Standard verwendete STEVOR-PCR hatte die Spezifität von 100%.

Bei der mikroskopischen Untersuchung ergab sich ein positiver Prädiktionswert von 95%.

Dies ist prozentual so zu verstehen, dass von 100 mikroskopisch positiven Diagnosen etwa 95 zutreffend waren und fünf nach STEVOR-PCR falsch-positiv gestellt wurden. Der Schnell-Test wies mit 91 richtigen von 100 positiv gestellten Diagnosen einen positiven Prädiktionswert von 91% auf. Für die STEVOR-PCR galt ein positiver Prädiktionswert von 100%.

Der negative Prädiktionswert der mikroskopischen Untersuchungen betrug 55%, somit wurden bei 100 als *P. falciparum*-negativ eingestuften Proben nur etwa 55 zutreffend als solche diagnostiziert. Der negative Prädiktionswert des Schnell-Tests, also der Anteil richtig gestellter negativer Diagnosen an der Gesamtzahl vom Schnell-Test negativ eingestufte Proben, betrug 62%. Der negative Prädiktionswert der STEVOR-PCR war 100%.

6.5 STEVOR-PCR vs. Kombinationsdiagnostik von Mikroskopie & Schnell-Test

Bei Betrachtung der STEVOR-PCR-Resultate in Abb. 10 fällt auf, dass das Verhältnis von *P. falciparum*-positiven zu *P. falciparum*-negativen Befunden im Gesamtscreening annähernd 1 zu 1 war, was bei den zwei möglichen STEVOR-PCR Diagnosen (*P. falciparum positiv*, *P. falciparum negativ*) auch eine zufällige Verteilung dieser Ergebnisse bedeuten könnte. Ein Vergleich mit den kombinierten Befunden aus Mikroskopie und Schnell-Test zeigte dann aber, dass die STEVOR-PCR zwar keine falsch-negativen Resultate, dafür aber eine hohe Anzahl falsch-positiver Diagnosen stellte.

Tabelle7: Vierfeldertafel Kombinationsdiagnose Mikroskopie/Schnell-Test vs STEVOR-PCR^h.

$n_{\text{PCR-ges}}=422$	Mikroskopie UND Schnell-Test positiv	Mikroskopie UND Schnell-Test negativ
STEVOR-PCR positiv	56	137
STEVOR-PCR negativ	0	229

Diese Vierfelder-Tafel (Tab. 7) macht deutlich, dass die STEVOR-PCR-Ergebnisse nicht zufällig verteilt sind, denn die von Mikroskopie und Schnell-Test gemeinsam positiv befundeten Proben entsprechen den positiv diagnostizierten Fällen der STEVOR-PCR vollständig, womit sich rechnerisch eine Sensitivität von 100% ergibt (Tab. 8).

Tabelle 8: Sensitivität, Spezifität und Prädiktionswerte der STEVOR-PCR.

Maßzahlen (%)	STEVOR-PCR
Sensitivität	100,0
Spezifität	62,6
Positiver Prädiktionswert	29,0
Negativer Prädiktionswert	100,0

Im Vergleich mit der weniger empfindlichen Mikroskopie- und Schnell-Test Kombination, führte die eigentlich höhere Empfindlichkeit des STEVOR-PCR-Diagnoseverfahrens erwartungsgemäß zu einer deutlich höheren Anzahl positiver Befunde, womit die in Tab. 24 angegebene, niedrige Spezifität von 63% der STEVOR-PCR erklärt werden kann.

^h Für die Erstellung dieser Vierfeldertafel wurden ausschließlich jene Proben ausgezählt, bei denen übereinstimmende positive oder negative Diagnosen von Mikroskopie und Schnell-Test, sowie ein STEVOR-PCR-Resultat vorlagen; die auswertbare Probenzahl reduzierte sich so auf 422 Exemplare ($n_{\text{PCR-ges}}$).

6.6 Parasitämien

Das Screening ergab 60 Fälle mit einer mikroskopisch bestimmten Parasitämie, bei denen das Vorliegen von *P. falciparum* durch mindestens einen weiteren, positiven Test bestätigt worden war.

Bei 12% der Probanden in der mikroskopischen Untersuchung und bei 28% wurde mit dem immunchromatographischen Schnell-Test eine bestehende, bzw. erfolgte Infektion mit *P. falciparum* identifiziert.

Die dritte und empfindlichste Detektions-Methode wies als Gold-Standard bei 49% der Probanden den Erreger der *Malaria tropica* nach. Bei der mikroskopischen Analyse konnten zusätzlich zu den Positiv/Negativ-Infektionsbefunden die Parasitämien ausgezählt werden. Dabei ergaben sich maximale Erregerwerte von 18.305 Plasmodien/ μ L, der arithmetische Mittelwert lag bei 1242 Plasmodien / μ L, der Median bei 74 Plasmodien/ μ L. Die kleinste noch feststellbare Parasitämie betrug in dieser Studie 6 Plasmodien/ μ L.

Die mikroskopisch registrierten höchsten Parasitämien standen zueinander in keinem erkennbaren Zusammenhang.

Es lagen weder eine zeitliche noch eine räumliche Übereinstimmung vor, so dass Spekulationen über zum Untersuchungszeitpunkt beginnende Malaria-Ausbrüche in bestimmten Dörfern nicht zulässig sind.

In den Befunden der Mikroskopie betrug das Verhältnis von *P. falciparum* zu anderen Plasmodien-Arten für das Screening etwa 12:1, für den Schnell-Test ergab sich unter Berücksichtigung der „P.falc or mixed“ Angaben ein Verhältnis von mindestens 8 zu 1.

In der folgenden Tabelle sind die *P. falciparum* Parasitämien dem Grad der festgestellten Infektion entsprechend in Gruppen aufgelistet.

Tabelle 9: Kumulative Fallzahlen nach Parasitämiestärke.

Parasiten (pro μL)	Fallzahlen	Prozente
$0 < \text{Parasiten} \leq 100$	32	53,3
$100 < \text{Parasiten} \leq 200$	6	10,0
$200 < \text{Parasiten} \leq 300$	2	3,3
$300 < \text{Parasiten} \leq 400$	4	6,7
$400 < \text{Parasiten} \leq 500$	1	1,7
$500 < \text{Parasiten} \leq 600$	3	5,0
$600 < \text{Parasiten} \leq 700$	2	3,3
$700 < \text{Parasiten} \leq 800$	0	0,0
$800 < \text{Parasiten} \leq 900$	0	0,0
$900 < \text{Parasiten} \leq 1.000$	1	1,7
$1000 < \text{Parasiten} \leq 10.000$	6	10,0
$10.000 \leq \text{Parasiten}$	3	5,0
Probanden <small>Mikroskopie-positiv</small>	60	100 %

Die Tab. 9 stellt ausschließlich die 60 Fälle mikroskopisch quantifizierter *P. falciparum* Parasitämien dar, die durch eine folgende und positive PCR-Diagnose abgesichert wurden. Hierbei wiesen 63% der Probanden Parasitämien unter 200 Plasmodien/ μL auf.

Die folgende, prozentual strukturierte Tabelle zeigt, dass etwa drei Viertel der Parasitämien unter $500/\mu\text{L}$ lag, und nur etwas mehr als die Hälfte der Befunde sogar unter $100/\mu\text{L}$.

Tabelle 10: Kumulative Fallzahlen je Parasitämie-Gruppe.

Parasiten pro μL	Fallzahlen	Prozente
$0 < \text{Parasiten} \leq 25$	12	20,0
$0 < \text{Parasiten} \leq 50$	24	40,0
$0 < \text{Parasiten} \leq 100$	32	53,3
$0 < \text{Parasiten} < 300$	41	68,3
$0 < \text{Parasiten} < 500$	46	76,7
$0 < \text{Parasiten} < 1.000$	51	85,0
$0 < \text{Parasiten} < 10.000$	57	95,0
Probanden <small>Mikroskopie-positiv</small>	60	100%

53% der positiven Proben wiesen Parasitämien unter 100/ μ L auf, 77% der positiven Proben Parasitämien unter 500/ μ L.

Für die Aufstellung der Tab. 10 blieben die Befunde an jenen 203 Probanden unberücksichtigt, deren mikroskopisch gestellte Diagnosen zwar *P. falciparum*-negativ, dann im wesentlich empfindlicher reagierenden STEVOR-PCR-Test aber *P. falciparum*-positiv ausgefallen waren. Nimmt man für diese *P. falciparum*-positiven Proben eine Parasitämie unter der beobachteten Mikroskopiergrenze des Labors von 6 μ /Lⁱ an, so ergibt sich für die hier untersuchten asymptomatischen Träger ein geschätzter Anteil von 95% mit Parasitämien unter 500 Plasmodien/ μ L.

6.7 Altersverteilung asymptomatischer Träger

Die Möglichkeit einer altersabhängigen, heterogenen Verteilung der *P. falciparum* Infektionen der Probanden wurde, wie auch die geographische Verteilung, mit Hilfe des X^2 -Tests untersucht, sowie mit Mosaic-Plots graphisch dargestellt.

Zur Prüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Alter der Testpersonen und ihrem *P. falciparum*-positiven Befund, wurden die Probanden zunächst drei Alterskategorien zugeordnet, wodurch sich die folgende Kontingenztafel ergibt. Hierbei wurde die Einteilung in die verwendeten drei Alterskategorien vorgenommen, um einerseits möglichst akkurat prüfen zu können, andererseits aber eine Minimalgröße der Stichprobenumfängen zu gewährleisten.

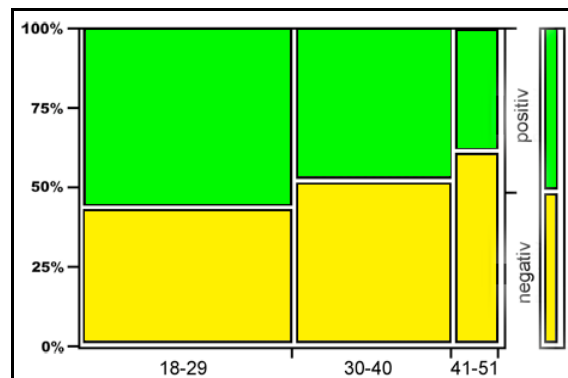
ⁱ Der mikroskopische Nachweis von Parasitämien mit weniger als 6 Plasmodien/ μ L war dem Laborpersonal am "Laboratoire de Recherches" des Albert Schweitzer Hospitals mit der auf 100 im Mikroskop zu prüfende Blickfelder festgelegten Methode nicht möglich. |

Tabelle 11: Alterskategorien und Befunde.

$n_{\text{Alter}}=517^*$	18-29	30-40	41-51
PCR positiv	148 (56,2%)	95 (48,2%)	22 (38,6%)
PCR negativ	115 (43,7%)	102 (51,8%)	35 (61,4%)
Σ	263 (100%)	197 (100%)	57 (100%)

* $n_{\text{Alter}}= 552 - 35$ (keine Altersangaben und/oder fehlende PCR-Resultate). Pro Zeile sind in Klammern die Prozentualanteile der negativen, bzw. positiven Fälle an der Gesamtzahl der Probanden je Altersgruppe angegeben.

Mit 56% Infizierten weist in dieser Stichprobe die Alterskategorie der 18-29jährigen den größten Anteil asymptomatischer Parasiten-Träger auf. An zweiter Stelle steht die Gruppe der Männer im Alter zwischen 30 und 40 mit 48%. Die Gruppe der 41-51-jährigen stellt mit 39% den geringsten Anteil asymptomatischer Träger (vergleiche Abb. 11).

**Abbildung 11:** Altersverteilung positiver und negativer Befunde (Mosaic-Plot/JMP).

Zur statistischen Analyse dieser Zusammenhänge (Alter der Testpersonen und jeweiligem *P. falciparum*-positiven oder -negativen Befund), wurden die Daten aus Tab. 11 dem χ^2 -Unabhängigkeitstest unterzogen (Nullhypothese: Es besteht kein Zusammenhang zwischen den Variablen Alter und Befund).

Tabelle 12a: χ^2 - Test der Befundverteilung (Altersgruppen).

χ^2	7,0
Freiheitsgrade	2
p-Wert	0,03

Als Ergebnis dieser Berechnungen zeigte sich, dass hinsichtlich des Anteils *P. falciparum* positiver Probanden, ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,03$; $p<0,05$) zwischen den Altersgruppen bestand.

Zur weiteren Eingrenzung dieses Unterschieds wurde die Verteilung der *P. falciparum*-positiven bzw. -negativen Proben der Altersgruppen in paarweise angelegten X^2 -Tests durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 12b: X^2 -Test der Befundverteilung (Altersgruppen gegeneinander).

	<i>18-29 gegen 30-40</i>	<i>18-29 gegen 41-51</i>	<i>30-40 gegen 41-51</i>
X^2	2,9	5,9	1,6
Freiheitsgrade	1	1	1
<i>p</i> -Wert	0,09	0,02	0,2

Der Tab. 12b zu entnehmende *p*-Wert von 0,09 für den Unterschied der Alterskategorien der 18-29jährigen und der 30-40jährigen lag über dem, nach Bonferroni korrigierten, Signifikanzniveau von 0,017 ($=0,05/3$). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte demzufolge ausgeschlossen werden, innerhalb dieser Altersklassen lag zum Untersuchungszeitpunkt wohl eine Infektions-Homogenität vor.

Zwischen der Gruppe der 18-29jährigen und der Gruppe der 41-51jährigen bestand infolge des, niedriger als 0,017 (Signifikanzniveau) liegenden, *p*-Wertes von 0,015 ein statistisch signifikanter Unterschied. Eine nicht-zufallsbedingte Heterogenität der Verteilung asymptomatischer Träger innerhalb dieser beiden Alterskategorien ist deshalb anzunehmen (siehe Abb. 24), wobei in dieser Studie die Altersgruppe der 18-29jährigen mit 56% gegenüber den 39% der Stichprobe 41-51jähriger, den größten Anteil asymptomatischer Träger aufwies.

Für die Gruppen der 30-40jährigen und 41-51jährigen lag der *p*-Wert von $\sim 0,2$ deutlich über der Signifikanzschranke.

Die hier beobachteten empirischen Unterschiede sind dem Zufall zuzuschreiben und sind wahrscheinlich auf die geringe Zahl der Probanden der Altersgruppe der 41-51jährigen (n=57) zurückzuführen. Der Unterschied sollte daher nicht zwangsläufig als real vorliegende Differenz in der Verteilung ausgelegt, sondern so verstanden werden, dass keine verlässliche Angabe hinsichtlich einer Homogenität oder nicht der Infektionsanteile der drei Altersgruppen gemacht werden kann.

Zum besseren Verständnis der oben aufgeführten Beurteilungen sei hier noch Abb. 12 gezeigt. Die Heterogenität der Verteilung asymptomatischer Träger von *P. falciparum* zwischen 18-29 Jährigen und 41-51 Jährigen (mittleress Plot) ist klar ersichtlich.

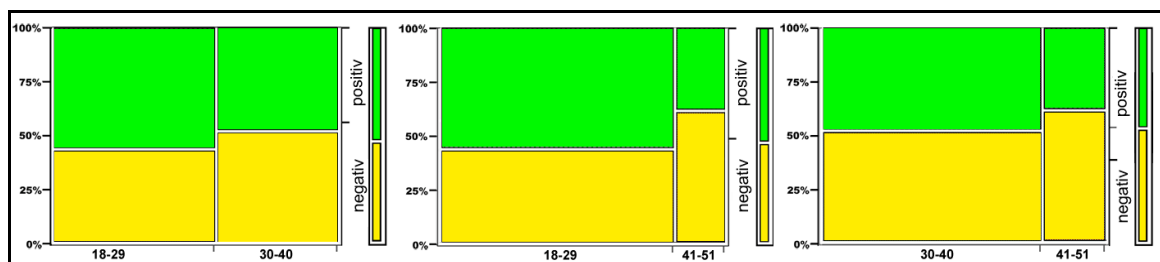


Abbildung 12: Altersverteilung positiver und negativer Befunde gegeneinander (Mosaic-Plot/JMP).

Insgesamt kann angenommen werden, dass die Verteilung der Infektionen innerhalb der Altersgruppen wohl tendenziell homogen ist. Der wissenschaftliche Standpunkt ist hier, dass der erwachsene Mensch nur eine Teil-Immunität gegen *P. falciparum* aufbauen kann, ohne dass allgemeingültige, altersabhängige Toleranzen beim gesunden Erwachsenen zu beobachten sind. Die vom Wirt asymptomatisch tolerierte, maximale Parasitenlast wird hierbei durch metabolische und immunologische Faktoren von Mensch und Plasmodium bestimmt.

6.8 Geografische Verteilung asymptomatischer Träger

Viele der Ortschaften aus denen Probanden im Rahmen dieser Studie rekrutiert wurden, lieferten zu geringe Probengrößen, um auf eventuelle Korrelationen zwischen Durchseuchung und Wohnort zu testen. Um dennoch mögliche Ortsbezogenheiten aufzudecken, wurden diese Ansiedlungen hinsichtlich ihrer Lage in Relation zu Lambaréné eingeteilt und die Probengrößen so auf ein statistisch akzeptables Maß gebracht.

Tabelle 13: Nord-Süd-Verteilung der Orte der Probenentnahme in und um Lambaréné.

$n_{\text{Ort}}=516^*$	Norden	Lambaréné	Süden
PCR positiv	102 (40,6%)	46 (52,9%)	115 (64,6%)
PCR negativ	149 (59,4%)	41 (47,1%)	63 (35,4%)
Σ	251 (100%)	87 (100%)	178 (100%)

* $n_{\text{Ort}}= 552 - 36$ (keine Ortsangaben und/oder fehlende PCR-Resultate).

Dieser Verteilung nach lag während des Zeitraums des Screenings der Anteil *P. falciparum*-positiver Männer mit Wohnort im Süden von Lambaréné um 12% höher als in Lambaréné selbst, und sogar um 24% höher als in den nördlich von Lambaréné gelegenen Ortschaften. Diese Sachlage könnte einen von Norden nach Süden hin zunehmenden Infektionsgradienten vermuten lassen (siehe Abb. 13).

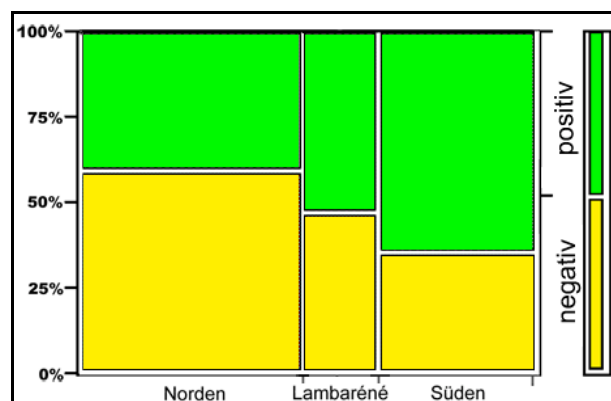


Abbildung 13: Geografische Verteilung asymptomatischer Träger (Mosaic-Plot/JMP).

Um die erwähnte Hypothese auf ihre Stichhaltigkeit zu prüfen, wurden die Werte einem χ^2 -Test auf Unabhängigkeit unterzogen.

Tabelle 14a: χ^2 -Unabhängigkeitstest der Verteilung asymptomatischer Träger.

χ^2	24,1
Freiheitsgrade	2
p -Wert	0

Der niedriger als das Signifikanz-Niveau von 5% berechnete p -Wert von 0 bedeutet, dass sich innerhalb der drei geografischen Bereiche die Anteile asymptomatischer Träger und *P. falciparum*-negativer Probanden voneinander unterscheiden.

Die genaue Beschaffenheit dieser Unterschiede wurde folgend untersucht, indem jeweils zwei der Lagen mittels χ^2 -Test auf Unabhängigkeit gegeneinander getestet wurden.

Tabelle 14b: χ^2 -Unabhängigkeitstest der geografischen Verteilung asymptomatischer Träger (Lagen gegeneinander).

	Norden/Süden	Norden/Lambaréné	Süden/Lambaréné
χ^2	23,9	3,9	3,3
Freiheitsgrade	1	1	1
p -Wert	0,0	0,05	0,07

Im Falle des Vergleichs zwischen dem Süden und dem Norden (in Relation zu Lambaréné), bedeutet der niedriger als 0,017 (Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur) berechnete p -Wert von 0, dass hinsichtlich der Verteilung *P. falciparum*-positiver und *P. falciparum*-negativer, erwachsener Probanden ein zum Niveau von 1,7% statistisch signifikanter Unterschied besteht.

Zwischen dem Norden und Lambaréné, sowie dem Süden und Lambaréné, errechneten sich dagegen p -Werte von 0,05; bzw. 0,07, nach denen oberhalb

des Niveaus von 0,017 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden können.

Ein signifikanter Unterschied ist nur zwischen Nord und Süd im direkten Vergleich zu sehen, nicht zwischen den genannten und Lambaréné. Ein real vorliegender Infektionsgrad fließenden Übergangs sollte folglich nicht ausgeschlossen werden.

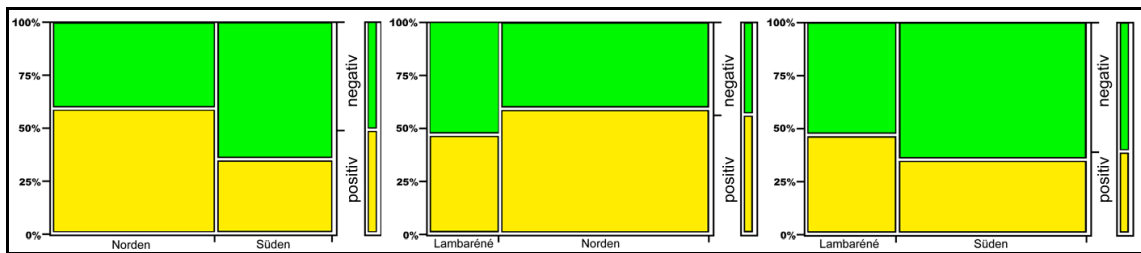


Abbildung 14: Geographische Verteilung asymptomatischer Träger gegeneinander (Mosaic-Plot/JMP).

7 Diskussion

7.1 Asymptomatische *P. falciparum* Träger

Die Prozentwerte asymptomatischer Träger waren auf die Gesamtheit der Umgebung Lambarénés in Ermangelung verlässlicher offizieller Angaben zur Zahl männlicher, erwachsener Einwohner, sowie der Anzahl der Gesamtbewohner, der besuchten Ortschaften nicht übertragbar.^j Es war jedoch anhand der oft geringen Zahl an Behausungen erkennbar, dass für viele der besuchten Ortschaften außerhalb von Lambaréné eine Einwohnerzahl von unter 100 Personen anzunehmen war (pers. Beobachtung). Unter Annahme eines etwa 50% betragenden Anteils der weiblichen Bewohner, sowie Berücksichtigung der für Entwicklungsländer typisch hohen Kinderzahl^k, ist die Folgerung zulässig, dass in vielen Ortschaften der Studie der Grossteil der für das Screening einsatzfähigen erwachsenen Männer, auch tatsächlich als Probanden rekrutiert werden konnten. Da Kinder, Jugendliche und Frauen, bzw. das weibliche Geschlecht *per se* nicht repräsentiert sind (Sampling Bias), lassen die Ergebnisse also keinerlei sichere Rückschlüsse auf die Gesamtheit der Bevölkerung zu. Der ~50% Anteil asymptomatischer Träger darf folglich für den Zeitraum von 2006 bis 2007 lediglich als Schätzwert für die männliche, erwachsene Bevölkerung der Siedlungen um Lambaréné angesehen werden. Demgemäß legen diese Ergebnisse nahe, dass zum Untersuchungszeitpunkt in der in und um Lambaréné wohnhaften Bevölkerung mit hoher Sicherheit eine große Anzahl asymptomatischer Träger mit sehr niedrigen *P. falciparum* Parasitämien unter den erwachsenen Männern vorlag.

^j Mir erschien beim Aufsuchen der gescreenten Ortschaften eine Erfragung dieser fehlenden demographischen Daten bei den jeweiligen Ortsvorstehern *a posteriori* aufgrund der ab dem Zeitpunkt der Untersuchung bereits verstrichenen Zeit (ca. 1 Jahr) unsinnig.

^k Die Angaben der offiziellen Website der Regierung von Gabun geben ein Verhältnis von 48% Männern zu 52% Frauen in der Bevölkerung an (2002), pro Frau wird mit 3,7 Kindern gerechnet (2001).

7.2 Vergleich der drei Test-Methoden

Ein weiteres Studienziel war die qualitative Einstufung der drei eingesetzten Methoden zur Detektion asymptomatischer Malaria bei männlichen Probanden aus der Umgebung von Lambaréné. Als qualitative Vergleichswerte wurden für die drei Screenings, sowie für die gesamte Studie Screening, Spezifitäts- und Sensitivitätswerte berechnet.

7.2.1 Mikroskopie

Die doppelte bis dreifache Lesung der Objektträger durch Mikroskopierer mit langjähriger Erfahrung in der Diagnose von Malaria führte in dieser Studie zu einer Prüfung von 100 bis 300 Blickfeldern je Probe auf Anwesenheit von *P. falciparum*.

Nichtsdestotrotz fiel die Sensitivität der Mikroskopie gering aus und betrug 22%. Die Spezifität lag bei 99%. Beim positiven Prädiktionswert, ein Maß für die Aussagekraft einer positiven Diagnose, schnitt die mikroskopische Detektion in dieser Studie geringfügig besser als der Schnelltest ab. Der Wert lag bei 95%.

Diese hohen Werte bedeuten, dass die mikroskopisch gestellten, positiven Diagnosen in dieser Studie zu mindestens 95% der positiven STEVOR-PCR-Diagnose entsprachen und somit sehr verlässlich waren. Der vergleichsweise niedrige negative Prädiktionswert von 55% besagt, dass bei etwa 60% die negativen Diagnosen der Mikroskopie mit den negativen Diagnosen der STEVOR-PCR übereinstimmten.

Im Fall des negativen Prädiktionswertes schnitt die Mikroskopie um 7% schlechter als der Schnell-Test ab. Da dieser Wert das Maß für die Aussagekraft einer negativen Diagnose ist, erscheint es infolge der hier beobachteten, geringen Empfindlichkeit der Mikroskopie gegenüber Schnell-Test und STEVOR-PCR verständlich, dass diese Methode nur in knapp mehr als der Hälfte der Fälle (55%) zutreffende negative Beurteilungen stellte.

Es ist anhand der geringen Sensitivität, aber sehr hohen Spezifität erkennbar, dass die Mikroskopierer sich in dieser Studie nur bei nahezu zweifelsfreier Erkennung von *P. falciparum* für die positive Diagnose entschieden. Falsch-positive Ergebnisse der Mikroskopie waren dadurch sehr selten (3 von 519) und der Aussagewert einer positiven Diagnose entsprechend hoch.

Unter Berücksichtigung der hohen Spezifität und guter Prädiktionswerte der Mikroskopie ist die niedrige Sensitivität sehr wahrscheinlich auf die, für die Diagnose asymptomatischer Parasitämien zu geringe, Zahl geprüfter Blickfelder im Mikroskop zurückzuführen.

7.2.2 Schnell-Test

Nahezu die Gesamtheit der Parasitämien lag deutlich unter den, vom Hersteller für zuverlässige Ergebnisse minimal geforderten, Plasmodienkonzentrationen von 5000 Parasiten/ μ L. Dennoch gelang es dem Laborpersonal mit dem Malaria Now[®] Test fast die Hälfte der mittels STEVOR-PCR bestätigten asymptomatischen Probanden zu identifizieren. Die hier beobachtete Sensitivität des Schnell-Tests fiel somit unerwartet gut aus und betrug 47%.

Für Parasitämien über 5000 Parasiten/ μ L gibt der Hersteller eine Sensitivität von 99,7% bis 100% für *P. falciparum* an.^{70 1}

Da nicht mehrere und so möglicherweise qualitativ unterschiedliche Schnell-Test Produktsätze der Firma ICT verwendet wurden, ist die im Studienverlauf beobachtbare Zunahme dieser Sensitivitäts-Werte wahrscheinlich auf den Zufall zurückzuführen. Eine sich während der Studie wesentlich verbessernde Handhabung der Schnell-Test-Kits, oder eine zunehmende

¹Angaben auf der Website der Binax Inc. unter <http://www.binax.com> (besucht am 10.07.2007), sowie im Beipackzettel des Now[®] Malaria Test-Kits gemäß Studienergebnissen des *Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland; United States Military Academy*⁷⁰

Interpretationsfähigkeit der sehr leicht deutbaren Schnell-Test-Ergebnisse durch die Wissenschaftler ist ursächlich eigentlich nicht zu erwarten.

Die berechnete Spezifität des Schnell-Tests erreichte 91%. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der falsch-positiven Test-Ergebnisse auf eine Persistenz von HRP-II im Probandenblut nach erfolgter und eventuell sogar medikamentös behandelter Infektion mit *P. falciparum* zurückzuführen ist. Da der Hersteller für Parasitämien über 5000 Parasiten/ μ L eine Spezifität von 94% angibt, sind die hier beobachteten Ergebnisse bei sehr viel geringerer Parasitendichte auffällig gut.

Der Positive Prädiktionswert lag mit 84% unter dem entsprechenden Wert der Mikroskopie, der negative Prädiktionswert des Schnell-Tests mit 62% dagegen über dem der mikroskopischen Detektionsmethode, was bedeutet, dass bei 10 negativ gestellten Diagnosen der Schnell-Test gegenüber der Mikroskopie eine richtig-negative Diagnose mehr stellte.

7.2.3 Stevor PCR

In Abschnitt 7.5 wurden die Ergebnisse der STEVOR-PCR den positiven und negativen Kombinationsresultaten von Mikroskopie und Schnell-Test gegenübergestellt, um eine zufällige Genese der fast 1:1 verteilten positiven und negativen PCR-Befunde auszuschließen.

Die Sensitivität der STEVOR-PCR ergab gegenüber den Kombinationsergebnissen (Mikroskopie & Schnell-Test) einen Wert von 100%. Dies besagt, dass die PCR-Methode alle von Mikroskopie und Schnell-Test gemeinsam positiv deklarierten Proben als *P. falciparum*-positiv identifizierte.

Der für die Spezifität berechnete Wert lag mit 63% relativ niedrig und ist darauf zurückzuführen, dass die STEVOR-PCR als empfindlichste der drei Methoden

mehr positive Proben als Schnell-Test und Mikroskopie gemeinsam erkannte.

Für den positiven Prädiktionswert der STEVOR-PCR ergab sich der niedrige Wert von 29%, der dadurch bedingt ist, dass die STEVOR-PCR erwartungsgemäß viele Proben positiv diagnostizierte. Ein bedeutender Teil dieser konnte sowohl von Mikroskopie, als auch Schnell-Test infolge unterlegener Empfindlichkeit nicht als positiv erkannt werden.

Der negative Prädiktionswert zeigte mit 100% erneut eine vollständige Übereinstimmung: Alle in der PCR-Methode negativ diagnostizierten Proben waren auch in der Kombination von Schnell-Test- und Mikroskopie-Ergebnissen negativ.

Die Sensitivität und der Negative Prädiktionswert der STEVOR-PCR von jeweils 100% lassen so eine zufällige Verteilung positiver PCR-Ergebnisse in dieser Studie als sehr unwahrscheinlich erscheinen.

7.3 Weitere Untersuchungen

7.3.1 Altersverteilung asymptomatischer Träger

Auf eine weiterführende Betrachtung der möglichen Abhängigkeit der Infektionsverteilung vom Alter wurde in diesem Kapitel verzichtet. Eine feinere Aufteilung der Probanden in Alterskategorien wäre durch noch kleinere Probengrößen statistisch nicht zumutbar; die Aufteilung der Probanden auf nur zwei Kategorien nicht unbedingt aussagekräftig.

Ein ausgeprägter Unterschied der Durchseuchung verschiedener Altersgruppen ist zwischen 18 und 50 Jahren eher nicht zu erwarten. Eine große Degradation der immunologischen Abwehrleistung und folglich erhöhtem Infektionsrisiko ist beim gesunden Menschen im Normalfall nicht vorhanden. Die Leistungsfähigkeit der Organe sieht sich mit höherem Alter sicherlich gemindert, die zwischenzeitlich erfolgte immunologische

Stimulation dürfte jedoch einer dadurch erhöhten Infektanfälligkeit entgegenwirken. Insgesamt lässt die enorme Komplexität des beeinflussenden Gefüges altersbedingter Faktoren, z.B. auch Ernährungsgewohnheiten (Alkoholabusus), Ernährungszustand (nach meinen Beobachtungen im mittleren Alter häufig besser) und bereits erfolgte und auskurierte Infektionen, keine leicht ersichtlichen, Deduktionen zu.

7.3.2 Geografische Verteilung asymptomatischer Träger

Die Ursache des hier zwischen Probanden aus Norden und Süden berechneten Unterschiedes in der Plasmodien-Durchseuchung ist nicht durch leicht erkennbare Unterscheidungsmerkmale der jeweiligen Wohnorte zu erklären, denn nach meinen Beobachtungen liegt eher eine Einheitlichkeit der ländlichen Bevölkerung hinsichtlich ihrer Lebensbedingungen, ihres geschätzten Einkommens und der ähnlichen Exposition gegenüber den Vektoren der Malaria vor. Alle Dörfer sind umgeben oder grenzen an große Bezirke mit Urwaldvegetation und den für den Vektor wichtigen, zahlreichen Feuchtbiotopen. Bei den von den Dorfbewohnern praktizierten Erwerbstätigkeiten handelte es sich meist um gering bezahlte Berufe mit Einkommens-Stützung durch kleine Subsistenz-Agrarwirtschaften der Familie, so dass aus wirtschaftlichen Gründen der größte Anteil der Unterkünfte einheitlich schlecht gegen die übertragenden Mücken gerüstet waren.

Der Grund für den in der statistischen Auswertung berechneten Verteilungs-Unterschied bleibt bei den hier vorliegenden Daten ungeklärt. Die Unzahl denkbarer Ursachen wie beispielsweise die für die Mückenlarven relevante Art (schnell, langsam oder nicht-fließend) und Zahl der Gewässer, die durch unterschiedliche Dorf zu Dorf Abstände oder den Personenverkehr beeinflusste Infektionsausbreitung, sowie auch die Stammeszugehörigkeit der Dorfbewohner mit teils besonderen Gewohnheiten, um nur Einige zu nennen, überschreiten die Prüfungsmöglichkeiten dieser Studie bei Weitem.

Der zwischen Lambaréné und nördlich bzw. südlich liegenden Dorfschaften fehlende statistische Unterschied ist hier wahrscheinlich auf die geringe und wenig repräsentative Zahl der 87 Probanden aus Lambaréné zurückzuführen. Die jeweils berechneten p -Werte stehen angesichts der für die Gesamtzahl der Bewohner Lambaréné relativ kleinen Anzahl von 87 Probanden sicherlich nicht für das reale Fehlen eines Unterschiedes, sondern sollten so ausgelegt werden, dass keine verlässliche Angabe hinsichtlich einer denkbaren, ortsbedingten Heterogenität der Anteile infizierter männlicher Bewohner gemacht werden kann. Die Stichprobengröße war für fundierte statistische Aussagen zu klein.

Andererseits muss auch berücksichtigt werden, dass die untersuchten Probanden aus Lambaréné nicht repräsentativ für die gesamte Stadtbevölkerung waren.

Im untersuchten Kollektiv waren nicht alle Bevölkerungsschichten vertreten, sondern vorwiegend Männer mit geringem Einkommen aus den außen liegenden Bezirken Lambaréné. Die meisten der Probanden aus Lambaréné waren im Stadtteil *Rimbounan* wohnhaft (75 von 87). Dieser äußere Stadtteil weist viele Ähnlichkeiten zu den entfernt gelegenen Dörfern auf und ist für das Zentrum Lambaréné wenig charakteristisch, denn er grenzt unmittelbar an ein großes Wald- und Feuchtgebiet. Der schlechte Zustand der Strasse nach *Rimbounan* schränkt zusätzlich trotz der geringen Entfernung zum Kern Lambaréné in direkter Luftlinie den Taxi-Verkehr sehr ein; die nach meinen Erfahrungen, für *Rimbounan* zum Untersuchungszeitpunkt üblichen Taxi-Transportkosten von ca. 800 cfa (~1,30€) pro Person ins Zentrum Lambaréné sind für die Bewohner dieses Orts kostspielig und entsprechen den Fahrtkosten aus Ortschaften in etwa 20 Km Entfernung entlang der Hauptstrasse.

Die postulierte Homogenität der Infektionsraten aufgrund der fortgeschrittenen Urbanisierung Lambaréné war eigentlich nicht zu erwarten gewesen, da die Lebensbedingungen der Einwohner dieser Stadt teilweise

sehr deutliche Unterschiede zu den umliegenden Dörfern aufwiesen. In Lambaréné kann von einem höheren mittleren Einkommen ausgegangen werden, was sich in der Qualität der Behausungen deutlich zeigt. Die Häusertypen reichen von, auch in Lambaréné anzutreffenden, Holzhütten bis zu klimatisierten Mehretagenbauten. Die Anfahrtskosten zu den Gesundheitszentren waren in Lambaréné niedriger (ca. 100cfa = 0,15 Euro), so dass die *P. falciparum* Durchseuchung in Lambaréné geringer als in den bis zu 20 Km entfernten Außenbezirken (ca. 1500 cfa = 2,30 Euro) sein sollte. Ein Unterschied in der Bevölkerungsdurchseuchung mit *P. falciparum* zwischen Lambaréné und nördlicher bzw. südlicher Umgebung ist somit vermutlich doch vorhanden^{52, 70}, kann aber mit den vorliegenden Daten nicht belegt werden. Für diese Untersuchung wäre eine umfangreiche Probandenrekrutierung im Bereich des Stadtzentrums sinnvoll gewesen, da dieses den übertragenden Mücken, im Gegensatz zu Ortschaften außerhalb Lambaréné, mit geringer Vegetation und weniger Feuchtgebieten wahrscheinlich eine reduzierte Zahl von Brutmöglichkeiten bietet.

Gegen große Unterschiede der Infektionsraten der drei untersuchten Gebiete spricht die in einer anderen Studie registrierte (unpublizierte Daten) und auch von mir beobachtete hohe Mobilität der Bevölkerung, die insbesondere während der Trockenzeit zum Fischfang, an Feiertagen und während der Schulferien auftrat. Ein Großteil der Familien aus Lambaréné zog dann zu den teils weit entfernten großen Seen des Landes, andere zu ihren Angehörigen in der Großstadt oder auf dem Land; eine umfangreiche Zahl zog auf ihre eigenen und meist walddaher gelegenen Pflanzungen und wandte sich dort der Jagd oder der Landwirtschaft zu. Die dann dort bewohnten Behausungen waren größtenteils noch schlechter gegen Mücken gerüstet als die Behausungen der gescreenten Ortschaften.

Eine homogene Durchseuchung mit *P. falciparum* ist daher bei diesen umfangreichen temporären Bevölkerungsverlagerungen in für den Vektor vorteilhafte Gebiete nicht unwahrscheinlich.

7.4 Schlussfolgerung

Die von der STEVOR-PCR bestimmte große Zahl asymptomatischer Träger, sowie die vielen Mikroskopie-Negativen Proben suggerieren eine große Dunkelziffer *P. falciparum* infizierter Männer in Lambaréné und Umgebung.

Die Bedeutung dieser großen Populationsanteile mit unauffälligen, niedrigen Parasitämien in sexueller und/oder asexueller Entwicklungsstufe als theoretisch mögliches Krankheitsreservoir bleibt hier ungeklärt.

Die in dieser Studie bei den asymptomatischen Trägern beobachteten, meist sehr niedrigen Parasitämien lassen, unter Berücksichtigung der minimalen vom Insekt aufgenommenen Blutmenge, das Risiko einer Infektion der Mücke mit sexuellen Parasitenformen sehr unwahrscheinlich erscheinen.

Es ist dennoch denkbar, dass eine Übertragung der Krankheitserreger von asymptomatischen Trägern auf nicht-infizierte Individuen bei hoher Stichfrequenz einer im gleichen Gebiet vorkommenden großen Mückenpopulation möglich ist.

Bei der hier beobachteten, großen Zahl asymptomatischer Träger lässt sich deduzieren, dass in Populationen mit hohem *P. falciparum*-Durchseuchungsgrad der diagnostische Wert eines positiven Plasmodien Befundes durch nicht-quantitative Verfahren, wie dem Now[®]-Malaria Schnell-Test und der STEVOR-PCR deutlich gemindert sein dürfte. Die sichere Diagnose einer *Malaria tropica* sollte demnach unter den oben erwähnten Bedingungen nur durch Bestimmung der Parasitendichte mit bewährten quantitativen Methoden, vorzugsweise durch Hinzuziehung der Mikroskopie, möglich sein. Das mikroskopische Detektionsverfahren für Plasmodien ist aufgrund der Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung aber auch qualitativen Differenzierung der Parasiten nach Spezies, sowie der Bestimmung sexueller und asexueller Stufen, für die meisten medizinischen und wissenschaftlichen Malaria-Untersuchungen unentbehrlich.

Die hier beobachteten Ergebnisse legen nahe, dass die mikroskopische Detektion in dieser Studie für eine treffsichere Identifizierung asymptomatischer *P. falciparum* Träger nicht ausreichend ausgeschöpft wurde. Bei der von zwei bis drei Mikroskopierern angewendeten Lesung von je 100 Feldern (also bis zu 300 Felder) ergab sich eine zu niedrige Sensitivität der Methode (22%). Sowohl Schnell-Test als auch STEVOR-PCR haben dagegen mit rein qualitativer Bestimmung im Sinne einer positiven oder negativen Diagnose zum Vorliegen von *P. falciparum* eine hier der Mikroskopie deutlich überlegene Sensitivität präsentiert. Gegenüber einer für den Now[®]-Malaria-Test aus anderen und voneinander unabhängigen Studien gemittelten Sensitivität von 96%, einer durchschnittlichen Spezifität von 97% und gemitteltem Positivem Prädiktionwert von 89% sowie Negativem Prädiktionwert von 98% (für meist oberhalb von 1000 Parasiten/ μ L bestimmte Parasitämien), zeigte der Schnell-Test bei den hier wesentlich niedrigeren Parasitämien einen reduzierten Sensitivitätswert von 47%. Die Spezifität in der Studie fiel bei diesem Vergleich knapp 6% niedriger aus, der positive Prädiktionwert lag hier dagegen 2% höher, der Negative Prädiktionwert betrug 36% weniger.^{m 72-80}

Angesichts der hier gemessenen guten Leistung des Now[®] Malaria Tests ist zu erwägen, ob bei zukünftigen wissenschaftlichen Untersuchungen mit Bestimmung asymptomatischer Parasitämien, sowie der Zahl sexueller und asexueller Parasitenformen, der Schnell-Test in der Reihenfolge diagnostischer Analysen der weiterhin unabdingbaren Mikroskopie voran gestellt werden kann.

Dies ist so zu verstehen, dass Mikroskopie und Schnell-Test nicht, wie in dieser Studie geschehen, nahezu zeitgleich ablaufen, sondern dass nach Auftrennung der Proben mit dem Now[®] Malaria Test in Positive und Negative, die positiven Versuchstücke erst im Anschluss zur Parasitämie-Bestimmung

^m Bei diesen Angaben handelt es sich um vom Verfasser gemittelte Werte aus den Ergebnissen von neun unabhängigen Studien zur Leistung des hier verwendeten Schnell-Tests. Literaturverzeichnis⁷²⁻⁸⁰

einer intensivierten Mikroskopie mit beispielsweise 400-500 zu untersuchenden Blickfeldern unterzogen werden.

Der große Zeitgewinn durch den rasch umsetzbaren Schnell-Test, könnte die im Nachhinein oft überflüssigen, langen Mikroskopierzeiten der negativen Proben aufheben.

Die so gewonnene Zeit könnte dann in eine mit Lesung von 500 Feldern sensitivere, aber bedeutend zeitintensivere, Mikroskopie investiert werden.ⁿ

Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein positiver Befund durch den Schnell-Test nicht zwingend das Vorliegen von *P. falciparum* im Probenblut bedeutet, denn der Now[®] Malaria Test detektiert nicht den lebenden Parasiten, sondern das von diesem produzierte HRP-2, das auch Tage bis Wochen nach vollständiger Abtötung der Parasiten im Blut des nachweisbar ist^{80, 81, 82, 83}. Bei Voranstellung des Schnell-Tests in der Proben-Analyse muss daher auch mit initial Schnell-Test positiven, dann jedoch mikroskopisch *P. falciparum*-negativen Proberesultaten gerechnet werden muss.

Der Einsatz der hier verwendeten Methode der STEVOR-PCR oder vergleichbarer Gen-Detektionsverfahren ist aufgrund der, im Vergleich zu Mikroskopie und Schnell-Test deutlich, höheren Sensitivität eine empfehlenswerte Methode bei Populationsuntersuchungen mit Bestimmung asymptomatischer Träger. So konnte in dieser Arbeit der Anteil asymptomatischer Träger unter den Probanden auch nur anhand der PCR-Ergebnisse zuverlässig bestimmt werden.

Aufgrund des auch hier beobachteten, für die STEVOR-PCR nötigen hohen zeitlichen, labortechnischen und auch finanziellen Aufwandes, sowie der nur qualitativ möglichen Beurteilung des Probenmaterials (positiv oder negativ) ist zu erwarten, dass diese Methode vorerst der Diagnostik mit wissenschaftlichem Ziel vorbehalten bleibt.

ⁿ Nach eigenen Beobachtungen beanspruchte allein die Lesung von 100 Blickfeldern etwa 9 Minuten Mikroskopierzeit, für 500 Felder ergeben sich folglich etwa 45 Minuten Untersuchungszeit je Probe.

8 Zusammenfassung

In den Jahren 2005-2006 wurden am Forschungszentrum am Albert-Schweitzer Hospital in Lambaréne/Gabun im Verlauf eines in drei Abschnitten durchgeführten Screenings, asymptomatische Träger von *P. falciparum* identifiziert. Zu diesem Zweck wurden drei unterschiedliche hämatologische Testverfahren eingesetzt, dabei wurden Männer für zukünftige, nachfolgende pharmakologische Untersuchungen in Lambaréné und Umgebung rekrutiert. Der Vergleich der verschiedenen Detektionsmethoden und ihrer Ergebnisse aus den drei Screenings ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die angewendeten Detektionsverfahren waren das mikroskopische Auszählen von Parasitämien im Dicken Tropfen gemäß der Lambaréne-Methode, der immunchromatografische Schnelltest Now[®] Malaria (Binax Inc.) und die gendiagnostische Untersuchung mittels STEVOR-PCR. Hierbei wurde der Durchseuchungsgrad innerhalb der untersuchten Probanden (n = 552) im Alter zwischen 18 und 51 untersucht, für Vergleichszwecke der drei Testverfahren wurden Sensitivitäts, Spezifitäts und Prädiktionswerte berechnet. Mögliche Alters- und Lage-bedingte Heterogenitäten innerhalb der Infektionsverteilung wurden mittels des χ^2 -Unabhängigkeits-Test geprüft.

Der Anteil asymptomatisch *P. falciparum* infizierter Probanden betrug laut STEVOR-PCR (Gold-Standard) 51% (Durchseuchungsgrad).

Für die STEVOR-PCR ergab sich eine Sensitivität von 100%, eine Spezifität von 63% sowie positive und negative Prädiktionswerte von 29, bzw. 100%.

Bei der mikroskopischen Blutprobenuntersuchung wurden eine Sensitivität von 22%, eine Spezifität von 99% sowie positive und negative Prädiktionswerte von 95, bzw. 55% festgestellt. Hier zeigte sich, dass die verwendete Lesung von nur 100 Feldern unzureichend war.

Der Schnell-Test lieferte eine Sensitivität von 47%, eine Spezifität von 91% sowie positive und negative Prädiktionswerte von 84, bzw. 62%. Es empfiehlt sich den Schnell-Test innerhalb der Verfahrenreihenfolge der Mikroskopie voranzustellen.

Eine Korrelation des Infektionsanteils mit dem Alter der Probanden, bzw. der Lage ihrer Wohnorte konnte anhand der zur Verfügung stehenden Datengrundlage nicht belegt werden.

9 Anhang

9.1 Rechenformeln

9.1.1 Statistische Maßzahlen

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{100 \times \text{Richtig-Positive}}{(\text{Richtig-Positive} + \text{Falsch-Negative})}$$

Definition: Anteil der auf *P. falciparum* positiv Diagnostizierten unter den asymptomatischen Trägern.

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{100 \times \text{Richtig-Negative}}{(\text{Richtig-Negative} + \text{Falsch-Positive})}$$

Definition: Anteil der als negativ Diagnostizierten unter den Nicht-Infizierten.

$$\text{Positiver Prädiktionswert (\%)} = \frac{100 \times \text{Richtig-Positive}}{(\text{Richtig-Positive} + \text{Falsch-Positive})}$$

Definition: Anteil der asymptomatischen Träger unter den als *P. falciparum*-positiv Diagnostizierten.

$$\text{Negativer Prädiktionswert (\%)} = \frac{100 \times \text{Richtig-Negative}}{(\text{Richtig-Negative} + \text{Falsch-Negative})}$$

Definition: Anteil der Nicht-Infizierten unter den als *P. falciparum*-negativ Diagnostizierten.

9.1.2 Konfidenzintervall-Berechnung

Wird für eine Stichprobe mit n Proben eine relative Häufigkeit p (auch: Responderrate) errechnet, so kann näherungsweise ein 95% Konfidenzintervall **KI** [$p_{\text{unterer Wert}}$, $p_{\text{oberer Wert}}$] in der Grundgesamtheit bestimmt werden.

$$p_{\text{unterer Wert}} = p - 1,96 \times \sqrt{(p \times (1-p)/n)} \quad p_{\text{oberer Wert}} = p + 1,96 \times \sqrt{(p \times (1-p)/n)}$$

9.1.3 Bonferroni-Methode

Die Bonferroni-Methode oder Bonferroni-Korrektur, nach dem italienischen Mathematiker Carlo Emilio Bonferroni (1892-1960), besagt, dass wenn k unabhängige Hypothesen an einem Datensatz getestet werden, das Signifikanzniveau α für jede Hypothese dem durch k , die Zahl der Hypothesen bzw. Tests, geteilten Gesamtrisiko α' entsprechen muss. Dabei gilt $k \geq 2$.

$$\alpha = \alpha' / k$$

Diese sehr konservative Approximation verteilt das globale Niveau zu gleichen Teilen auf die k Einzeltests, vermeidet so die Kumulierung der Einzelrisiken α über das Gesamtrisiko α' hinaus und schließt folgende Ungleichung aus.

$$\alpha' < \alpha \leq k \times \alpha'$$

9.2 Rechtliches

- Die Durchführung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Screening-Studie an asymptomatischen Trägern von *P. falciparum* in Lambaréné, Gabun, als Kooperationsprojekt zwischen dem Tropeninstitut an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls Universität in Tübingen, und der Unité de Recherches Médicales am Hôpital Albert-Schweitzer in Lambaréné, wurde nach Vorlage des Projektvorschlags und seines Ablaufplans vom international besetzten Ethik-Komitee der Stiftung des Albert-Schweitzer-Hospitals genehmigt.
- Die wissenschaftliche Auswertung der Ergebnisse dieser Screening-Studie zur Anfertigung seiner hier vorgelegten Dissertationsarbeit zur Erlangung des Doktorgrades in der Medizin, wurde mir am 25.04.2007 vom Ethik-Komitee der Eberhard Karls Universität zu Tübingen bewilligt.

-
- Alle an der Studie teilnehmenden Testpersonen, wurden vor Beginn der Probennahmen ausführlich über den medizinischen Eingriff und über die anschließenden Untersuchungen ihrer Blutproben informiert.
 - Die mündliche Aufklärung der Teilnehmer, die Erfassung persönlicher Angaben, die Probenentnahme und die Interpretation des Schnell-Tests, wurden stets von einem Arzt der Unité de Recherches Médicales am Hôpital Albert-Schweitzer, in Begleitung von einem oder zwei wissenschaftlichen Mitarbeitern des genannten Forschungslabors durchgeführt.
 - Die Einverständniserklärung der Probanden zur Teilnahme an der erwähnten Studie erfolgte ausnahmslos schriftlich und ist in keinem Fall widerrufen worden.

9.3 Verwendete Software

- | | |
|--|---------------------|
| • Microsoft® Word X for Apple/MacIntosh® | private Lizenz |
| • Microsoft® Excel X for Apple/MacIntosh® | private Lizenz |
| • LightWave 3D® ver.6.5 for Apple/MacIntosh® | private Lizenz |
| • Microsoft® Internet Explorer for Windows XP® | private Lizenz |
| • Mozilla® Firefox Webbrowser for Windows XP® | private Lizenz |
| • JMP® des SAS Institute, Inc. for Windows XP® | universitäre Lizenz |
| • ArcView® 3.2 von ESRI, Inc. for Windows XP® | universitäre Lizenz |
| • Microsoft® Paint for Windows XP® | private Lizenz |
| • Adobe® Photoshop® for Apple/MacIntosh® | private Lizenz |
| • Adobe® Photoshop® for Windows XP® | private Lizenz |

9.4 besuchte Websites

WHO:	http://www.who.int
Johns Hopkins University:	http://www.rad.jhmi.edu http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html
Malaria Manual:	http://www.up.ac.za/academic/biochem/afr/malaria/MANUAL.pdf
GOOGLE:	http://www.google.com
PUBMED:	http://www.pubmed.com
ESRI/ArcView:	http://www.esri.com
GPS:	http://www.vectorsite.net/ttgps_2.html
UNHCR:	http://www.unhcr.de
Site Officiel de la Présidence de la République du Gabon:	http://www.legabon.org

9.5 Angaben zu den kartografischen Abbildungen

Die in Abbildung 3 dargestellten Länderumrisse, Flussverläufe und der Umriss des Afrikanischen Kontinents, seiner vorgelagerten Inseln und Madagaskar, sowie den Positionen von Libreville und Lambaréné, entsprechen den geographisch real vorliegenden Umrissen, Verläufen und Positionen in der Aufsicht. Vegetationszonen und Trockenbereiche sind nur angedeutet und entsprechen nicht zwangsläufig wahren regionalen Gegebenheiten. Ursprungsansichten der dargestellten Karten wurden mit folgendem Programm erstellt: ArcView GIS 3.2 Copyright © 1992-1999 Environmental Systems Research Institute, Inc. / Lizenz: Karl-Eberhard Universität zu Tübingen mit ArcView® GIS Patch for Windows XP (for ArcView 3.2, 3.2a & 3.3) Copyright © 1992-2002 Environmental Systems Research Institute, Inc. / kostenlose Programmkorrektur. Die Metadaten stammen von World Resources Institute, World Conservation Monitoring Centre, und PADCO, Inc. (Africa Continental Shape, Gabon Country) und dem Africa Data Dissemination Service des USGS (**U**nited **S**tates **G**eographical **S**urvey)

(Gabon Rivers, Lakes and Administration Boundaries) und sind kostenfreie Internet-Downloads. Die weitere Bearbeitung der Ursprungsansichten erfolgte nach Layout-Export in Microsoft® Paint Version 5.1 Copyright © 1981-2001 Microsoft Corporation / pers. Lizenz und Adobe® Photoshop® Version 6.0 Copyright © 1989-2000 Adobe Systems Inc. / pers. Lizenz. Siehe hierzu auch Abbildung 5. Der mittlere Fluss-, sowie der Strassenverlauf entsprechen erneut geographisch real vorliegenden Verläufen in der Aufsicht. Metadaten der Strassen sind aus Central Africa Regional Program on the Environment (CARPE). Stadtteile und Flughafen in Abbildung 4 sind nach meinen guten Ortskenntnissen, sowie per GPS aufgezeichneten Positionen zufolge eingezeichnet worden.

10 Literaturverzeichnis

1. **Trigg, P.I, Kondrachine, A.V.**, 1998, The Current Global Malaria Situation Kapitel 2: 11-22, in: Sherman, I.W., 1998, *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, ASM Press, Washington, D.C.
2. **Laveran, A.**, 1881. Nature Parasitaire Des Accidents De L'impaludisme. Description D'un Nouveau Parasite Découvert Dans Le Sang De Malades Atteints De Fièvre Palustre. *C. R. Séances Acad. Sciences* **93**:627-630
3. **Laveran, A.**, 1880. Note Sur Un Nouveau Parasite Trouvé Dans Le Sang De Plusieurs Malades Atteints De Fièvre Palustre. *Bull. Acad. Med.* **9**:1235-1236
4. **Ross, R.**, 1897. On Some Peculiar Pigmented Cells Found In Two Mosquitos Fed On Malarial Blood. *Indian J. Malariol.* **34**(2): 47-55
5. **Bignami, A.**, 1899. Come Si Prendono Le Febbri Malariche. Ricerche Sperimentali. *Bull. della R. Acad. Med. di Roma* **a25**:1898-1899
6. **Wildling, E., Winkler, S., Kremsner, P.G., Brandts, C., Jenne, L., Wernsdorfer, W., H.**, 1995, Malaria Epidemiology In The Province Of Moyen Ogoue, Gabon. *Trop Med Parasitol*, **46**(2): 77-82
7. **WHO**, 2005, World Malaria Report 2005, Section II, Website <http://www.who.int>, besucht am 07.04.2007
8. **Silbermann, M.H., Stuiver, P.C.**, 1992, The Phenomenon Of The Delayed Initial Attack Of Tertian Malaria, *Ned Tijdschr Geneeskde* **3;136**(40):1984-1987
9. **Storch, V. & Welsch, U.**, 1993, Kükenthals Leitfaden Für Das Zoologische Praktikum 21. neubearbeitete Auflage. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-New York*
10. **Sherman, I.W.**, 1998, *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, ASM Press, Washington, D.C., Kapitel 1-4
11. **Barnwell, J.W., Galinski, M.R.**, Invasion Of Vertebrate Cells: Erythrocytes Kapitel 7: 93-112, in: Sherman, I.W., 1998, *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*, ASM Press, Washington, D.C.
12. **Agbenyega, T., Angus, B.J., Bedu-Addo, G., Baffoe-Bonnie, B., Guyton, T., Stacpoole, P.W., Krishna, S.**, 2000. Glucose And Lactate Kinetics In Children With Severe Malaria. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:1569-1576
13. **Day, N.P., Phu, N.H., Mai, N.T., Chau, T.T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Sinh, D.X., Holloway, P., Hien, T.T., White, N.J.**, 2000. The Pathophysiologic And Prognostic Significance Of Acidosis In Severe Adult Malaria. *Crit. Care Med.* **28**(2): 1833-1840
14. **Mehta, K.S., Halankar, A.R., Makawana, P.D., Torane, P.P., Satija, P.S., Shav, V.B.**, 2001. Severe Acute Renal Failure In Malaria. *J Postgrad Med* **47**(1):24-26
15. **Kumar, A., Haery, C., Parrillo, J.E.**, 2001. Myocardial Dysfunction In Septic Shock: Part I. Clinical Manifestation Of Cardiovascular Dysfunction. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **15**(4): 485-511

-
16. **Kwiatkowski, D., Hill, A.V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K.R., Cerami, A., Brewster, D.R., Greenwood, B.M.**, 1990. TNF Concentration In Fatal Cerebral, Non-Fatal Cerebral, And Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria. *Lancet* **336**(8725): 1201–1204
 17. **Day, N.P., Hien, T.T., Schollaardt, T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Chau, T.T., Mai, N.T., Phu, N.H., Sinh, D.X., White, N.J., Ho, M.**, 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J. Infect. Dis.* **180**(4): 1288–1297
 18. **Maitland, K., Marsh, K.** 2004, Pathophysiology Of Severe Malaria In Children, *Acta Trop* **90**(2): 131–140
 19. **Dondorp, A.M., Kager, P.A., Vreeken, J., White, N.J.**, 2000. Abnormal Blood Flow And Red Blood Cell Deformability In Severe Malaria. *Parasitol. Today* **16**(6): 228–232
 20. **WHO**, 2006, Guidelines For The Treatment Of Malaria, WHO/HTM/MAL/2006.1108 Website <http://www.who.int> besucht am 10.08.2007
 21. **Aikawa, M., Iseki, M., Barnwell, J.W., Taylor, D., Oo, M.M., Howard, R.J.**, 1990. The Pathology Of Human Cerebral Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**(2 P+2):30-37
 22. **WHO: Warrell, D.A., Molyneux, M.E., Beales, P.F.**, 1990. Severe And Complicated Malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, Suppl. 2(1990): 1-65
 23. **Hviid, L.**, 2005, Naturally Acquired Immunity To Plasmodium falciparum Malaria In Africa. *Acta Trop.* **95**(3): 270–275
 24. **Kwiatkowski, D.P.**, 2005, How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *Am. J. Hum. Genet.* **77**(2):171–190
 25. **Tebo, A.E., Kremsner, P.G., Piper, K.P., Luty, A.J.**, 2002. Low Antibody Responses To Variant Surface Antigens Of Plasmodium Falciparum Are Associated With Severe Malaria And Increased Susceptibility To Malaria Attacks In Gabonese Children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**(2): 597–603
 26. **Kun, J.F.J., Missinou, M.A., Lell, B., Sovric, M., Knoop, H., Bojowald, B., Dangelmaier, O., Kremsner, P.G.**, 2002 New Emerging Plasmodium Falciparum Genotypes In Children During The Transition Phase From Asymptomatic Parasitemia To Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**(6): 653-658
 27. **Deitsch, K.W., Hviid, L.**, 2004, Variant Surface Antigens, Virulence Genes And The Pathogenesis Of Malaria. *Trends Parasitol.* **20**(12): 562-566
 28. **Missinou, M.A., Lell, B., Kremsner, P.G.**, 2003, Uncommon Asymptomatic Plasmodium Falciparum Infections In Gabonese Children. *Clin. Infect. Dis.* **36**(9):1198-1202
 29. **Bousema, J.T., Gouagna, C.L., Drakeley, C.J., Meutstege, A.M., Okech, B.A., Akim I.N.J., Beier, J.C., Githure, J.I., Sauerwein, R.W.**, 2004, Plasmodium Falciparum Gametocyte Carriage In Asymptomatic Children In Western Kenya. *Mal. J.* **17**;3:18
 30. **Gupta, S., Snow, R.W., Donnelly, C.A., Marsh, K., Newbold, C.**, 1999. Immunity To Non-Cerebral Severe Malaria Is Acquired After One Or Two Infections. *Nat. Med.* **5**: 340–343
 31. **WHO**, 2005, World Malaria Report 2005, Section II, Website <http://www.who.int>, besucht am 07.04.2007

-
32. **Planche T., Krishna S., Kombila M., Engel K., Faucher J.F., Ngou-Milama E., Kremsner P.G.**, 2001, Comparison Of Methods For The Rapid Laboratory Assesment Of Children With Malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**(5): 599-602
 33. **WHO**, 2005, Interim Notes On Selection Of Type Of Malaria Rapid Diagnostic Test In Relation To The Occurence Of Different Parasite Species-Guidance For National Malaria Control Programmes, Roll Back Malaria Department WHO, Website <http://who.int> besucht am 22.10.2006
 34. **Kilejian, A.**, 1974, A Unique Histidine-Rich Polypeptide From The Malaria Parasite, *Plasmodium lophurae*. *J. Biol. Chem.* **25**;249(14):4650-4655
 35. **Sharma, Y.D.**, 1988, Genomic Organization, Structure And Possible Function Of Histidine-Rich Proteins Of Malaria Parasites, *Int. J. Biochem.* **20**(5):471-477
 36. **Panton, L. J., P. McPhie et al.** (1989). Purification And Partial Characterization Of An Unusual Protein Of Plasmodium Falciparum: Histidine-Rich Protein II, *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**(2): 149-160
 37. **Noedl, H., Wongsrichanalai, C., Miller, R.S., Myint, K.S.A., Loareesuwan, S., Sukthana, Y., Wongchotigul, V., Kollaritsch, H., Wiedermann, G., Wernsdorfer, W.H.**, 2002, Plasmodium falciparum: Effect Of Anti-Malarial Drugs On The Production And Secretion Characteristics Of Histidine-Rich Protein II, *Exp. Parasitol.* **102**(3-4): 157-163
 38. **Binax Inc.**, 2006, A Rapid Whole Blood Immunochromatographic Test (ICT) For The Qualitative Detection Of Plasmodium falciparum (P.f.), Plasmodium vivax (P.v.), Plasmodium Malariae (P.m.) And Plasmodium Ovale (P.o.) Antigens For In Vitro Diagnostic Use. Product Insert NOW® MALARIA, (Produkt-Beipackzettel, auch unter <http://www.binax.com> verfügbar)
 39. **Dobeli, H. Itin, C., Meier, B., Certa, U.**, 1991 Is Plasmodium Falciparum Aldolase useful for rational drug design?, *Acta Leiden*, **60**(1): 135-140
 40. **Sherman, I.W.**, Carbohydrate Metabolism of Asexual Stages in Sherman, I.W. (ed.), 1998, Malaria: Parasite biology, Pathogenesis, and Protection, *Am. Soc. Microbiol.* **9**:136-137
 41. **Stryer, L.**, 1994, Biochemie. Völlig neubearbeitete Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford*
 42. **Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.**, 1994, Prinzipien der Biochemie. 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford*
 43. **Dobeli, H., Trzeciak, A., Gillessen, D., Matile, H., Srivastava, I.K., Perrin, L.H., Jakob, P.E., Certa, U.**, 1990, Expression, Purification, Biochemical Characterization And Inhibition Of Recombinant Plasmodium Falciparum Aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**(2):259-268
 44. **Lee, N., Baker, J., Bell D, McCarthy, J., Cheng, Q.**, 2006, Assessing The Genetic Diversity Of The Aldolase Genes Of Plasmodium Falciparum And Plasmodium Vivax And Its Potential Effect On Performance Of Aldolase-Detecting Rapid Diagnostic Tests, *J. Clin. Microbiol.* **44**(12): 4547-4549
 45. **Moody, A.**, 2002, Rapid Diagnostic Tests For Malaria Parasites, *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(1):66-78
 46. **Mullis, K. B., Faloona, F.**, 1987, Specific Synthesis Of DNA In Vitro Via A Polymerasecatalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350

-
47. **McPherson, M.J., Møller, S.G.**, 2006, PCR. 2nd Edition. *Taylor & Francis. New York*
 48. **Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M.**, 2000, An Introduction to Genetical Analysis. 7th Edition. *W.H. Freeman and Company, New York*
 49. **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.**, 1988, Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science* **239**(4839): 487–491
 50. **Mortimer, C.E.**, 1996, Chemie: Das Basiswissen der Chemie. 6. Auflage. *Georg Thieme-Verlag, Stuttgart-New York*
 51. **Cheng Q., Lawrence G., Reed C., Stowers A., Ranford-Cartwright L., Creasey A., Carter R., Saul A.**, 1997, Measurement Of Plasmodium Growth Rates In Vivo: A Test Of Malaria Vaccines, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **57**(4): 495-500
 52. **Sylla, E.H., Kun, J.F., Kremsner, P.G.**, 2000, Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans. R. Soc. Trop Med. Hyg.* **94**(6): 652-656
 53. **Cheng, Q., Cloonan, N., Fischer, K., Thompson, J., Waive, G., Lanzer, M., Saul, A.**, 1998, Stevor And Rif Are Plasmodium Falciparum Multicopy Gene Families Which Potentially Encode Variant Antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**(1-2): 161–176
 54. **McRobert, L., Preiser, P., Sharp, S., Jarra, W., Kaviratne, M., Taylor, M.C., Renia, L., Sutherland, C.J.**, 2004, Distinct Trafficking and Localization of STEVOR Proteins in Three Stages of the Plasmodium falciparum Life Cycle, *Infect. Immun.* **72**(11): 6597–6602
 55. **Kaviratne, M., Khan, S.M., Jarra, W. and Preiser, P.R.**, 2002, Small Variant STEVOR Antigen Is Uniquely Located Within Maurer's Clefts In Plasmodium Falciparum-Infected Red Blood Cells. *Eukaryot. Cell* **1**(1): 926–935
 56. **Blythe, J., Surenteran, T., Preiser, P.R.**, 2004, STEVOR - A Multifunctional Protein? *Mol. Biochem. Parasitol.* **134**(1): 11–15
 57. **Rasti, N., Wahlgren, M., Chen, Q.**, 2004, Molecular Aspects Of Malaria Pathogenesis, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**(1): 9–26
 58. **Snow R., W, Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y., Hay, S.I.**, 2005, The Global Distribution Of Clinical Episodes Of Plasmodium Falciparum Malaria. *Nature* **434**: 214–217
 59. **Steffen, R., deBernardis, C., Baños, A.**, 2003, Travel Epidemiology - A Global Perspective, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **21**(2):89-95
 60. **United Nations High Commissioner for Refugees**, 2007, UNHCR-Statistik, Ende 2005, Internet-Publikation, Website besucht am <http://www.unhcr.de/statistiken.html>
 61. **Bruce-Chwatt, L.J.**, 1988, History Of Malaria From Prehistory To Eradication, p.1-59 in W.Wernsdorfer and I. McGregor (ed.) , Malaria, Principles and Practice of Malariology, Vol. 1. *Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom*
 62. **WHO/TDR**, 2004, Malaria –Disease Watch-Focus, Website <http://www.who.int/tdr>, besucht am 15.07.2007
 63. **Alves, F.P., Gil, L.H., Marrelli, M.T., Ribolla, P.E., Camargo, E.P., Da Silva, L.H.**, 2005, Asymptomatic Carriers Of Plasmodium Spp. As Infection Source For Malaria Vector Mosquitoes In The Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* **42**(5): 777-779

-
64. **Site Officiel de la Présidence de la République du Gabon**, 2007, Website <http://www.legabon.org> besucht am 10.07.2007
 65. **Mayor, A., Aponte, J.J., Fogg, C., Saúte, F., Greenwood, B., Dgedge, M., Menendez, C., Alonso, P.L.**, 2007, The Epidemiology Of Malaria In Adults In a Rural Area Of Southern Mozambique. *Malar. J.* **17**;6:3
 66. **Trampisch, H.J., Windeler, J.**, 1996, Medizinische Statistik, *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York*
 67. **Preacher, K.J.**, 2001, Calculation For The Chi-Square Test: An Interactive Calculation Tool For Chi-Square Tests Of Goodness Of Fit And Independence [Computer software]. Available from <http://www.quantpsy.org>., Website <http://www.psych.ku.edu/preacher/chisq/chisq.html> besucht am 10.07.2007
 68. **Aickin, M., Gensler, H.**, 1996, Adjusting For Multiple Testing When Reporting Research Results: The Bonferroni Vs Holm Methods, *Am. J. Public Health* **86**: 726–728
 69. **Bland, J.M., Altman, D.G.**, 1995, Multiple Significance Tests: The Bonferroni Method, *Br. Med. J.* **310**: 170
 70. **Wongsrichanalai, C., Arevalo, I., Laoboonchai, A., Yingyuen, K., Miller, R.S., Magill, A.J., Forney, J. R., Gasser Jr, R.A.**, 2003, Rapid Diagnostic Devices For Malaria: Field Evaluation of a New Prototype Immunochromatographic Assay For The detection Of Plasmodium Falciparum And Non-Falciparum Plasmodium, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**(1): 26–30
 71. **Coene, J.**, 1993, Malaria In Urban And Rural Kinshasa: The Entomological Input. *Med. Vet. Entomol.* **7**(2): 127-137
 72. **Jelinek, T., Grobusch, M.P., Schwenke, S., Steidl, S., von Sonnenburg, F., Nothdurft, H.D., Klein, E., Löscher, T.**, 1999, Sensitivity And Specificity Of Dipstick Tests For Rapid Diagnosis Of Malaria In Nonimmune Travellers, *J. Clin. Microbiol.* **37**(3): 721–723
 73. **Jelinek, T., Grobusch, M.P., Nothdurft, H.D.**, 2000, Use Of Dipstick Tests For The Rapid Diagnosis Of Malaria In Nonimmune Travellers. *J. Travel Med.* **7**(4): 175-179
 74. **Grobusch, M.P., Hanscheid, T., Gobels, K., Slevogt, H., Zoller, T., Rogler, G., et al.**, 2003, Comparison Of Three Antigen Detection Test For Diagnosis And Follow-Up Of Falciparum Malaria In Travellers Returning To Berlin, Germany. *Parasitol. Res.* **89**(5): 354-357
 75. **Arróspide, N., Marquiño, W., Gutiérrez, S.**, 2004, Evaluación De Una Prueba Inmunocromatográfica ICT P.F/P.V Para El Diagnóstico De Malaria Por Plasmodium Falciparum y Plasmodium Vivax En Establecimientos De La Macroregión Norte Del Perú, *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* **21**(3): 134
 76. **Farcas, G.A., Zhong, K.J.Y., Lovegrove, F.E.**, 2003, Evaluation Of The Binax Now(R) ICT Test Versus Polymerase Chain Reaction And Microscopy For The Detection Of Malaria In Returned Travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**(6): 589–592
 77. **Harani, M.S., Beg, M.A., Khaleeq, L., Adil, S.N., , Kakepoto, G.N., Khurshid, M.**, 2006, Role of ICT Malaria Immunochromatographic Test For Rapid Diagnosis Of Malaria. *J. Pak. Med. Assoc.* **56**(4): 167-171
 78. **Durand, F., Crassous, B., Fricker-Hidalgo, H., Carpentier, F., Brion, J.P., Grillot, R., Pelloux, H.**, 2005, Performance Of The Now Malaria Rapid Diagnostic Test With Returned Travellers: A 2-Year Retrospective Study In A French Teaching Hospital, *Clin. Microbiol. Infect.* **11**(11): 903–907

-
79. **Arai, M., Ishii, A., Matsuoka, H.**, 2004, Laboratory Evaluation Of The ICT Malaria P.F./P.V. Immunochromatographic Test For Detecting The Panmalarial Antigen Using A Rodent Malaria Model, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**(2): 139–143
 80. **Tjitra, E., Suprianto, S., Dyer, M., Currie, B.J., Anstey, N.M.**, 1999, Field Evaluation Of The ICT Malaria P.F./P.V Immunochromatographic Test For Detection Of Plasmodium Falciparum And Plasmodium Vivax In Patients With A Presumptive Clinical Diagnosis Of Malaria In Eastern Indonesia, *J. Clin. Microbiol.* **37**(8): 2412–2417
 81. **Rubio, J.M., Buhigas, I., Subirats, M., Baquero, M., Puente, S., Benito, A.**, 2001, Limited Level Of Accuracy Provided By Available Rapid Diagnosis Tests For Malaria Enhances The Need For PCR-Based Reference Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2736–2737
 82. **Bell, D.R., Wilson, D.W., Martin, L.B.**, 2005, False-Positive Results Of A Plasmodium Falciparum Histidine-Rich-Protein 2–Detecting Malaria Rapid Diagnostic Test Due To High Sensitivity In A Community With Fluctuating Low Parasite Density, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**(1): 199–203
 83. **Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Loareesuwan, S., White, N.J.**, 2001, Persistence Of Plasmodium Falciparum HRP-2 In Successfully Treated Acute Falciparum Malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 179–182

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Peter Kremsner vom Institut für Tropenmedizin der Eberhard-Karls Universität zu Tübingen der mir die wissenschaftliche und ärztliche Tätigkeit in Lambaréné, sowie die vorliegende Dissertationsarbeit mit Bereitstellung des auszuwertenden Datenmaterials ermöglichte.

Prof. Dr. med. Martin Grobusch, an der Infectious Diseases Unit, Division of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, National Health Laboratory Service and School of Pathology Faculty of Health Sciences der Witwatersrand Universität in Johannesburg, Südafrika, als auch dem Team der SP-Studie in Lambaréné danke ich für die gute Zusammenarbeit an sonnigen und verregneten Tagen.

Ich danke der Verwaltung des Hôpital du Dr. Albert Schweitzer in Lambaréné, Gabun für die amtliche und organisatorische Unterstützung sowie dem Ärzte- und Pflegeteam des Krankenhauses für die oft erbrachte Hilfestellung.

Dr. med. Bertrand Lell danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung und Interpretation der Studiendaten.

Dr. med. Saadou Issifou, Dr. med. Michel Missinou, Dr. med. Christian Supan, Dr. med. Carmen O. Salazar, Ghyslain M. Ngoma, Philemon Koumba-Koumba, Leonce M. Mbadinga für ihre Arbeit am Laboratoire de Recherches und ihren Einsatz im Rahmen des hier untersuchten Screenings.

Mein besonderer Dank gilt hier Dr. med. Matthias Dal-Bianco, dessen Tätigkeit und Erfahrungen im Rahmen des Screenings für diese Dissertation von großer Wichtigkeit waren.

Marcel Nkeyi, Anselme Ndzengue, Brigitte Migombet, Ariane Ntseyi danke ich für die mikroskopische Untersuchung der Proben.

Hier gilt es insbesondere auch Judith Kammer zu nennen, der mit ihrem außerordentlichen Arbeitseinsatz am Labor der reibungslose Ablauf vieler Untersuchungen zu verdanken ist.

PD rer. nat. Jürgen F. J. Kun und TA Andrea Weierich vom Institut für Tropenmedizin der Eberhard-Karls Universität zu Tübingen möchte ich für ihren wichtigen Studienbeitrag mit Untersuchung der Screening-Proben mittels STEVOR-PCR danken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie: Meinen Eltern, die bei der Internet-Recherche für mich die Dissertationsmöglichkeit am Forschungslabor in Lambaréné entdeckten und stets mit fachkundigem Rat und Tat zur Seite standen, meinem Bruder für die gewissenhafte Korrekturlesung und Beratung, sowie meiner Frau für ihre liebevolle Zuwendung und geduldige Unterstützung während meiner wochenlangen Vereinnahmung am PC.

Weiter danke ich hier auch Fazilet Bekbulat die beratend, als auch mit Bereitstellung von Wohn- und Arbeits-Räumlichkeiten und elektronischem Gerät von großer Hilfe war.

12 Lebenslauf: Kai B. Köster

Name: Kai Buscalavida Köster

Geburtsdaten: 30 Oktober 1975, Wolfratshausen, Deutschland.

Nationalität: Deutscher

Schulbildung:

1981 – 1984 Grundschule „Escuela Fiscal Mixta Galo Plaza Lasso“, Puerto Ayora, Santa Cruz, Galápagos Archipel, Ecuador.

1982 – 1987 Fernunterricht der „Deutschen Fernschule Gießen“, und des „Instituts für Lernsysteme Hamburg“, Deutschland.

1987 – 1994 Colegio Alemán, Quito, Ecuador.

- Ecuatorianisches „Bachillerato“, 1993.
- Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife, 1994.

Studium:

1995 Pflegepraktikum am Paul-Lechler Krankenhaus in Tübingen, Deutschland.

1995 – 2002 Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz, Deutschland.

- 1. Examen „Ärztliche Vorprüfung“, 1998.
- Famulatur in der Abteilung für Anästhesie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik, Tübingen, Deutschland.
- 2. Examen „Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung“, 1999.
- Famulatur in der Pädiatrischen Intensivstation der Universitätskliniken in Valencia, Spanien.
- Famulatur in der Praxis des Kinderarztes Dr. med. Siegfried Kroll in Mainz, Deutschland.
- Famulatur in der Abteilung für Kieferchirurgie der Medizinischen Fakultät der Johannes-Gutenberg Universität, Mainz, Deutschland.
- 3. Examen „Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“, 2001.
- 4. Examen „Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“, 24. Oktober 2002.

Praktisches Jahr (2001 – 2002):

- Allgemeine Chirurgie im “Hospital Enrique Garcés” und “Hospital General No.1 de las Fuerzas Armadas del Ecuador”, Quito, Ecuador.
- Innere Medizin im “Hospital Voz Andes”, Quito, Ecuador.
- Hals-Nasen-Ohren Heilkunde an der “Hessenklinik”, Rüsselsheim, Deutschland.

2. Mai, 2003

Vorläufige Approbation als Arzt.

2003 – 2004

„Arzt im Praktikum“ in den Abteilungen für Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie des Sankt Franziskus Hospitals, Köln, Deutschland.

08. November, 2004

Ärztliche Approbation.

2005-2006

Tätigkeit als Arzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Tropenmedizinischen Forschungslabor des "Hôpital du Albert Schweitzer" in Lambaréné/Gabun/Westafrika.

2007

Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie des Klinikums Bad Hersfeld, Deutschland.

Bad Hersfeld, den 10.07.2008