

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

Hämozoin-Detektion durch Laser-Durchflusszytometrie-
Technik bei Malariapatienten in Lambaréné, Gabun:
Sensitivität, Spezifität und prognostischer Wert

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Matthias Urs Längin
aus Lörrach

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
Erster Berichterstatter: Professor Dr. M. P. Grobusch
Zweiter Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

1	Einleitung.....	7
1.1	Malaria	7
1.1.1	Malaria – Definition.....	7
1.1.2	Malaria – Geschichte.....	7
1.1.3	Malaria – Vermehrungszyklus	7
1.1.4	Malaria – Epidemiologie	9
1.1.5	Malaria – Klinik, Pathophysiologie und Immunologie	11
1.1.6	Malaria bei Kindern und in der Schwangerschaft	13
1.1.7	Malaria – Diagnostik	14
1.1.8	Behandlung und Prävention	18
1.2	Malariapigment	19
1.2.1	Geschichte des Malariapigments	19
1.2.2	Entstehung des Malariapigments	21
1.2.3	Hämozoin und Immunantwort	24
1.2.4	Pigment und Diagnostik	25
1.2.5	Pigment und Prognose/Schwere der Erkrankung	26
1.2.6	Pigment und Medikamente.....	27
1.3	Cell-Dyn 3000® und Durchflusszytometrie	28
1.3.1	Geschichte und Methoden der automatischen Blutbildbestimmung .	28
1.3.2	Durchflusszytometrie und Malaria – Vorarbeiten.....	30
1.3.3	Cell-Dyn® und Malaria – Vorarbeiten.....	32
1.4	Gegenstand der vorliegenden Studie	36
2	Material und Methoden.....	39
2.1	Studienort	39
2.2	Patienten und Probanden	41
2.3	Hard- und Software.....	43
2.4	Geräte und Chemikalien	44
2.5	Malaria-Diagnostik	44
2.6	Funktion des Cell-Dyn 3000®	45
2.6.1	Grundlagen	45
2.6.2	Leukozytendifferenzierung durch Scattergramme.....	48
2.6.3	Optische Darstellung der Ergebnisse	51

2.6.4 Methoden zur Auswertung der Cell-Dyn 3000 [®] -Analysen	52
2.7 Durchführung der Studie	55
2.8 Methoden der statistischen Auswertung	56
3 Ergebnisse	57
3.1 Demographische Daten	57
3.1.1 Altersgruppen	57
3.1.2 Diagnosegruppen	57
3.1.3 Gesamtübersicht des Patientenkollektives	58
3.1.4 Zusammensetzung der nicht malariakranken Probanden	59
3.1.5 Kriterienverteilung für komplizierte Malaria	60
3.2 Ergebnisse von Mikroskopie und Cell-Dyn 3000 [®]	61
3.2.1 Hämozoinhaltige Leukozyten in Prozent (PCMs/PCNs).....	61
3.2.2 Atypische Punktsignale (AVPs/AGPs) und Scatterindex.....	63
3.3 Korrelationen	65
3.3.1 Korrelation zwischen PCMs und AVPs.....	65
3.3.2 Korrelation zwischen PCNs und AGPs.....	66
3.4 Vergleich zwischen Mikroskopie und Durchflusszytometrie	67
3.4.1 Vergleich zwischen PCMs und AVPs	68
3.4.2 Vergleich zwischen PCNs und AGPs	71
3.5 Sensitivität und Spezifität der Cell-Dyn 3000 [®] für akute Malaria.....	74
3.5.1 Sensitivität und Spezifität bei Kindern	75
3.5.2 Sensitivität und Spezifität bei Erwachsenen.....	77
3.6 Untersuchungen zur Prognoseerhebung durch die Cell-Dyn 3000 [®]	81
3.6.1 AVPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria	81
3.6.2 AGPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria	82
3.6.3 Scatterindizes bei unkomplizierter und komplizierter Malaria	83
3.6.4 ROC-Kurven für komplizierte Malaria.....	85
4 Diskussion	89
4.1 Demographische Daten	89
4.2 Ergebnisse von Mikroskopie und Cell-Dyn 3000 [®]	90
4.2.1 Hämozoinhaltige Leukozyten (PCMs und PCNs).....	90
4.2.2 Atypische Punktsignale (AVPs und AGPs).....	91

4.2.3 Scatterindex	92
4.3 Korrelationen	93
4.4 Vergleich Mikroskopie und Durchflusszytometrie	96
4.5 Sensitivität und Spezifität der Cell-Dyn 3000® für akute Malaria.....	102
4.5.1 Sensitivität und Spezifität für AVPs bei Kindern/Erwachsenen	102
4.5.2 Sensitivität und Spezifität für AGPs bei Kindern/Erwachsenen	107
4.6 Untersuchungen zur Prognoseerhebung durch die Cell-Dyn 3000®	114
4.6.1 AVPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria	114
4.6.2 AGPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria	115
4.6.3 Scatterindizes bei unkomplizierter und komplizierter Malaria	116
4.6.4 ROC-Kurven für komplizierte Malaria	117
5 Zusammenfassung	121
6 Abkürzungsverzeichnis	123
7 Anhang – Studien-Datenblatt und Rohdaten	127
8 Literaturverzeichnis	139
9 Danksagung	151
10 Lebenslauf.....	153

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Malaria – Definition

Malaria ist bezüglich der Morbidität und Mortalität neben Tuberkulose und HIV/AIDS weltweit einer der bedeutendsten Infektionskrankheiten. Sie ist eine vektorübertragene Erkrankung, die von *Plasmodium* spp., einem Protozoon des Stammes *Sporozoa*, verursacht wird.

Von etwa 100 Plasmodienarten sind vier humanpathogen: *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, Erreger der Malaria tertiana. *Plasmodium falciparum* ist die weltweit am häufigsten vorkommende und gefährlichste Art.

1.1.2 Malaria – Geschichte

Nachdem bereits Hippokrates über das periodische Fieber berichtet hatte, konnte 1880 Laveran als erster Plasmodien im menschlichen Blut nachweisen. Golgi klärte daraufhin im Jahre 1886 den Zusammenhang zwischen Malariafieber und Parasiten. Ross konnte 1897 durch Fütterung von menschlichem Blut an Mücken der Gattung *Anopheles* den Übertragungsweg aufklären. Einige Jahre später deckte er den kompletten Lebenszyklus auf, indem er Plasmodien durch Mückenstich auf zuvor nicht infizierte Vögel übertrug. Ross und Laveran erhielten für ihre Arbeiten 1902 bzw. 1907 den Nobelpreis.

1.1.3 Malaria – Vermehrungszyklus

Die Malariainfektion beginnt mit der Inokulation von Sporozoiten in den menschlichen Blutkreislauf während der Blutmahlzeit der weiblichen Anopheles-Mücke. Sporozoiten werden vor der Blutaspiration beim Suchen eines Blutgefäßes aus den Speicheldrüsen injiziert. Sie gelangen von der

Einstichstelle entweder direkt oder über die Lymphgefäße in die Blutbahn und erreichen dann die Hepatozyten, wo eine erste asexuelle Reproduktion stattfindet (Gewebschizogonie). Der infizierte Hepatozyt rupturiert und entlässt Merozoiten in die Blutbahn. Während dieser präerythrozytären oder hepatischen Phase, die je nach Spezies zwischen sechs und 15 Tagen dauern kann, ist die Infektion asymptomatisch.

Bei *Plasmodium vivax* und *ovale* verbleibt ein Teil der Sporozoiten als Hypnozoiten in den Hepatozyten, von wo Monate und Jahre später ein Wiederaufflammen der Infektion stattfinden kann.

Die in die Blutbahn entlassenen Merozoiten dringen in Erythrozyten ein. Dort ernähren sie sich vom Hämoglobin des Erythrozyten. Bei dessen Proteolyse freigesetztes Häm wird durch spontane Dimerisierung entgiftet und als inerte kristalline Substanz, dem sog. Hämozoin, in einer Nahrungsvakuole gespeichert. In den ersten Stunden des erythrozytären Stadiums bezeichnet man den Parasiten als Ringform, mit dem Auftreten von Malariapigment als Trophozoit, und nach etwa 36 Stunden mit dem Auftreten von Kernteilungen als Schizont. Dieser füllt schließlich den gesamten Erythrozyten aus, welcher dann rupturiert und zwischen sechs und 36 Merozoiten frei gibt. Diese wiederum befallen andere Erythrozyten und beginnen einen neuen asexuellen Zyklus. Der intraerythrozytäre Zyklus dauert bei *Plasmodium malariae* etwa 72h, bei den anderen Plasmodienarten etwa 48h. Parasitenwachstum und Schizogonie verlaufen oft synchronisiert, worauf es nach Zerfall der Erythrozyten und Freisetzung von Pyrogenen zu einem erneuten Fieberschub kommt.

Neben der asexuellen Phase im Menschen existiert eine sexuelle Phase in der Mücke. Nach einigen intraerythrozytären Zyklen treten sexuelle Formen auf, Makrogametozyten und Mikrogametozyten. Diese werden von einer saugenden weiblichen Anopheles-Mücke aufgenommen. Im Magen der Mücke kommt es zur Fusion der männlichen und weiblichen Gametozyten. Die daraus entstehende Ookinete durchbohrt die Magenwand und bildet die Oozyste. Diese wächst und entlässt schließlich tausende von Sporozoiten in die Zölonhöhle der Mücke, von wo sie in die Speicheldrüse einwandern und somit den Zyklus schließen.

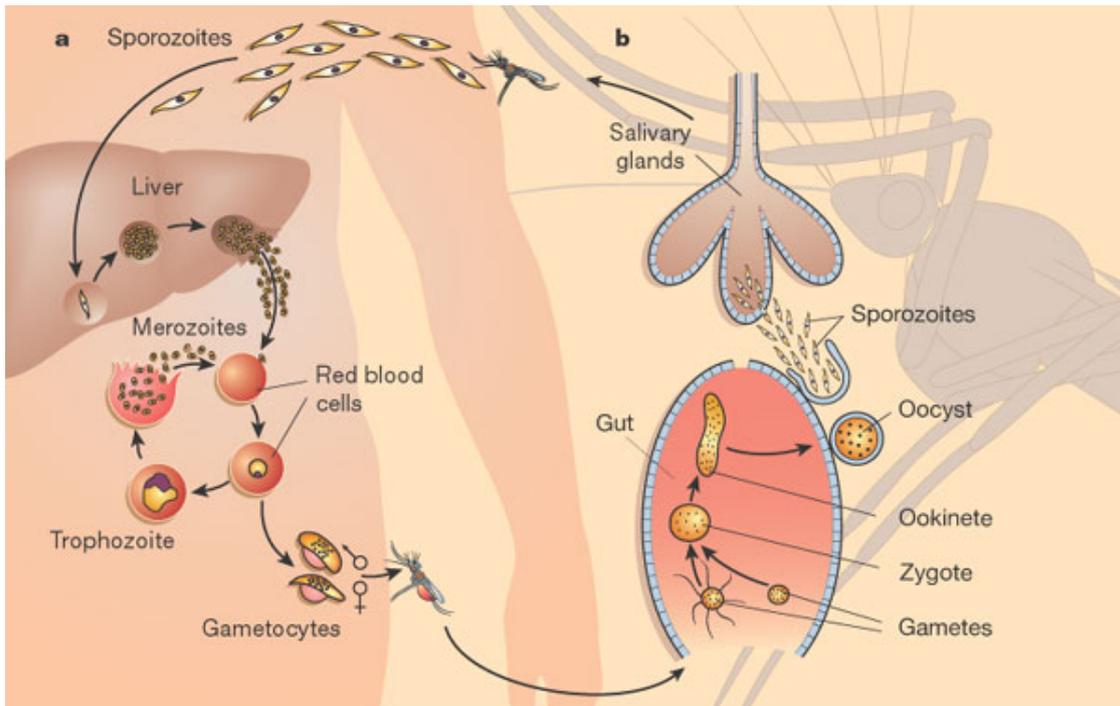


Abb. 1: Malaria-Zyklus (Abb. aus Wirth, DF: *Biological Revelations; Nature*, 2002)

1.1.4 Malaria – Epidemiologie

Mehr als 40% der Weltbevölkerung in über 90 Ländern leben in den tropischen und subtropischen Malariarisikogebieten. Jährlich erkranken etwa 350-500 Millionen Menschen an Malaria, von denen zwischen 1,5 und 2,7 Millionen versterben, darunter fast ausschließlich Kinder in Schwarzafrika mit *Plasmodium falciparum*-Infektionen (127). Etwa 1 Millionen Menschen versterben jährlich alleine in Afrika, 90% aller Todesfälle sind Kleinkinder unter 5 Jahren.

Ca. 90% der durch Malaria verursachten Todesfälle weltweit sind in Ländern südlich der Sahara zu verzeichnen. Ursachen hierfür sind die hohe Letalität der am weitesten verbreiteten Spezies *Plasmodium falciparum*, der schwierig zu kontrollierende Vektor *Anopheles gambiae* und die schlechte soziale, kulturelle und ökonomische Situation in vielen afrikanischen Staaten.

Zwischen den südlich der Sahara gelegenen Gebieten und dem 28. Breitengrad ist Malaria endemisch. In diesen Gebieten sind vor allem Kleinkinder und schwangere Frauen gefährdet, während Erwachsene durch ständige Reinfektion eine Semi-Immunität erworben haben. Im Süden und Norden dieses Gürtels tritt Malaria eher saisonal auf, es kommen vermehrt *Plasmodium ovale*, *vivax* und *malariae* vor. Mortalität und Morbidität sind weitaus geringer.

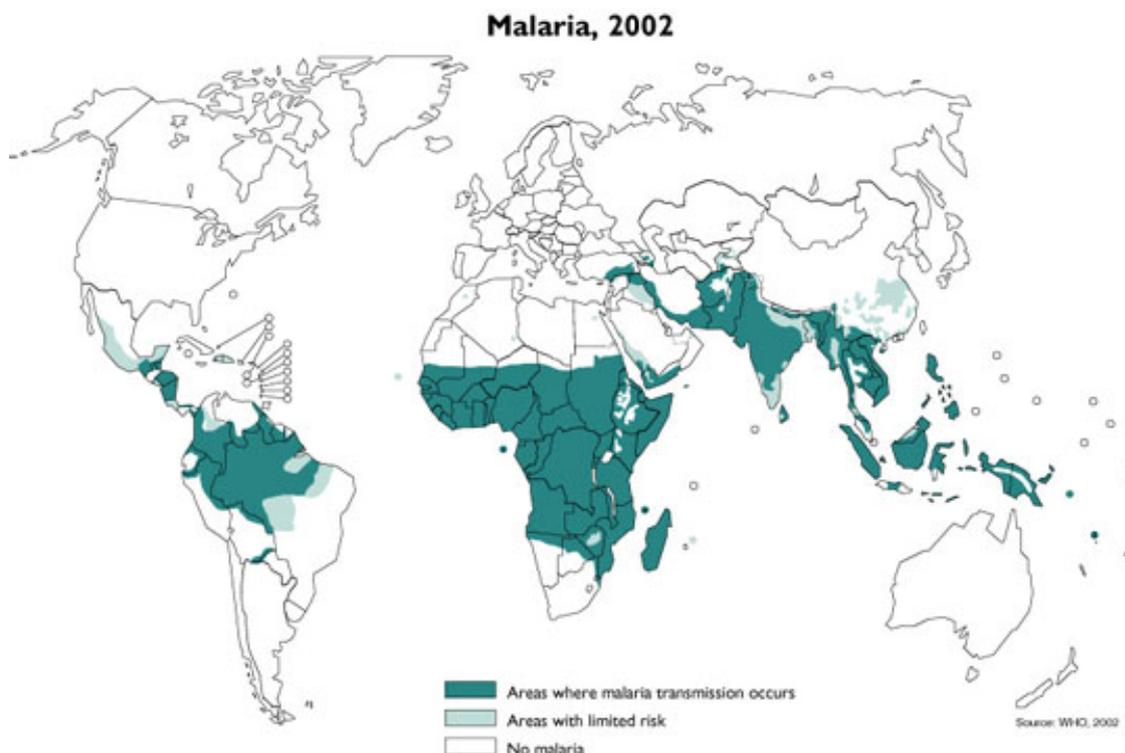


Abb. 2: Regionen mit Malariatransmission (Abb. aus WHO Malaria Report 2002)

In endemischen Ländern führt Malaria zu einer starken Belastung des Gesundheitssystems. 25-40% aller Konsultationen und zwischen 20% und 50% der Hospitalisierungen gehen auf Malaria zurück. Späte Vorstellung beim Arzt aufgrund unspezifischer fieberhafter Symptomatik, langer Anfahrtswege oder mangelnde finanzielle Möglichkeiten, inadäquates Management und fehlende oder unwirksame Medikamente sind Ursachen von hoher Letalität selbst in Krankenhäusern (112).

Die derzeitige Entwicklung der Malariamortalität ist bedenklich: während in Westafrika die Mortalität noch stabil geblieben ist, hat sie sich in Ost- und im südlichen Afrika in den letzten Jahren verdoppelt. Mögliche Erklärung hierfür liegen in der Ausbreitung von medikamentenresistenten Plasmodienarten (insbesondere gegen Chloroquin) und dem Fehlen von wirksamen und günstigen Therapiealternativen (112).

Malaria tritt außer in endemischen Ländern auch zunehmend in nicht-endemischen Ländern auf, größtenteils bei zurückkehrenden Touristen. In Europa werden zur Zeit durchschnittlich etwa 11.000 Malariaerkrankungen pro Jahr verzeichnet, davon etwa 8.000 *Plasmodium falciparum*-Malariafälle (54;55;60;65;85). Die Todesrate liegt dabei zwischen <0,5% und zwei Prozent (GB 1996 – 2500 Fälle mit elf Todesfällen; D 1996 – 1021 Fälle mit 19 Todesfällen) (3;9).

Patienten in westlichen, nicht-endemischen Ländern haben zwar uneingeschränkten Zugang zu diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen. Problematisch sind jedoch die mangelnde Kenntnis und Aufklärung des reisenden Patienten über tropische Erkrankungen. Im Krankenhaus wird trotz vorhandenen Symptomen von den behandelnden Ärzten die Möglichkeit einer Malaria übersehen (55). Oft besitzt das Laborpersonal nicht ausreichend Erfahrung und Kenntnis bei der Durchführung von Malariadiagnostik, was insgesamt zu einer Verzögerung der Diagnose und einer Verschlechterung der Prognose bis zum Tode führen kann (56).

1.1.5 Malaria – Klinik, Pathophysiologie und Immunologie

Plasmodium falciparum-Malaria ist mit Abstand die schwerste Malaria mit hoher Mortalität und Morbidität. Während die unkomplizierte Form der Infektion mit Fieberschüben, Schwäche, Kopfschmerzen, Schwindelanfällen und anderen unspezifischen Symptomen einhergeht und meist gutartig verläuft, stellt eine komplizierte Malariaerkrankung mit einer Vielzahl von Organkomplikationen vor allem für Kinder eine lebensbedrohliche Situation dar. Unspezifische Symptome

zu Beginn der Erkrankung sind der Grund für die Hinauszögerung einer frühzeitigen Diagnostik und schnellen, effektiven Behandlung.

Komplikationen sind insbesondere: Zerebrale Malaria, charakterisiert durch tiefes Koma, oft verbunden mit Konvulsionen. Allerdings kann vor allem bei Kindern schon eine geringe Einschränkung der Bewusstseins auf eine zerebrale Mitbeteiligung hinweisen; schwere normozytäre Anämie, bedingt durch Erythrozytenzerstörung und supprimierte Erythropoese; ARDS bzw. IRDS als Folge einer Flüssigkeitsretention. Nierenversagen, Hypoglykämie, Azidose, DIC, Thrombozytose und Schock sind weitere Manifestationen der schweren Malariainfektion durch *Plasmodium falciparum* (6).

Eine komplizierte Malaria entsteht nach intraerythrozytärer Proliferation, anschließender Zytoadhärenz der Parasiten an mikrovaskulärem Endothel (Sequestrierung) und Bindung der infizierten Erythrozyten an nicht infizierte (Rosettenbildung). Sequestrierung und Rosettenbildung scheinen sich dabei gegenseitig zu begünstigen. Folge dieser Vorgänge sind eine Akkumulation der infizierten Erythrozyten in der kapillaren Endstrombahn und eine mikrovaskuläre Obstruktion (insbesondere in Gehirn- und Plazentagewebe), was durch verringerte Sauerstoff- und Substratversorgung des Gewebes zu anaerober Glykolyse, Laktatazidose und Gewebsuntergang führt (13).

Diese pathophysiologischen Vorgänge werden sowohl durch Interaktion zwischen Oberflächenmolekülen von Parasit und Wirt als auch durch parasitäre Toxine und immunologische Reaktion des Menschen auf die Infektion bedingt und unterhalten.

Eine Vielzahl von Molekülen, die als Rezeptoren für Oberflächenmoleküle von infizierten Erythrozyten wirken, wurden beschrieben, wie zum Beispiel CD36, ICAM-1, E-Selektin, Chondroitinsulfat A (CSA) und Hyaluronsäure (HA). Als wichtigster mit den Rezeptoren interagierender Ligand wurde das hochvariable *Plasmodium falciparum* erythrozyte membrane protein 1 (PfEMP₁) identifiziert, welches von den var-Genen kodiert wird und an der Oberfläche von parasitenhaltigen Erythrozyten exprimiert wird. Diese Rezeptor-Liganden-Interaktionen sind verantwortlich für Sequestrierung und Zytoadhärenz (6;13).

Eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* führt zur massiven Ausschüttung von Zytokinen, getriggert durch vom Parasiten gebildete Toxine. Zu diesen gehört die Familie der Glycosylphosphatidylinositol(GPI)–Moleküle, ebenso wie Metabolite von *Plasmodium falciparum* wie das Malariapigment Hämozin. Der Wirtsmetabolismus reagiert auf diese Substanzen mit der Bildung von proinflammatorischen Stoffen wie TNF- α , IFN- γ und Interleukin IL-1. Dies führt zu Veränderung der endothelialen Rezeptordichte (z.B. CD36 und ICAM-1), Erhöhung der Körpertemperatur, Anregung der lokalen Stickoxidproduktion mit Gewebsschädigung, Suppression der Erythropoese im Knochenmark und somit zur Zustandsverschlechterung des Patienten (13).

Wiederholt exponierte Patienten in hochendemischen Gebieten zeigen eine sog. Semi-Immunität, die durch regelmäßige Neuinfektion unterhalten und mit der Bildung von spezifischen Antikörpern gegen PfEMP₁-Varianten erklärt wird. Semi-immune Patienten zeichnen sich durch vermehrt asymptomatische oder unkomplizierte Krankheitsverläufe aus. Parasitenvermehrung und die klinische Symptomatik sind weniger ausgeprägt als bei nichtimmunen Patienten. Es hat sich gezeigt, dass semi-immune Patienten ein reiches Repertoire an Antikörpern gegen verschiedene PfEMP₁-Varianten tragen, während Nichtimmune – vor allem Kleinkinder – gar keine oder nur wenige Antikörper bilden und somit einem größerem Risiko für eine komplizierte Malaria ausgesetzt sind (6).

1.1.6 Malaria bei Kindern und in der Schwangerschaft

Während in den ersten sechs Lebensmonaten ein Schutz durch mütterliche Antikörper besteht und deshalb die Infektionsrate in dieser Zeit sehr niedrig ist (58), sind ältere Säuglinge und Kleinkinder durch eine Malariainfektion besonders gefährdet. Bei einer akuten Infektion mit *Plasmodium falciparum* kann der Patient schnell schwere Organkomplikationen bis hin zur zerebralen Malaria mit Koma entwickeln und in kürzester Zeit daran versterben – es fehlt noch die charakteristische Semi-Immunität, die erst mit der Zeit erworben wird. Wiederholte Infektionen im Kindesalter führen dagegen zu schwerer

chronischer Anämie und dadurch sekundär zu höherer Mortalität. Kinder, deren Mütter in der Schwangerschaft eine Malariainfektion durchgemacht haben, zeigen ein verringertes Geburtsgewicht, was den größten Risikofaktor für den Tod des Kindes in den ersten Monaten darstellt (103). Schließlich besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko für Durchfallerkrankungen und respiratorische Infekte bei Kindern mit wiederholten Malariainfektionen, wodurch indirekt die Mortalität steigt (73).

Trotz erworbener Semi-Immunität haben schwangere Frauen – zumindest als Primagravida – ein erhöhtes Risiko, an Malaria zu erkranken. Ramharter et al. (2005) beobachteten ausserdem auch in den Monaten nach der Entbindung eine erhöhte Rate an Malariainfektionen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit nichtschwangeren Frauen (11 vs. 1 Infektion während der Schwangerschaft, 18 vs. 6 Infektionen in den ersten 10 Wochen nach Entbindung bei insgesamt 150 Frauen) (89). Die Schwangerschaft selbst hat eine immunsuppressive Wirkung auf den mütterlichen Organismus (19). Man beobachtet außerdem einen ausgeprägten Befall der Plazenta mit infizierten Erythrozyten, die in der Endstrombahn der Plazenta sequestrieren und dort von der Elimination geschützt sind (19). Folgen der Infektion sind Anämie der Mutter, intrauterine Wachstumsretardierung und ein erhöhtes Risiko für Frühgeburt und Abort (6;104).

Eine besondere Schwierigkeit stellt außerdem die Diagnose der Infektion bei Schwangeren dar. Da sich der Großteil der Erreger in den Kapillaren des Plazentagewebes aufhält, ist der Nachweis im peripheren Blut oft schwierig. Selbst bei ausgeprägten Symptomen kann so die Diagnostik falsch negativ ausfallen (69).

1.1.7 Malaria – Diagnostik

1.1.7.1 Blutausstriche

Standard der Malariadiagnostik ist die lichtmikroskopische Untersuchung von Patientenblut. Dies geschieht entweder in Form eines Dicken Tropfens oder eines Ausstriches. Ersterer hat den Vorteil, dass wegen seiner konzentrierten

Form mehr Parasiten dargestellt werden und die Sensitivität der Untersuchung steigt. Er wird deshalb zum Screening von malariaverdächtigen Patienten benutzt. Der Ausstrich wird zur Bestimmung der Spezies angewandt, da die Parasiten im Erythrozyten darstellbar sind und es zu weniger Artefakten kommt. Der mikroskopische Nachweis von Parasiten stellt eine vergleichsweise preiswerte und nach Einarbeitung einfach durchzuführende Methode dar. Sensitivität und Spezifität sind allerdings stark von der Erfahrung des Untersuchers und der Qualität der Untersuchung abhängig.

Die Anzahl der unter dem Mikroskop untersuchten Sichtfelder beeinflussen die Qualität der Diagnostik sehr stark. Standards für die klinische Praxis und Forschung variieren zwischen 30 und 500 Sichtfeldern (48). Selbst bei 200 und mehr untersuchten Sichtfeldern beträgt die Sensitivität des dicken Tropfens allerdings nur zwischen 80% und 90%. Ungenügend untersuchte Ausstriche bzw. Dicke Tropfen führen besonders bei nichtimmunen Patienten mit niedrigen Parasitämien häufig zu falsch negativen Ergebnissen.

Ein Problem stellt die Eigenschaft von *P. falciparum* zur Sequestrierung dar. Die tatsächliche Parasitenlast kann bis zu 100fach höher sein als im peripheren Blut nachweisbar (122). Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da eine Parasitämie >5% mit einer schlechteren Prognose einhergeht (123).

Während in holoendemischen Gebieten Probleme wie Materialmangel, ein hoher Durchsatz an Patientenproben und folglich wenig Zeit für die einzelne Untersuchung ursächlich sind für späte Diagnostik und Therapie der Malaria, sind in nichtendemischen Gebieten wie Europa fehlende Expertise, Mangel an ausgebildetem Personal und nicht zuletzt der nicht geäußerte Verdacht auf eine Malariainfektion hierfür verantwortlich.

Diese Mängel führten zu zahlreichen Versuchen, die Diagnostik der Malaria durch andere Methoden zu verbessern.

1.1.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Eine Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar. Da Malariaparasiten im Gegensatz zu Erythrozyten DNA und RNA

enthalten, können parasitenhaltige Erythrozyten mit geeigneten Fluoreszenzfärbungen (z.B. Acridinorange) sichtbar gemacht werden.

Diese Methode ist der lichtmikroskopischen Untersuchung in Sensitivität und Spezifität vergleichbar. Sie ist ebenfalls untersucherabhängig und in der Ausführung unkompliziert. Allerdings werden zusätzliche, spezielle Instrumente benötigt, so dass der Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur Lichtmikroskopie fraglich bleibt.

1.1.7.3 Fluoreszenzmikroskopie nach Zentrifugation – QBC®

Ähnlich der gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie wird bei der QBC® in eine Kapillare eingebrachtes Patientenblut mit Acridinorange gefärbt, dann zentrifugiert. Unter einem Fluoreszenzmikroskop kann mit ähnlich hoher Sensitivität wie bei der konventionellen Lichtmikroskopie ein Malaria-Nachweis erbracht werden (126).

Vorteile dieser Methode liegen in ihrer Geschwindigkeit und der Möglichkeit, weitere Informationen über die Patientenprobe zu ermitteln, wie z.B. Leukozytenzahlen und Hämoglobingehalt. Von Nachteil sind allerdings hohe Anforderungen an das Können des Untersuchers, hohe Materialkosten, Probleme bei der Identifikation und Quantifizierung der Spezies und schließlich auch das Unvermögen zur Archivierung der Proben.

1.1.7.4 Weitere mikroskopische Techniken

Malariapigment lässt sich unter einem Dunkelfeldmikroskop relativ sicher nachweisen, und Malariapigment in Leukozyten ist ein etablierter prognostischer Marker (72;101). Der Nachweis von Malariapigment ist sehr spezifisch für Plasmodien, allerdings kann nicht immer von einer akuten Infektion ausgegangen werden, da Pigment in Monozyten einige Wochen verbleiben kann (17). Auch ist die Sensitivität insbesondere bei Patienten außerhalb der Endemiegebiete niedrig.

1.1.7.5 Biochemische Methoden - Dipstick Tests

Der Nachweis von Antigenen (plasmodienspezifische Laktatdehydrogenase – pLDH) von bzw. Antikörpern (Histidine Rich Protein 2 – HRP-2) gegen *Plasmodium* spp. wird in zahlreichen sogenannten Dipstick Tests zur Malariadiagnostik benutzt. Patientenserum wird auf einen Teststreifen aufgebracht, der durch Anzeigen einer Test- bzw. Kontrollmarkierung ein positives oder negatives Ergebnis liefert. Nachweisbar sind so allerdings bisher nur *Plasmodium falciparum* mit ausreichender Sensitivität. Zwar existieren Dipstick Tests, welche auch *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* erfassen, allerdings sind deren Testergebnisse zur Zeit noch nicht genügend verlässlich (41).

Sensitivität und Spezifität differieren je nach Test, scheinen jedoch der Mikroskopie vergleichbar zu sein (37;74). Problematisch sind falsch negative Ergebnisse bei zu niedrigen (12) bzw. zu hohen Parasitämien (90), eine Kreuzreaktion mit Rheumafaktoren (38;42) und der Persistenz der positiven Reaktion nach Heilung (39). Dipstick Tests stellen allerdings wegen ihrer recht einfachen Handhabung und ihrer Anwendbarkeit in abgelegenen Gebieten ohne medizinischen Einrichtungen eine Alternative zur Mikroskopie bzw. zur unkontrollierten präventiven Chemotherapie dar.

1.1.7.6 Polymerase Chain Reaction – PCR

PCR wird vor allem in Labors zum Nachweis bzw. zur Sicherung von Malariainfektionen benutzt; PCR dient weiterhin zu Diversitätsbestimmungen, Quantifizierung von Parasitämien, Identifizierung von Mehrfachinfektionen und Untersuchung von Medikamentenresistenzen. Sehr hohe Sensitivitäten und Spezifitäten für alle vier Spezies machen die PCR zur zuverlässigsten Nachweismethode (M153). Von Nachteil sind allerdings hohe Kosten für Instrumente und Material, hoher Anspruch an Personal und lange Analysezeiten, was PCR zur Routinediagnostik ungeeignet macht.

1.1.7.7 Automatische Blutanalysegeräte – Durchflusszytometrie

Ein alle bisher besprochenen Tests betreffender Nachteil besteht darin, dass ein Verdacht vorliegen muss, bevor eine weitere Diagnostik eingeleitet werden kann. Automatische Blutanalysegeräte können als Screeningmethode eingesetzt werden, sofern eine malariaspezifische Veränderung nachgewiesen werden kann. Veränderung dieser Art sind z.B. der vermehrte Nachweis von großen, ungefärbten Zellen und Thrombozytopenien. Diese Veränderungen haben sich allerdings als nicht ausreichend sensitiv und spezifisch herausgestellt (11).

Andere, auf Laser-Durchflusszytometrie basierende Geräte wie das in dieser Studie benutzte Gerät Cell-Dyn 3000[®] scheinen malariapigmenthaltige Leukozyten als abnormale Zellpopulationen im Differentialblutbild nachweisen zu können (40). Ein mikroskopischer Nachweis ist allerdings zur Bestimmung von Parasitäme und Spezies weiterhin nötig. Ein neueres Gerät, das Cell-Dyn 4000[®], eignet sich auch zum Nachweis von intraerythrozytären Parasiten (119). Sensitivität und Spezifität dieser Methode ebenso wie der Nutzen von Pigmentnachweis als prognostische Marker ist immer noch Gegenstand weiterer Studien. Von Nachteil sind sicherlich die hohen Kosten für Anschaffung und Unterhalt der Geräte, was den Einsatz in ländlichen Gebieten schwierig macht.

Der Stand der Forschung auf dem Gebiet der Diagnostik mit Hilfe von Durchflusszytometern wird in den folgenden Kapiteln eingehend besprochen.

1.1.8 Behandlung und Prävention

Zur Behandlung der Malaria in endemischen Gebieten stehen neben Chinin bei kompliziertem Verkauf insbesondere Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin (SP) zur Verfügung. Ein großes Problem ist die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber den heute angewandten Medikamenten, speziell in Asien und Afrika. Teurere, noch wirksame Medikamente wie Mefloquin und die neuen Arthesimin-Verbindungen stehen in endemischen

Ländern oft nicht zur Verfügung. An neuen Medikamenten und Kombinationsbehandlungen wird zur Zeit wieder intensiver geforscht als in den vergangenen Jahrzehnten (61).

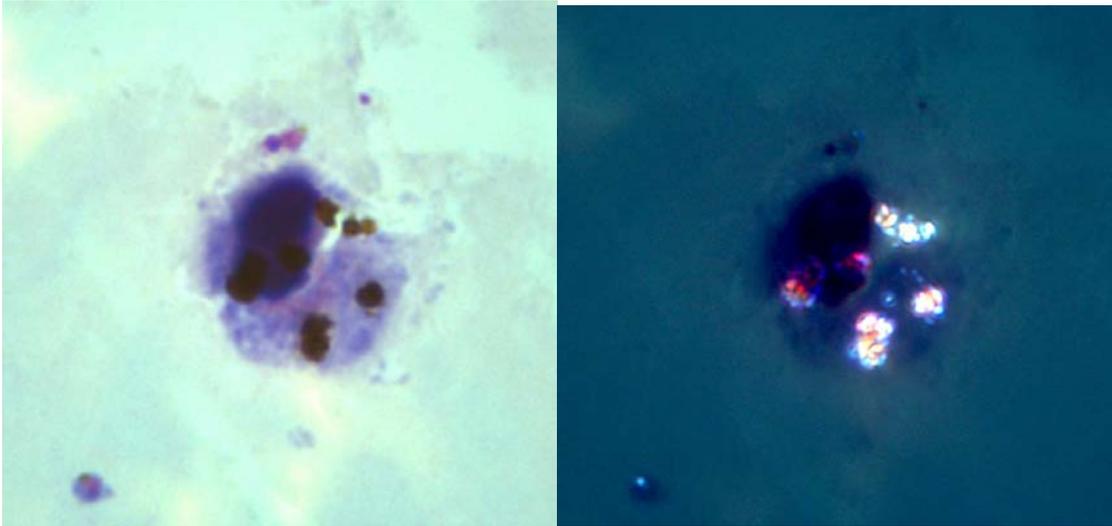
Neben der Chemotherapie steht vor allem die Prävention im Vordergrund der Bemühungen zur Bekämpfung der Malaria. Bettnetze und Repellentien vermindern effektiv die Inzidenz der Erkrankung, stehen aber aus finanziellen Gründen gerade in ländlichen Gegenden oft nicht ausreichend zur Verfügung. Durch Insektizide (z.B. DDT) wurde schon Mitte vergangenen Jahrhunderts eine Eradikation des Vektors versucht, aus gesundheitspolitischen Gründen wurde dieses Unternehmen jedoch weitgehend gestoppt. An möglichen Impfstoffen gegen *Plasmodium falciparum* wird intensiv geforscht, erstmals erscheint die Marktzulassung eines ersten Präparates in greifbare Nähe zu rücken.

1.2 Malariapigment

1.2.1 Geschichte des Malariapigments

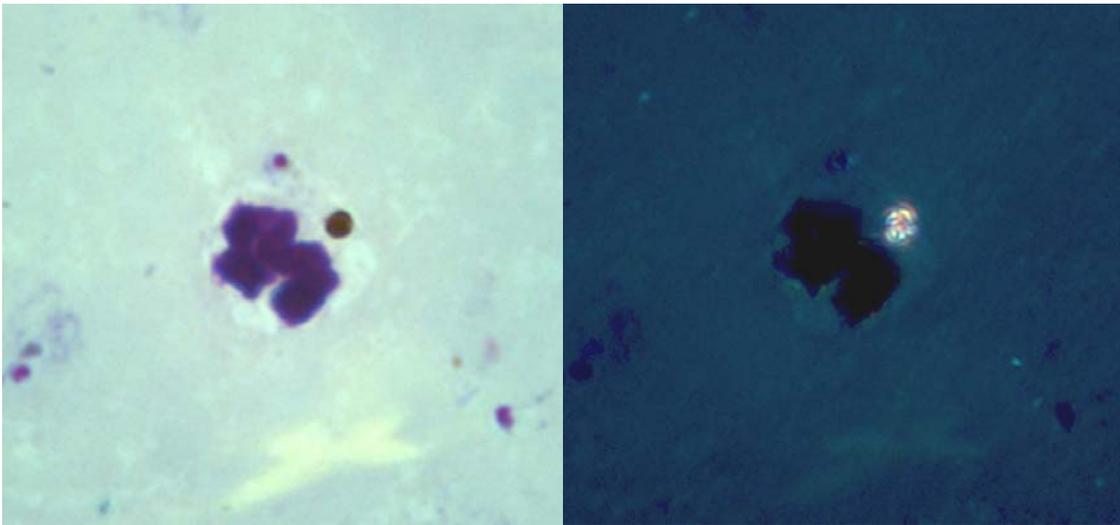
Malariapigment oder Hämozoin war schon vor der Entdeckung des Malariaerregers *Plasmodium* spp. bekannt. Meckel stieß 1847 auf Konglomerate von braun-schwarzem Pigment im Blut einer „Verrückten“ mit vergrößerter Milz (70). 1849 beobachtete Virchow dasselbe Pigment im peripheren Blutleukozyten bei einem Patienten mit periodischem Fieber. Er nannte diesen Zustand „Melanämia“ in der fälschlichen Annahme, das entdeckte Pigment sei Melanin (115). Frerichs stellte 1858 die These auf, dass Pigment auf die erhöhte Zerstörung von roten Blutkörperchen bei Malaria zurückzuführen sei (30). So war eine mikroskopische Diagnose von Malaria schon 20 Jahre vor der Entdeckung des Erregers möglich.

Laveran merkte in seinen Schriften an, dass Pigmentgranula frei im Blut schwimmend und innerhalb von Leukozyten auf ungefärbten Blutaussstrichen sichtbar waren. Ross beschrieb den kompletten Lebenszyklus von Malaria anhand pigmenthaltiger Körper, die er im Darm von blutsaugenden Moskitos entdeckt hatte.



A

B



C

D

Abb. 3: Dicker Tropfen von Proband CD-0390 mit Malariainfektion (vereinzelt Trophozoiten sichtbar). Oben Monozyt, unten neutrophiler Granulozyt mit Hämozoineinschlüssen. Unter dem Lichtmikroskop (A und C) erscheinen die Pigmentkristalle gelblich-braun, im Polarisationsmikroskop (B und D) leuchten sie wegen ihrer doppelbrechenden Eigenschaften hell auf (Dicker Tropfen, Vergrößerung 1600fach).

1.2.2 Entstehung des Malariapigments

1.2.2.1 Hämoglobinabbau

Der Anteil des Hämoglobins am zytosolischen Protein im Erythrozyten beträgt etwa 95%. Während des intraerythrozytären Zyklus ernährt sich der Parasit vom Zytoplasma, etwa 60 – 80 % des Hämoglobins werden abgebaut (79). Bei der Hämoglobinproteolyse entstehen Aminosäuren, die vom Parasiten zur Proteinsynthese genutzt werden, und freies Häm. Letzteres kann nicht weiter metabolisiert werden (20), sondern wird in Form eines inerten kristallförmigen Polymers gespeichert: dem Malariapigment oder Hämozoïn (99).

Ort des Hämoglobinabbaus und Hämozoïnbildung im Parasiten ist die Nahrungsvakuole (78), eine saure Organelle mit pH-Werten zwischen 5,0 und 5,4 (62). Mittels Vesikeln wird Hämoglobin vom Zytostoma zur Nahrungsvakuole transportiert, wo es hydrolysiert wird.

Der Hämoglobinabbau beginnt bereits in den frühen Ringstadien und setzt sich fort bis zum Schizontenstadium. Die größte Aktivität zeigt sich jedoch im Trophozoitenstadium (6-12h) (128). Als Hämoglobinasen wurden saure Proteasen vorgeschlagen. Nähere Untersuchungen ergaben den Nachweis von zwei Cystein-Proteasen (Plasmapepsin I und II) und einer Aspartat-Protease (Falcipain) in der Nahrungsvakuole von *Plasmodium falciparum*, die an der Aufspaltung von Hämoglobin in Peptide und Aminosäuren beteiligt sind (27;34). Im Erythrozyten liegt Häm fast ausschließlich im Eisen(II)-Zustand vor. Bei Abbau im Parasiten wird es zu Eisen(III) oxidiert. Bei diesem Oxidationsvorgang frei werdende Elektronen produzieren reaktive Sauerstoffgruppen: Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (4). Diese reaktiven Moleküle scheinen die Hauptursache für oxidativen Stress in Parasiten zu sein. Schäden an der Vakuolenmembran werden durch Superoxiddismutase und Katalase abgewendet, die in der Nahrungsvakuole gefunden wurden und wahrscheinlich vom Erythrozyten stammen (23;27). Auch reduziertes Glutathion scheint eine protektive Wirkung zu haben (125). Ginsburg et al. (1998) stellten die Hypothese auf, dass ein Teil des nicht

polymerisierten Häms die Nahrungsvakuole verlässt und von Glutathion abgebaut wird (32).

1.2.2.2 Häm-Polymerisation

Bei der Hämproteolyse anfallendes toxisches Häm wird durch Polymerisation zu einem inerten, kristallinen, schwarz-braunen Pigment, dem Hämozoin, entgiftet. Dadurch wird die Ansammlung von Häm verhindert (79). Gebildetes Hämozoin ist mikroskopisch sichtbar in Trophozoiten, Schizonten und Gametozyten. Beim Menschen wird Hämozoin aus lysierten Schizonten im retikulo-endothelialen System angereichert, was zur Schwarzfärbung von Leber und Milz bei chronischen oder wiederholten Infektionen führt (21).

Der Entgiftungsprozess des sich in der Nahrungsvakuole anreichernden Häms ist substantiell für den Parasiten. Freies Häm stört den zellulären Metabolismus durch Hemmung von Enzymen (34), Peroxidation von Membranen (108) und Produktion von freien Radikalen in der sauren Umgebung der Nahrungsvakuole (4). Da *Plasmodium* spp. über keine Hämoxygenase verfügen, wird die giftige Substanz Häm in ein chemisch inertes Kristall überführt.

1.2.2.3 Aufbau von Hämozoin

Hämozoin ist eine unlösliche, inerte, kristalline Substanz, zusammengesetzt aus Häm-Molekülen des vom Parasiten verstoffwechselten Hämoglobin. Es ist zusammengesetzt aus Ferriprotoporporhin-IX-Molekülen. Hämozoin ist chemisch, spektroskopisch und kristallographisch identisch mit β -Hämatin (8). Pagola et al. (2000) beschrieben β -Hämatin als Hämdimer mit koordinierten Verbindungen vom zentralen Eisenatom eines Ferriprotoporporhin IX-Moleküls zur Propionat-Carboxylat-Gruppe des nächsten, wobei die Dimere untereinander durch Wasserstoffbrückenbindungen im Kristall verbunden sind (81).

1.2.2.3 Polymerisation

Hämpolymere bilden sich nicht spontan aus freiem Häm oder Hämoglobin unter physiologischen Bedingungen. Es wurde festgestellt, dass Trophozoitenlysate von *Plasmodium falciparum* monomerisches Häm zeit- und pH-abhängig polymerisieren kann, was auf die Anwesenheit einer Enzymaktivität hinweist, die von Slater et al. (1992) hypothetisch „Hämpolymerase“ genannt wurde (102). Auch scheinen gereinigte Hämozoinkristalle oder synthetisch hergestelltes β -Hämatin eine weitere Polymerisation auslösen zu können (18). Lipide können die Polymerisation ebenfalls einleiten (26). Weitere Untersuchungen ergaben, dass Hämpolymerisation unter physiologischen Bedingung in Abwesenheit eines vom Parasiten gebildeten Stoffes chemisch unwahrscheinlich ist oder zumindest extrem langsam abläuft, nicht vereinbar mit der kurzen Entwicklungszeit des Parasiten im Erythrozyten (22).

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass Pfhrp-2 bzw. Pfhrp-3-Proteine, die der Parasit in großen Mengen produziert – fähig sind, an Häm zu binden und eine Polymerisation zu starten (83). Einmal begonnen, ist für die Erweiterung der Hämozoinketten kein Protein mehr nötig. Ob und inwieweit dieses Protein allein für die Polymerisation verantwortlich ist, ist unklar. Es wurde auch von *P. falciparum*-Stämmen berichtet, die keine der beiden Proteine besitzen und dennoch in der Lage sind Häm zu polymerisieren (106).

Eine neuere Studie schlägt vor, dass die Hämozoinformation sowohl von Lipiden als auch von Pfhrp-2 abhängig ist. *In vitro*-Studien zeigten einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen, d.h. eine schneller ablaufende Polymerisation (82).

In diesem Zusammenhang weisen Grobusch und Kremsner (2005) auf den bei Malariapatienten oft gestörten Lipidstoffwechsel hin: charakteristisch sind niedriges Gesamtcholesterin, sehr niedriges HDL, Apolipoprotein A1 unter der Nachweisgrenze und erhöhte Triglyzeridwerte. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass mit dem Hämozoin große Mengen von für die Hämpolymerisation nötigen Lipidderivaten von den Makrophagen phagozytiert und damit dem Metabolismus entzogen werden (43).

1.2.3 Hämozoin und Immunantwort

Hämozoin schädigt die Funktion von Leukozyten und ist toxisch für Phagozyten, die Hämozoin nach dem Platzen von parasitierten Erythrozyten phagozytiert haben. Experimente an hämozoinhaltigen Monozyten zeigten eine Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeiten (96), der Fähigkeit, einen „Oxidativen Burst“ zu generieren (93) und der Vernichtung von phagozytierten Bakterien, Pilzen oder Tumorzellen (25). Die Aktivität von Proteinkinase C wird schwer beeinträchtigt (95).

Hämozoin beeinflusst die Regulierung von Zytokinen. Menschliche und murine Monozyten, die Hämozoin phagozytiert hatten, zeigten eine erhöhte Ausschüttung von TNF- α (88), NO (57), IL-1 β (86) und macrophage-inhibitory protein 1 α und 1 β (100). Die Produktion von IL-6 war in dieser Versuchsanordnung vermindert (88). Im Gegensatz dazu wurde bei lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen die Produktion von NO und TNF- α durch die Anwesenheit von β -Hämatin oder monomerischem Häm gehemmt (109). Biswas et al. (2001) beschrieben eine erhöhte Synthese von TNF- α und IL-1 β bei Monozyten von gesunden Patienten unter Einfluss von Hämozoin. Allerdings war bei Anwesenheit von IgM-Antikörpern gegen *P. falciparum* die Produktion dieser Zytokine gehemmt (7). Versuche mit kultivierten intervillösen mononukleären Zellen zeigten erniedrigte TNF- α und IL-10 Ausschüttung bei erhöhtem Hämozingehalt. Auch eine Suppression von Prostaglandin-E2 wurde beobachtet (84). Keller et al. (2004) fanden eine Assoziation zwischen erhöhten Werten von NO (durch Induktion von NO-Synthase 2) und erniedrigten Hämoglobinwerten (57).

Verschiedene Studien beschrieben eine verminderte Immunantwort bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum* (111;117). Bei akuter Malaria wurden veränderte zelluläre Antworten auf *Plasmodium*-Antigene, verminderte T-Zellproliferation und Veränderungen von Lymphozytenfunktionen beobachtet (35;36). Blockierung der Expression von den für die Antigenpräsentation und T-Zellantwort essentiellen Molekülen MHC II, CD54 und CD11c nach IFN- γ -Stimulation wurden beschrieben (92). Exposition mit Malariapigment in vitro

fürte bei Monozyten und Neutrophilen zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie CD11b und CD18 (87). Andere Studien zeigten eine Unterdrückung der Makrophagenfunktion (51;53) und Defekte in der Antigenpräsentation durch Hämозoin (116;117).

Schwarzer et al. (1992) beschrieben, dass Hämозoin phagozytierende Monozyten erheblich in ihren Funktionen beeinträchtigt sind: intrazelluläres Hämозoin kann nicht abgebaut werden, der Monozyt kann keine weitere Phagozytose betreiben, der "Oxidative Burst" wird supprimiert. Die Beeinträchtigung der phagozytierenden Leukozyten ist mitverantwortlich für die mangelhafte und langsame Clearance der Parasiten im Blut (96).

Schwarzer et al. (2003) berichteten weiter über nichtenzymatische Bildung von Hydroxyfettsäuren durch hämkatalysierte Peroxidation, was zur Inhibition von Monozyten und der Pathogenese von Malaria beizutragen scheint (94). Derivate von hämozoininduzierter Lipidoxidation, insbesondere 4-Hydroxynonenal, ebenso wie der inhibitorische Einfluss von Zytokinen wurden ebenso mitverantwortlich für die Dyserythropoese bei Malaria gemacht (33).

1.2.4 Pigment und Diagnostik

Im Stadium der Schizogonie platzt der infizierte Erythrozyt auf und gibt Merozoiten frei. Dabei übrigbleibende Zelltrümmer werden von neutrophilen Granulozyten und Monozyten phagozytiert. Das phagozytierte Hämозoin kann nicht weiter abgebaut werden und persistiert lichtmikroskopisch deutlich sichtbar als schwarzbraunes Pigment bzw. doppelbrechender Kristall in den Leukozyten (76). Day et al. (1996) bestimmten die Clearancekinetik von pigmenthaltigen Leukozyten in schwerer Malaria (PCM: 216h, PCN: 72h, parasitierte Erythrozyten: 96h) (17). Wegen ihrer kurzen Clearance benutzten sie pigmenthaltige Neutrophile als Marker für eine akute Malaria. Pigmenthaltige Monozyten dagegen verbleiben auf Grund ihrer langen Halbwertszeit zu lange im peripheren Blut bzw. im Gewebe und ließen so nur eine Aussage über chronische oder rezidivierende Infektionen zu (17;76). Von besonderem Interesse scheint die Hämозoinbestimmung bei Patienten ohne

bemerkenswerte Parasitämie wie z.B. nach inadäquater Therapie zu sein, bei denen so die Diagnose Malaria gestellt werden kann (17;63;64).

1.2.5 Pigment und Prognose/Schwere der Erkrankung

Malariapigment wurde mit der Schwere der Malaria korreliert. In einem hypoendemischen Gebiet in Vietnam wurde beobachtet, dass pigmenthaltige Leukozyten sehr viel bessere prognostische Marker für das outcome einer Malaria darstellten als die Höhe der Parasitämie (73% Sensitivität, 77% Spezifität vs. 60% Sensitivität, 57% Spezifität im Vergleich von pigmenthaltigen Neutrophilen $\geq 5\%$ und Parasitämie $>100.000/\mu\text{l}$) (76). In der selben Studie wurde festgestellt, dass der Pigmentgehalt von Leukozyten bei verstorbenen Patienten signifikant höher war als bei überlebenden Patienten mit schwerer Malaria (7,7% vs. 3,2% pigmenthaltige Neutrophile; 8,6% vs. 4,8% pigmenthaltige Monozyten).

Amodu et al. (1998) verglichen die prozentualen Anteile an pigmenthaltigen Leukozyten in Gruppen mit zerebraler, unkomplizierter, asymptomatischer Malaria und gesunden Probanden. Pigmenthaltige Neutrophile waren mit absteigender Konzentration in den vier Gruppen nachweisbar (27,0%, 9,0%, 6,5%, 2,0% respektive) (2). Metzger et al. (1995) fanden in einer Studie mit 42 Kindern mit schwerer Malaria und 31 mit leichter Malaria in Gabun einen deutlichen Unterschied bezüglich der pigmentierten Monozyten (24% vs. 7%) und Neutrophilen (2% vs. 0%) (72).

In einer weiteren Studie an 516 Kindern in Mali konnten Lyke et al. (2003) ebenfalls darstellen, dass mehr pigmenthaltige Monozyten bzw. neutrophile Granulozyten bei schwerer Erkrankung als bei leichter nachzuweisen sind (PCMs = $219/\text{mm}^3$ vs. $94/\text{mm}^3$, $P=0,003$; PCNs = $349/\text{mm}^3$ vs. $64/\text{mm}^3$, $p<0,0001$). Innerhalb der Gruppe der komplizierten Malariafälle zeigten Patienten, die später verstarben, bei Aufnahme weitaus höhere Mengen an pigmenthaltigen Neutrophilen als überlebende Patienten ($635/\text{mm}^3$ vs. $320/\text{mm}^3$, $p=0,02$) (66).

Der Grund für die höhere Sensitivität und Spezifität liegt wahrscheinlich in der besseren Erfassung der tatsächlichen Parasitenlast. Die Pathologie von *Plasmodium falciparum* ist mit der Sequestrierung von parasitierten Erythrozyten in der Endstrombahn von vitalen Organen verknüpft (67). Das Verhältnis zwischen zirkulierenden und sequestrierten Parasiten und damit die wahre Parasitenlast im Blutkreislauf ist wegen der Abhängigkeit von Stadium und Synchronisation der Infektion sehr unterschiedlich (121). Da phagozytierende Leukozyten im Blut zirkulieren und im Gegensatz zu den sequestrierten parasitenhaltigen Erythrozyten auch die kapillare Endstrombahn der Extremitäten erreichen – wo normalerweise Blut für die Malariadiagnostik gewonnen wird – , könnten sie die wahre Parasitenlast weitaus besser reflektieren als die Höhe der Parasitämie; insbesondere neutrophile Granulozyten, da sie wegen ihrer höheren Clearance eine akute Entwicklung widerspiegeln (2). Silamut und White schlugen 1993 eine Klassifizierung der Malaria nach Entwicklungsstadien der Parasiten vor und kamen zum Ergebnis, dass ältere Trophozoiten und Schizonten im peripheren Blut Indikatoren für eine schlechte Prognose sind (101).

1.2.6 Pigment und Medikamente

Diverse Malariamedikamente wirken durch Interaktion mit Hämentgiftungsprozessen. Quinolone wie Chloroquin, Quinin und Mefloquin inhibieren die Hämolymerisation durch Bildung eines Häm-Quinolonkomplexes und führen so zur Anreicherung von toxischem Häm. Artemisinininderivate binden an Häm und Hämozoin, eine Bildung von freien Radikalen aus Artemisinin wird katalysiert, wodurch es zu Membranschäden und Proteinalkylierung und schließlich der Zerstörung des Parasiten kommt (28). Die Störung des Hämoglobinabbaus stellt somit eine interessante Möglichkeit zur Therapie der Malaria dar.

1.3 Cell-Dyn 3000[®] und Durchflusszytometrie

1.3.1 Geschichte und Methoden der automatischen Blutbildbestimmung

Blutbildbestimmung mit Leukozytenzählung und Differentialblutbestimmung sind fundamentaler Bestandteil der medizinischen Diagnostik und aus dem heutigen Labor- und Klinikalltag nicht mehr wegzudenken. Früher noch von Hand unter dem Mikroskop ausgezählt, wird das Differentialblutbild heutzutage vollautomatisiert von Blutbildanalysegeräten bestimmt. Die Technik dieser Apparate basiert prinzipiell auf zwei Methoden bzw. deren Kombination, die kurz erläutert werden sollen.

1.3.1.1 Elektrische Impedanz-Methode

Im letzten Jahrhundert wurden erstmals Systeme zur automatischen Zählung von Leukozyten vorgestellt. Coulter beschrieb 1956 die „bulk flow direct current aperture impedance“ Methode (14), die weltweit immer noch in weiterentwickelter Form zur Anwendung kommt. Vor der Untersuchung der Probe werden die Erythrozyten durch Lysierung zerstört, um die Messung der weißen Blutzellen nicht zu beeinflussen. Die verbleibenden Leukozyten werden in Elektrolytlösung durch eine schmale Öffnung zwischen zwei Elektroden geleitet. Dabei kommt es zu direktem Stromfluss zwischen den beiden Elektroden und einer kurzfristigen Spannungsänderung, die registriert wird. Die Anzahl der registrierten Impulse ist proportional zur Menge der Leukozyten, die Höhe der Spannungsänderung ist proportional zum Volumen des Leukozyten. Variationen in der Art der Erythrozytenlysisierung, durch die auch die Oberfläche von Leukozyten und damit die Spannungsänderung bei der Impedanzmessung verändert wird, führten zur Entwicklung von „bimodalen“ (Unterscheidung zwischen Lymphozyten und myeloiden Zellen) und später „trimodalen“ (zusätzlich „mittelgroße Zellen“: Monozyten, Eosinophile, Basophile, Blasten und andere Vorstufen von weißen Blutzellen) Modellen.

1.3.1.2 Optische Methode

Die Ausnutzung der Lichtbrechung in der medizinischen Diagnostik war in Form der Dunkelfeldmikroskopie schon länger bekannt (z.B. beim mikroskopischen Nachweis von Spirochäten und Trypanosomen) (50). Bei dieser Technik gelangt nur Licht, welches vom Objekt gebrochen wird, zum Objektiv. Direkt einstrahlendes Licht wird durch einen Filter blockiert. Fluoreszenzmikroskopie benutzt ein ähnliches Prinzip: Mittels optischer Filter wird das Licht einer Quecksilberlampe auf die nicht sichtbaren kurzen Wellenlängen begrenzt, die zur Anregung des Farbstoffes nötig sind. Nur vom fluoreszierendem Farbstoff abstrahlendes langwelliges Licht erreicht das Objektiv.

Viele Versuche, diese beiden Techniken zur automatischen Zellzählung auszunutzen, scheiterten am Unvermögen, Zellen für die Analyse einzeln hintereinander durch eine Kapillare zu schleusen. War die Kapillare zu klein, kam es zum Verklumpen der Zellen, war sie zu groß, flossen mehrere Zellen gleichzeitig hindurch und wurden falsch interpretiert.

Crossland-Taylor löste dieses Problem 1953, indem er die hydrodynamische Fokussierung entwickelte (16). Dabei wird eine Zellsuspension langsam in einen Strom schnell fließender Flüssigkeit injiziert. Der laminare Fluss der Hüllflüssigkeit verhindert eine Vermischung. Durch Verengung der umgebenden Kapillare werden Suspension und Hüllflüssigkeit beschleunigt und fokussiert, bis schließlich die Zellen hintereinander in einer Reihe fließen und so einzeln gemessen werden können.

Beleuchtet man den Zellstrom seitlich mit einer Lichtquelle, so streut jede Zelle abhängig von bestimmten Charakteristika Licht in verschiedenen Winkeln. Mullancy et al. zeigten 1969, dass vorwärts gestreutes Licht zur Berechnung der Zellgröße benutzt werden kann (75). Salzman et al. (1975) kombinierten vorwärts und rechtwinklig gestreutes Licht, um Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zu differenzieren (91). Terstappen et al. (1988) schließlich benutzten depolarisiertes, rechtwinklig gestreutes Licht, um Granulozyten in Neutrophile und Eosinophile aufzuteilen (110). Schon zuvor hatte van Dilla (1969) Fluoreszenzmessung mit fokussierter Zellflussmessung

kombiniert und damit zelluläre DNA quantitativ in malignen Leukozytenpopulationen nachgewiesen. Van Dilla benutzte auch erstmals einen Laser als Lichtquelle (113).

Das gestreute Licht wird von Photodetektoren/Photoamplifikatoren in verschiedenen Winkeln aufgefangen, digitalisiert und dient zur Berechnung von Punktdiagrammen, aus denen durch geeignete Software die verschiedenen Leukozytenpopulationen errechnet werden.

Durch Vergleich der einzelnen Populationen untereinander und mit gespeicherten Normalwerten können automatisch Warnungen (sog. „flagging“) gegeben werden, die auf pathologische Veränderungen im Blut hinweisen. Der Kliniker hat so die Möglichkeit, im Verdachtsfall weitere diagnostische Maßnahmen einzuleiten.

1.3.2 Durchflusszytometrie und Malaria – Vorarbeiten

Ein Vorteil der automatischen Blutbildanalyse besteht darin, dass große Mengen von Patientenproben in kurzer Zeit standardisiert analysiert werden können. Durch Warnmeldung des Gerätes auf mögliche pathologische Veränderungen können asymptomatische Patienten erkannt werden und weitere Diagnostik eingeleitet werden.

Die mikroskopische Malariadiagnose verlangt immer noch ein hohes Maß an Zeitaufwand und – besonders in nichtendemischen Gebieten – den Verdacht des behandelnden Arztes, damit die Diagnostik überhaupt angefragt wird. Außerdem ist ihre Sensitivität abhängig vom Untersucher. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass früh nach Methoden gesucht wurde, um mittels charakteristischer Veränderungen des Blutbildes und den Möglichkeiten einer automatischen Blutanalyse die Diagnose der Malaria zu vereinfachen.

Verschiedene Autoren beschrieben die direkte Identifikation von Parasiten durch Fluoreszenzmarkierung der Parasiten-DNA und Durchflusszytometrie und betonten den Nutzen dieser Methode zur quantitativen Bestimmung von intraerythrozythären Parasiten (10;29;68;120).

Bunyaratvej et al. versuchten 1992 einen hämatologischen Parameter bei der durchflusszytometrischen automatischen Differentialblutbestimmung zur Detektion von Malaria zu finden. Sie beobachteten erhöhte Anteile an jungen, großen Lymphozyten („large unstained lymphocytes (LUC)“); ein LUC-Anteil über 3% sprach dabei für eine Malariainfektion (11).

Bereits ein Jahr zuvor wurde jedoch darauf hingewiesen, dass man sich nicht ausschließlich auf automatisierte Zählungen verlassen dürfe, und das Risiko groß sei, bei Verzicht auf konventionelle dicke Tropfen Malariapatienten zu übersehen. In einer Studie, die typische hämatologische Anomalien bei Malaria wie LUCs und Thrombozytopenie mit einem automatischen Zellzähler analysierte, wurde fast ein Drittel der Malariapatienten nicht erkannt (31).

Fialon et al. (1991) betonten allerdings in einer Arbeit, dass in Fällen von importierter Malaria ein von den Automaten gegebener Alarm („flagging“) bei malariatypischen hämatologischen Veränderungen (Anämie, Thrombozytopenie und Lymphopenie) zumindest eine Anfertigung eines dicken Tropfens auslösen und so zur richtigen Diagnose führen kann. So konnten je nach Maschine zwischen 70% und 75% der Patienten diagnostiziert werden (24).

Da die hämatologischen Veränderungen bei einer Malariainfektion nicht spezifisch und verlässlich genug scheinen, sind die beschriebenen Verfahren allerdings nur von geringer Bedeutung hinsichtlich eines alternativen Verfahrens zur mikroskopischen Diagnose.

Van Vianen et al. (1993) beschrieben eine Nachweismethode für Malariaparasiten durch durchflusszytometrische Verfahren. Sie benutzten DNA-spezifische Fluoreszenzlösung zur Anfärbung der Parasiten-DNA und analysierten die Proben mit einem FACStar[®] Durchflusszytometer. Mikroskopische Parasitenzählung und Ergebnisse des Durchflusszytometers korrelierten mit $r > 0,94$; Parasitämien bis zu 0,005% wurden detektiert (114). Fluoreszenzfärbung ist allerdings kein Routinetest und bietet sich somit nicht als Screeningverfahren an.

1.3.3 Cell-Dyn® und Malaria – Vorarbeiten

Anwendungen von Instrumenten, die mit der sog. M.A.P.S.S.TM-Technologie („multi-angle polarized scatter separation“) arbeiten, zeigten ein charakteristisches, sogenanntes Granularitäts/Lobularitäts-Scattergramm bei Proben von Malariapatienten, unabhängig von der *Plasmodium*-Spezies, mit der sie infiziert waren. Die Cell-Dyn 3000[®]-Instrumentenserie von Abbott Diagnostics benutzt einen Helium-Neon Laser zur Detektion von Lichtablenkung von vier verschiedenen Winkeln in einem fokussierten Fluss von Leukozyten zur Berechnung eines Differentialblutbildes. Bis zu 10.000 Zellen werden bezüglich ihrer Größe (0°), dem Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma (10°), der Lobularität (90°) und der Anwesenheit von depolarisierenden zytoplasmatischen Granula (90° depolarisiert) ausgewertet. Dies führt zur Darstellung von eosinophilen Granulozyten in einem Granularitäts/Lobularitäts-Diagramm, repräsentiert durch grüne Punkte über einer Grenzlinie, unter der sich Monozyten (violette Punkte), Lymphozyten (blaue Punkte) und neutrophile Granulozyten (gelbe Punkte) darstellen. Bei Analyse von Malariaproben wurden abnormale Granularitäts/Lobularitäts-Diagramme bemerkt: violette Punkte (stellvertretend für Monozyten) traten im Eosinophilenbereich auf, weiterhin wurde eine abnormal verteilte und weit gestreute Eosinophilenpopulation beobachtet (49). Krämer et al. sortierten 2001 mittels eines experimentellen Zellsorters diejenigen Zellen aus, die für die atypischen Punktwolken verantwortlich waren. Sie konnten nachweisen, dass tatsächlich hämozoinhaltige Leukozyten diese Signale auslösen (59).

Das Instrument klassifiziert also hämozoinhaltige Monozyten richtig als Monozyten, aber auf Grund der optischen Charakteristika von Hämozoin werden sie in den Eosinophilenbereich eingeschlossen. Da malariapigmenthaltige Neutrophile viele ihrer charakteristischen Eigenschaften (Größe, Kern/Zytoplasma-Verhältnis, Lobularität) mit den Eosinophilen teilen, werden sie vom Instrument fälschlicherweise als Eosinophile klassifiziert. Kleinere Unterschiede ihrer Morphologie sind wahrscheinlich für die im

Vergleich zur normalen Eosinophilenpopulation abnormalen Verteilungen verantwortlich.

Eine erste Studie zu diesem Thema wurde in Südafrika durchgeführt (71). Dort wurden 224 Proben von Patienten mit Verdacht auf Malaria mit einem Cell-Dyn 3500[®] analysiert. Die endgültige Malariadiagnose wurde mikroskopisch oder immunologisch gestellt. Von 224 Patienten waren 95 an Malaria erkrankt, 129 waren negativ. Die Sensitivität und Spezifität des Cell-Dyn[®]-Gerätes betrug 72% bzw. 96%. Bemerkenswerterweise war die Sensitivität bei der schwarzen Bevölkerung mit 90% höher als bei der weißen. Mendelow et al. erwogen als mögliche Erklärungen für diese Beobachtung Polymorphismen der Erythrozytenantigene, MHC-Determinanten oder TNF-Sequenzen.

In einer weiteren Studie in Portugal wurden 148 Patientenproben mit einem Cell-Dyn 3500[®] Durchflusszytometer untersucht (46). Die Sensitivität betrug 95%, die Spezifität 88%. Bei sieben von 12 falsch positiven Fällen konnte eine vorangegangene Malaria nachgewiesen werden. Während der Studienzeit konnten sechs Patienten auf Grund der Analyse rechtzeitig diagnostiziert werden, bei denen kein Malariaverdacht geäußert worden war. Der größte Teil der Patienten waren Immigranten aus malariaendemischen Gebieten.

Hänscheid et al. (2000) besprachen Vor- und Nachteile dieser neuen Methodik für die Malariadiagnostik (49). Die Vorteile liegen in der Möglichkeit, mit einem routinemäßig eingesetzten und automatisierten Gerät Fälle zu erkennen, bei denen kein Verdacht auf eine Malariaerkrankung wegen fehlender oder unspezifischer Symptomatik bestand. Mikroskopische Diagnostik kann dann anschließend an einen durch ein Gerätsignal veranlaßten Verdacht eingeleitet werden.

Von Nachteil ist die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen durch in der Blutbahn persistierende hämozoinhaltige Leukozyten, die insbesondere in Gebieten mit hohen Reinfektionsraten und asymptomatischen Parasitämien diagnostische Probleme bereiten. Die Sensitivität der Methode hängt letztendlich von der Kinetik der hämozoinhaltigen Leukozyten ab. Hänscheid et al. stellten die Hypothese auf, dass die Sensitivität beeinflusst wird von der Menge an Hämozoin im Blutkreislauf und Immunitätslage verschiedener

Individuen oder Populationen (semi-immun, nichtimmun), womit die abweichenden Ergebnisse zwischen Europäern und Schwarzafrikanern in den vorangegangenen Studien zu erklären wären (49). Die Autoren schlugen die Einführung einer „malaria flag“ vor, d.h. eine Warnung in der Maschinensoftware, um das genannte Phänomen für den praktischen Nutzen als ein adjuvantes Mittel zur Malaria Diagnose auszunutzen.

Zur Untersuchung der großen Diskrepanzen von Sensitivität und Spezifität zwischen semi-immunen und nichtimmunen Malariapatienten wurden in einer weiteren Studie die relativen Frequenzen von hämozoinhaltigen Monozyten gemessen (59). Hierzu wurde ein experimenteller durchflusszytometrischer MoFlo™-Zellsorter benutzt, der eine weitaus höhere Messgenauigkeit durch Zählung von bis zu 500.000 Leukozyten (ca. 5.000-10.000 bei Routinedurchflusszytometern) erreicht („rare-event-detection“). Untersucht wurden Blutproben von Reiserückkehren mit Fieber und gesunden Probanden als Vergleichsgruppe. Die mittleren relativen Häufigkeiten von pigmenthaltigen Monozyten im Verhältnis zu Monozyten bei gesunden (Hintergrundaktivität), nichtimmunen und semi-immunen Patienten betragen $4,4 \times 10^{-6}$, $1,5 \times 10^{-4}$ und $8,8 \times 10^{-4}$ respektive. Sensitivität und Spezifität konnten im Vergleich zu vorhergehenden Studien deutlich verbessert werden: Sensitivität gesamt: 92% (nichtimmun: 86%, semi-immun: 100%); Spezifität: 100%.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden der Immunstatus von Malariapatienten mit der Genauigkeit eines Routinedurchflusszytometers (Cell-Dyn 3000®) verglichen und Unterschiede in der Genauigkeit eines Routineinstruments im Vergleich zu einem experimentellen MoFlo™-Zellsorter mit verbesserter Sensitivität analysiert (40). Bei einer Gruppe von Reiserückkehrern mit unklarem Fieber wurde eine mikroskopische Malariadiagnostik (Dicker Tropfen) durchgeführt, der Immunstatus der Patienten wurde durch indirekten Fluoreszenz-Antikörpertest bestimmt. Die Bestimmung von hämozoinhaltigen Monozyten geschah mit einem Cell-Dyn 3000®-Durchflusszytometer, gleichzeitig wurden die Blutproben eine Untergruppe von Patienten mit dem oben beschriebenen experimentellen MoFlo™-Zellsorter analysiert. Das Cell-Dyn 3000®-Gerät erreichte eine Sensitivität von 48,6%

(73,7% in semi-immunen und 28,6% in nichtimmunen Individuen) und eine Spezifität von 96,2%. Das Detektionslimit lag bei einer relativen Konzentration von 2×10^{-4} pigmenthaltigen Monozyten. Bei der Analyse durch den MoFlo™-Zellsorter konnte das Limit auf $3,25 \times 10^{-5}$ gesenkt werden.

Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die Korrelation zwischen Immunstatus und relativer Konzentration hämozoinhaltiger Monozyten das Versagen des Routineinstrumentes bei nichtimmunen Patienten und seine signifikant höhere Sensitivität bei semi-immunen Patienten erklärt. Durch Modifikationen am Routineinstrument wie Hinweise bei auffälligen Proben und Möglichkeit zu ausgedehnterer Leukozytenzählung bei Verdacht einer Malariainfektion könnte das Potential dieser Methode verbessert werden.

Untersuchungen mit modernen Durchflusszytometern weisen darauf hin, dass in Zukunft auch der direkte Nachweis von parasitenhaltigen Erythrozyten möglich ist. Hänscheid et al. hatten 2000 in einer Studie mit einem Cell-Dyn 3500®-Gerät bereits darstellen können, dass bei Malariapatienten mit osmotisch resistenten Erythrozyten der Nachweis von pigmenthaltigen Parasiten innerhalb intakter Erythrozyten, die normalerweise vor der Leukozytenanalyse zerstört werden, möglich ist (47). Eine systematische Erfassung von intraerythrozytären Plasmodien ist allerdings erst möglich mit der nächsten Generation dieser Instrumente (Cell-Dyn 4000®-Serie), bei denen die Fluoreszenzfärbungen zum Nachweis von intrazellulären Nukleinsäuren mit der M.A.P.S.S.™-Technologie kombiniert werden (119).

Im Zusammenhang mit dieser Methode wurde über eine sogenannte Pseudoretikulozytose bei Malariapatienten berichtet (52;98). Fluoreszenzmarkierte, parasitenhaltige Erythrozyten wurden vom Cell-Dyn 4000®-Durchflusszytometers als Retikulozyten fehlinterpretiert, was indirekt zur Berechnung der Parasitämie genutzt werden konnte. Dieses Phänomen wurde bereits früher in der Literatur erwähnt (118). Erste Untersuchungen belegen, dass die Cell-Dyn 4000®-Serie sogar das Potential zur Differenzierung von Infektionen mit *P. falciparum* oder *P. vivax* hat (97). Padial et al. (2005) wiesen in ihrer Studie mit der Cell-Dyn 4000® auf eine bisher nicht beobachtete

auffällige Streuung von Eosinophilen innerhalb der atypischen Monozytenpopulation hin, die sie als Gametozyten interpretierten (80).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass atypische Leukozytenpopulationen in den Scattergrammen der Durchflusszytometer wohl nicht völlig spezifisch für eine Infektion mit *Plasmodium* spp. sein mögen, sondern möglicherweise auch bei Filarieninfektionen zu finden sind. Crespo et al. (2004) beschrieben drei Patienten, die nicht an Malaria erkrankt waren, allerdings mit dem Nematoden *Mansonella perstans* infiziert waren (15). Bei der Analyse der Blutproben mit der Cell-Dyn 4000[®] fielen Streuungen auf, die den für Malaria typischen ähnlich, aber nicht identisch waren.

Da auch *Schistosoma* spp. Hämozoin als Ausscheidungsprodukt produzieren (77), ist auch für diese Parasiten eine Nachweismöglichkeit durch durchflusszytometrische Analyse denkbar. Bisher wurde dieses Phänomen jedoch nicht genauer untersucht. Bei der in Gabun jedoch teilweise sehr hohen Prävalenz mit bis zu 80% (44) ist nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse von durchflusszytometrischer Malariadiagnostik durch eine gleichzeitig vorliegende Bilharziose beeinflusst und verfälscht werden.

1.4 Gegenstand der vorliegenden Studie

Malaria ist weltweit und im speziellen auf dem afrikanischen Kontinent eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit hoher Morbidität und Mortalität. Neben der effektiven Behandlung ist insbesondere die rasche Diagnose von entscheidender Bedeutung für die Genesung des Patienten.

Zahlreiche diagnostische Methoden existieren, jedoch werden die meisten erst auf Verdacht des Untersuchers eingeleitet, so dass die Gefahr besteht, den Patienten zu spät oder gar nicht effektiv zu behandeln. Der zentrale Vorteil der durchflusszytometrischen Methode besteht darin, dass ähnlich einem Screeningverfahren bereits durch ein einfaches Differentialblutbild schnell und unkompliziert deutliche Hinweise auf eine Malariainfektion gewonnen werden können. In vorangehenden Studien konnte geklärt werden, dass diese Methode gerade in endemischen Gebieten eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist.

In früheren Studien wurde der deutliche Zusammenhang zwischen Schwere einer Malariaerkrankung und Hämozoinkonzentrationen in Leukozyten im peripheren Blut beschrieben. Da die Geräte der Cell-Dyn[®]-Reihe Hämozoin nachweisen können, stellen sie eine Möglichkeit dar, neben der Malariadiagnostik auch die Schwere der Erkrankung automatisch festzustellen. Gegenstand dieser Studie ist die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Cell-Dyn 3000[®]-Gerätes in Lambaréné, Gabun. Weiterhin sollen Verfahren entwickelt werden, mit denen die Evaluation der Schwere der Malariaerkrankung und damit eine prognostische Aussage anhand der Analyse der Differentialblutbilder des Gerätes ermöglicht wird.

2 Material und Methoden

2.1 Studienort

Die Studie wurde im Zeitraum September 2003 bis März 2004 im Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné, Gabun durchgeführt.

Gabun liegt im Westen Zentralafrikas (Äquatorialafrika). Es grenzt im Norden an Äquatorial-Guinea und Kamerun, im Südosten an den Kongo und im Westen an den Atlantischen Ozean. Seine Oberfläche umfasst 270 000 km².

Über 75% des Landes sind mit primärem Regenwald bedeckt, der überwiegende Rest wird von Feuchtsavanne eingenommen. Die Bevölkerung Gabuns beträgt etwa 1,2 Millionen Einwohner.



Abb. 4: Karte von Gabun (Abb. aus CIA, *The Worldfactbook*)

Das Klima ist wegen seiner Nähe zum Äquator in typischer Weise warm und feucht und durch vier Jahreszeiten charakterisiert: zwei Regenzeiten (eine kleine von Oktober bis Dezember und eine große von Januar bis Mai)

unterbrochen von einer längeren und einer kürzeren Trockenzeit. Die monatliche Tagesdurchschnittstemperatur liegt bei 27°C. Die durchschnittliche relative Luftfeuchtigkeit schwankt in der Regenzeit zwischen 80 und 90%. Die Niederschlagsmengen verteilen sich auf die zwei Regenzeiten und betragen zwischen 1600 und 3000 mm pro Jahr (124).

Die Stadt Lambaréné, auf einer Insel in der Mitte des Flusses Ogouée und an seinen beiden Ufern gelegen, ist Hauptort und Verwaltungs-, Wirtschafts- und medizinisches Zentrum der Provinz Moyen-Ogouée (43.000 Einwohner). Lambaréné ist etwa 180 km von der Hauptstadt Libreville entfernt und zählt ungefähr 24.000 Einwohner.



Abb. 5: Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné, Gabun

Das Albert-Schweitzer-Krankenhaus befindet sich einige Kilometer außerhalb von Lambaréné am rechten Ufer des Ogouée-Flusses. Das Krankenhaus umfasst ca. 300 Betten mit den Abteilungen Chirurgie, Gynäkologie, Innere

Medizin, Pädiatrie und eine Zahnklinik. Auf dem Gelände befinden sich ebenfalls das Forschungslabor und die Unterkünfte der Mitarbeiter des Krankenhauses.

Die Übertragung der Malaria erfolgt in Lambaréné und seiner Umgebung ganzjährig (hyperendemisches Gebiet). 90% der Infektionen werden durch *Plasmodium falciparum* verursacht, der Rest durch *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale*. Mischinfektionen mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* bzw. *Plasmodium ovale* kommen ebenfalls vor. Die Hauptvektoren sind *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis* und *Anopheles funestus*. Die Transmission unterliegt regionalen und saisonalen Schwankungen, mit den höchsten Raten gegen Ende der kurzen Regenzeit und während der Trockenzeit. Eine geringere Transmission ist während der langen Regenzeit zwischen Januar und Mai zu beobachten (124). Die entomologische Inokulationsrate (EIR) beträgt in diesem Gebiet etwa 50 infektiöse Stiche pro Jahr (107).

2.2 Patienten und Probanden

Im Zeitraum von 9. Juli 2003 bis 28. Februar 2004 wurden insgesamt 1217 Patienten für die Studie rekrutiert. Rekrutierte Probanden wurden bei Erfüllung folgender Einschlusskriterien in die Studie eingeschlossen:

- Teilnahme des Probanden an einer anderen laufenden Studie im Labor
- Vorliegen eines Dicken Tropfens vor Malariabehandlung und
- Vorliegen einer Blutbildanalyse durch das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät

Patienten wurden ausgeschlossen, wenn die oben genannten Kriterien nicht erfüllt waren; weiterhin, wenn:

- die Analyse des Cell-Dyn 3000[®]-Geräts aus berechtigten Gründen anzuzweifeln war, insbesondere bei Verstreichen eines zu langen Zeitraums (>6 Stunden) zwischen Blutentnahme und Analyse, verschmutzten oder ungenügenden Chemikalien oder jeder anderen Art von gerätbedingten Fehlermeldungen

- der Dicke Tropfen mikroskopisch nicht mehr zweifelsfrei gelesen werden konnte, insbesondere bei qualitativ minderwertigen Färbungen oder verschmutzten und verkratzten Objektträgern.

1.046 der rekrutierten Probanden wurden in die Studie eingeschlossen, 171 ausgeschlossen. Aus dem Patientenkollektiv wurden mehrere Untergruppen gebildet:

Nach Diagnose wurden die Probanden in eine der vier Gruppen aufgeteilt:

- keine Malaria, d.h. gesund oder andere akute oder chronische Erkrankungen als Malaria (z.B. Pneumonie, Harnwegsinfekt)
- asymptomatische Parasitämie
- unkomplizierte Malaria
- komplizierte Malaria

Der Proband galt als malariakrank, wenn Parasiten im Dicken Tropfen nachweisbar waren und gleichzeitig Fieber (Temperatur > 37.5°C rektal bei Kindern/sublingual bei Erwachsenen) bestand. Als malariakrank galten auch diejenigen Patienten, bei denen in den vorausgegangenen 21 Tagen Malaria diagnostiziert worden war und die bereits mit Malariamedikamenten anbehandelt worden waren, aber immer noch eine Parasitämie zeigten.

Eine asymptomatische Parasitämie lag dann vor, wenn zwar Parasiten im Dicken Tropfen gefunden wurden, allerdings weder Fieber noch klinische Symptome nachweisbar waren.

In Anlehnung an die WHO-Definition (2000) wurde bei Patienten mit Malaria die Diagnose komplizierte Malaria gestellt, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt war:

- zerebrale Malaria: nicht erweckbares Koma (min. während einer Stunde) oder eingetrübtes Bewußtsein, Blantyre Coma Scale (BCS) \leq 3
- schwere Anämie: normozytäre Anämie mit einem Hämatokrit < 15% oder mit Hämoglobin < 5g/dl in Anwesenheit von >10.000 Parasiten/ μ l (*)
- ARDS (adult respiratory distress syndrom) oder IRDS (infant respiratory distress syndrom)

- Hypoglykämie: Glukosekonzentration im Vollblut <2.2 mmol (40 mg/dl)
- Wiederholte generalisierte Konvulsionen: zwei oder mehr Konvulsionen in den vorangegangenen 24 Stunden (**)
- Prostration: Unfähigkeit des Kindes zu sitzen oder zu trinken (je nach Alter), obwohl vor Erkrankung noch fähig
- Hyperparasitämie: Parasitämie >4%, bzw. > 250.000/μl

(*) : Im Falle einer Bluttransfusion wurde entweder der ursprüngliche Wert vor Transfusion gewertet oder bei Fehlen durch die Menge des transfundierten Blutes auf den ursprünglichen Wert zurückgeschlossen. Bei mehrfachen Analysen (Forschungslabor/Kliniklabor) wurde der erste Wert übernommen.

(**): Wegen meist unklaren anamnestischen Angaben der Probanden wurde dieses Kriterium weiter gefasst als in der WHO-Definition (mehr als zwei Konvulsionen in 24 Stunden).

Die Patienten wurden außerdem nach ihrem Alter in zwei Untergruppen eingeteilt:

- Kinder bis zum vollendeten 14. Lebensjahr
- Erwachsene ab dem 15. Lebensjahr

2.3 Hard- und Software

Patientendaten wurden mittels Datenblatt aufgenommen und in eine Filemaker Pro 6.0-Datenbank (Filemaker Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) übertragen. Analysen des Cell-Dyn[®]-Gerätes wurden mittels Screen Thief (Nildram Software, Stoke Mandeville, Buckinghamshire, GB) als Screenshot auf Computer überführt und mit IrfanView (Irfan Skiljan, Wien, A) graphisch analysiert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

2.4 Geräte und Chemikalien

Zur Erstellung des Differentialblutbildes wurde den Probanden venöses Blut abgenommen, welches bis zur Analyse in EDTA behandelten Röhrchen konserviert wurde (Kinder 2 ml, Erwachsene 7 ml). Die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Analyse betrug in allen Fällen weniger als sechs Stunden. Das Blut wurde mit einem Instrument der Cell-Dyn 3000[®]-Reihe (Abbott Diagnostics, Santa Clara, Kalifornien, USA) analysiert.

2.5 Malaria-Diagnostik

Die quantitative Bestimmung der Parasiten und der prozentualen Anteile an hämozoinhaltigen Monozyten und neutrophilen Granulozyten erfolgten im Dicken Tropfen. Nach Reinigung der Punktionsstelle mit 70% Ethanol wurden 10 µl kapillares Blut mit einer Pipette abgenommen. Dies erfolgte beim Kind bis zum Alter von 12 Monaten an der Ferse, ansonsten an der Fingerbeere. Das so gewonnene Blut wurde auf einem Objektträger in einem 10 x 18 mm großen Feld gleichmäßig aufgetragen, danach wurde der Objektträger für einige Minuten in einen Trockenschrank gelegt. Der dicke Tropfen wurde daraufhin 20 Minuten mit Giemsalösung angefärbt. Die Färbelösung wurde alle sechs Stunden aus einer konzentrierten Lösung und Titrisolphosphatpuffer (pH 7,2) im Verhältnis 1:5 hergestellt und gefiltert. Anschließend wurde der Objektträger unter fließendem Wasser vorsichtig gespült und wiederum für einige Minuten getrocknet. Für die Bestimmung der Parasitämie wurden unter dem Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung mindestens 100 Sichtfelder ausgezählt. Die durchschnittliche Menge von Parasiten pro Sichtfeld wurde mit einem konstanten Faktor (x 600) multipliziert, der sich aus der Größe des ausgestrichenen Blutropfens und der Menge des aufgetragenen Blutes berechnet, woraus sich die Parasitämie pro Mikroliter ergibt. Die Detektionsschwelle dieser Methode liegt bei etwa 5-20 Parasiten pro Mikroliter Blut (45).

Zur Bestimmung der prozentualen Anteile an hämozoinhaltigen Monozyten bzw. neutrophilen Granulozyten wurden im dicken Tropfen 100 Monozyten bzw. 200 neutrophile Granulozyten aufgesucht und die Zahl der Leukozyten mit Hämozoinkristallen registriert, woraus sich die jeweiligen prozentualen Anteile errechnen lassen.

Hämozoinhaltige Monozyten bzw. neutrophile Granulozyten werden im folgenden als PCM („pigment containing monocytes“) bzw. PCN („pigment containing neutrophiles“) bezeichnet.

2.6 Funktion des Cell-Dyn-3000®

2.6.1 Grundlagen

Im Cell-Dyn 3000® wird ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Leukozyten-Differenzierung angewendet. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander mehrere Sensoren passieren. Neben der Leukozytendifferenzierung wird auch eine Bestimmung der Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen durchgeführt – diese erfolgt allerdings nicht optisch, sondern auf der Basis der elektrischen Widerstandsmessung.

Für die Leukozytendifferenzierung wird die Blutprobe von einem Probennehmer angesaugt und in einen Strom schnell fließender, zellfreier Hüllflüssigkeit (Sheath-Reagenz) innerhalb einer Durchflussküvette abgegeben. Dabei werden die Erythrozyten wegen der hypoosmotischen Eigenschaften des Sheath-Reagenz lysiert. Die Fließgeschwindigkeiten der beiden Flüssigkeiten unterscheiden sich, so dass eine Laminarströmung entsteht. Durch die spezifische Konstruktion der Küvette und der Fließgeschwindigkeit der Hüllflüssigkeit wird erreicht, dass die Zellen hintereinander in einer Reihe strömen (hydrodynamische Fokussierung).

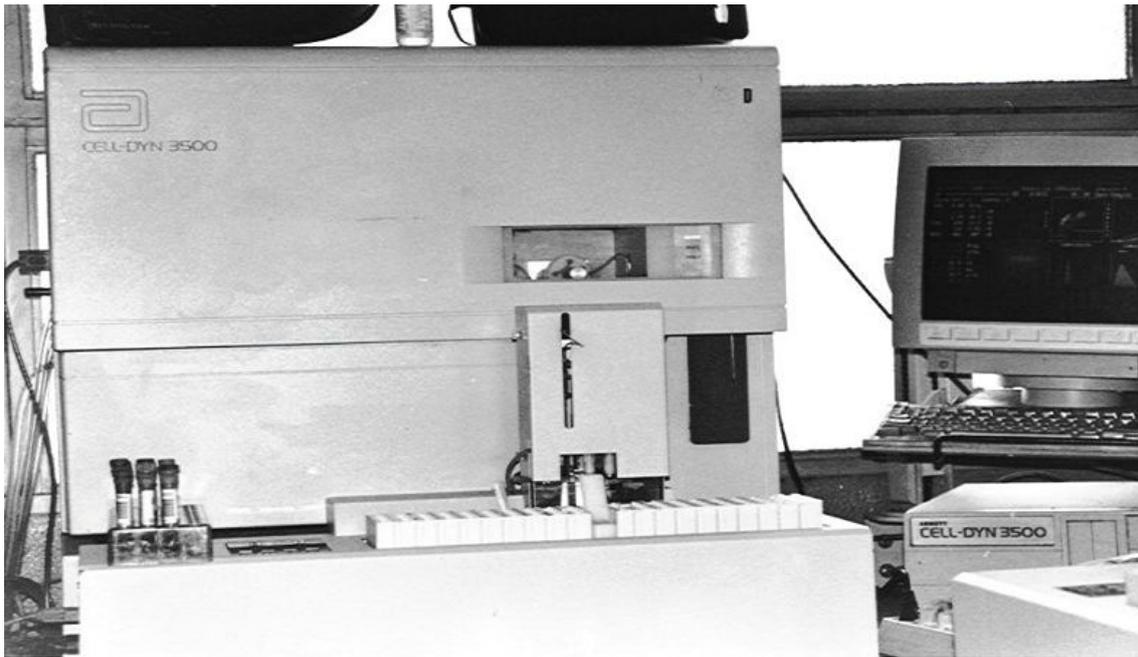


Abb. 6: Analysegerät der Cell-Dyn[®]-Reihe (Cell-Dyn 3500[®], Abbott Diagnostics)

Der Flüssigkeitsstrom wird in den Laser-Messbereich eingebracht. Dort werden die einzeln passierenden Zellen von einem vertikal polarisierten 5-mW-Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 632,8 nm angestrahlt. Der Laserstrahl bzw. ein geringer Teil dessen Lichtes wird in verschiedene Raumwinkel gestreut. Gemessen werden bei einem Laser-Durchflusszytometer zwei Streuwinkel: Vorwärtsstreuung (0° und 10°) und rechtwinklige Streuung (90°). Die Charakteristika der Streuverhalten dienen dem Gerät als Informationen über Zellgröße (0°), Kern-Zytoplasma-Verhältnis (10°), Granularität (90° depolarisiert) und Oberflächenmorphologie (90°) des Zellkernes.

Das vorwärts gerichtete Laserstreulicht wird durch einen halbdurchlässigen Spiegel in 0° - und 10° -Streulicht differenziert und von Detektoren registriert. Das im rechten Winkel abgestrahlte Streulicht wird durch einen Strahlenteiler in zwei Teile aufgeteilt: Ein Teil wird direkt auf einen Photo-Multiplier (90° -Streulicht) gelenkt, der andere trifft auf einen horizontalen Polarisationsfilter. Dieser lässt nur Licht mit gedrehter Polarisationssebene zu einem Photo-Multiplier gelangen (90° depolarisiertes Streulicht).

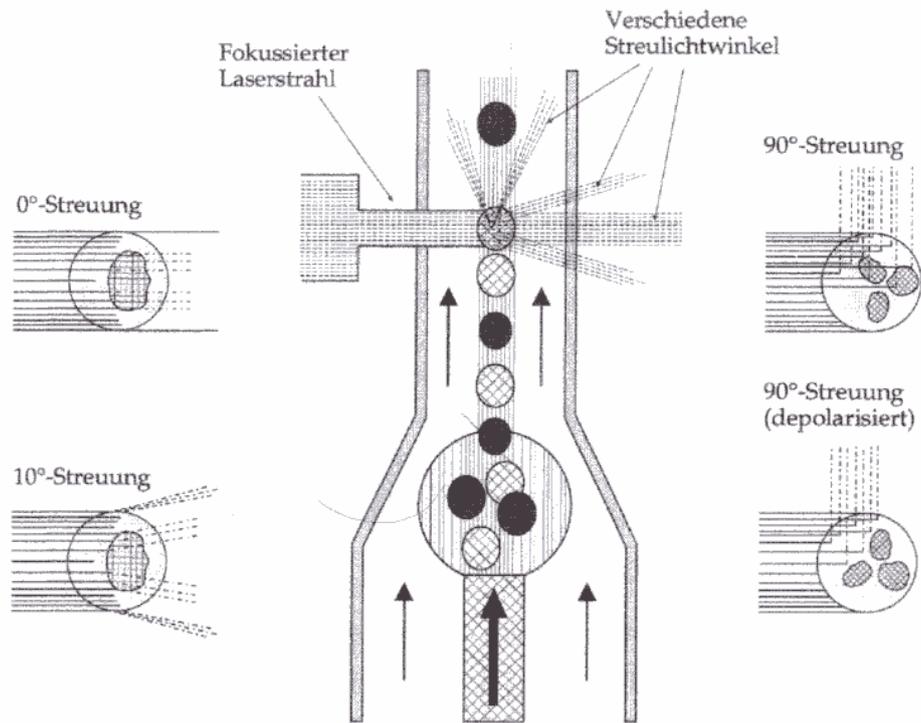


Abb. 7: Funktion der Lichtstreuung; dünne Pfeile: Sheath, dicke Pfeile: Probe (Abbildung aus Bedienungsanleitung Cell-Dyn 3000[®], Abbott Diagnostics)

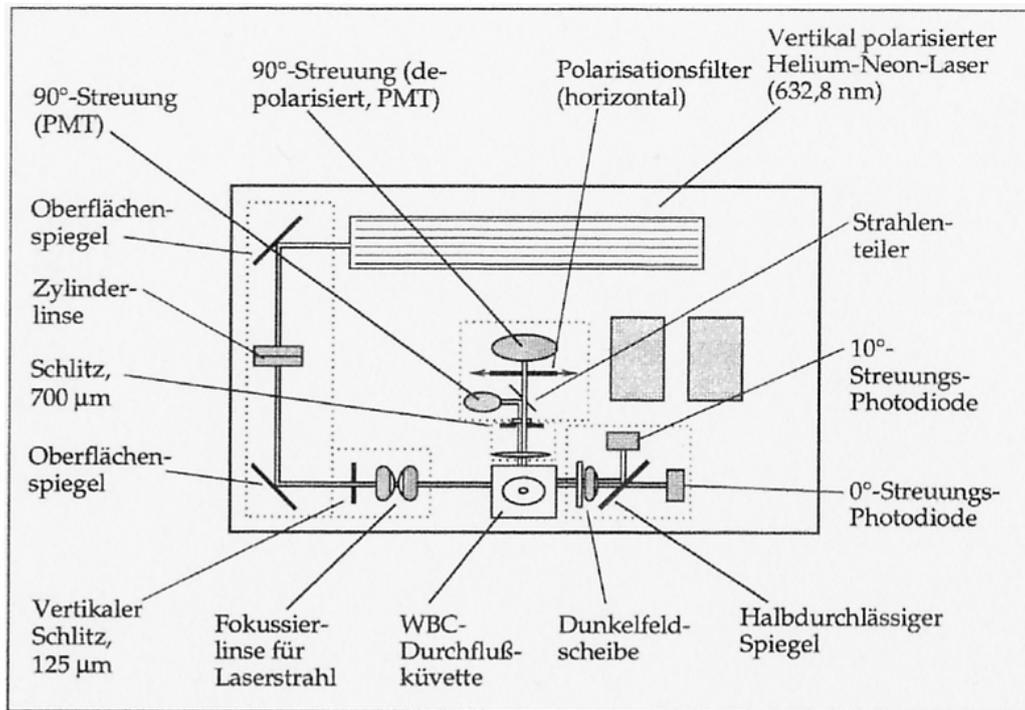


Abb. 8: optische Bank (Abbildung aus Bedienungsanleitung Cell-Dyn 3000[®], Abbott Diagnostics)

Die von den vier Detektoren aufgefangenen Lichtsignale werden in elektrische Signale umgewandelt. Diese dienen dem Gerät als Grundlage für die Berechnung von sog. Scatterdiagrammen, auf denen jeweils zwei der vier Streulichtstrichtungen gegeneinander aufgetragen werden. Eine Software ermittelt daraus mit Hilfe spezieller Algorithmen die Leukozytendifferenzierung und die absolute Leukozytenzahl. Dieses Verfahren wird als M.A.P.P.S.TM („multi-angle polarized scatter separation“) bezeichnet.

2.6.2 Leukozytendifferenzierung durch Scattergramme

Die Informationen der Lichtstreuung werden in Form einer Punktwolke in Scattergrammen dargestellt. Dabei werden jeweils zwei Streuwinkel als x- und y-Achse gegeneinander aufgetragen. Zur genaueren Differenzierung kommen drei Scattergramme zur Anwendung:

2.6.2.1 Mononukleäre-Polymorphkernige (90°/10°-Scattergramm)

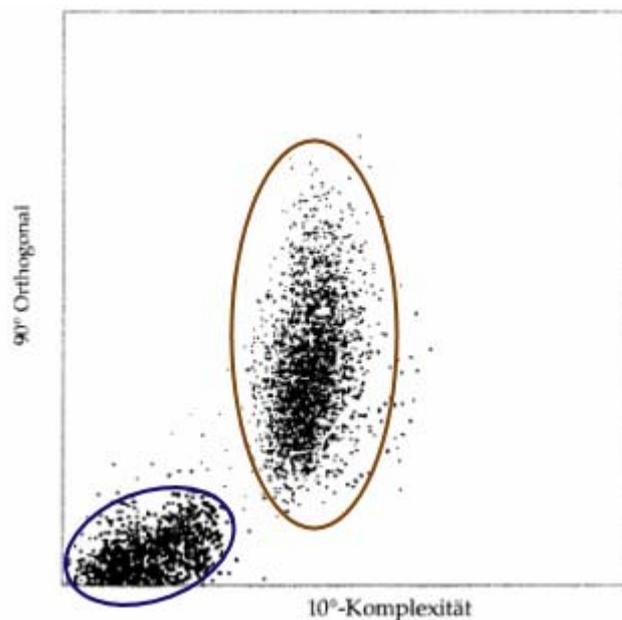


Abb. 9: Mononukleär (dunkelblau) – Polymorphkernige (braun) (Abbildung modifiziert aus Bedienungsanleitung Cell-Dyn 3000[®], Abbott Diagnostics)

Die aufgefangenen Impulse des 90°-Streulichts werden auf der y-Achse, die des 10°-Streulichts auf der x-Achse abgebildet. Dabei lassen sich zwei Zellklassen unterscheiden: mononukleäre Zellen erscheinen in der linken unteren Ecke in der Nähe des Origo, polymorphkernige in der rechts oben gelegenen Wolke.

Die Unterscheidungsschwelle ist - wie auch bei den anderen Scattergrammen - dynamisch und wird von der verarbeitenden Software errechnet.

2.6.2.2 Neutrophile-Eosinophile (90°/90°dep-Scattergramm)

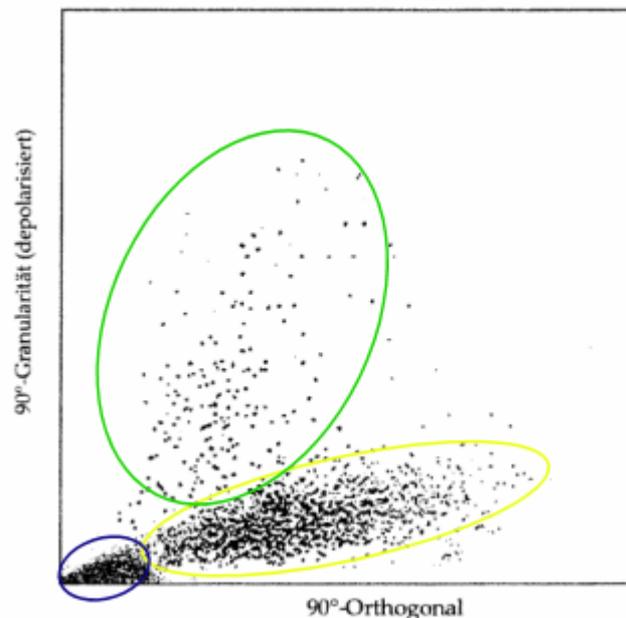


Abb. 10: Scattergramm Neutrophile (gelb) – Eosinophile (grün); Mononukleäre Zellen dunkelblau dargestellt (Abbildung modifiziert aus Bedienungsanleitung Cell-Dyn 3000®, Abbott Diagnostics)

Die Informationen des 90°dep-Streulichts erscheinen auf der y-Achse, die des 90°-Streulichts auf der x-Achse. Deutlich zu erkennen sind zwei verschiedene Populationen: Die obere Wolke beschreibt die Eosinophilen, die untere die Neutrophilen. Diese Unterscheidung beruht auf der charakteristischen Struktur der Eosinophilen-Granula, die zu einer stärkeren Depolarisation des Streulichtes führen als bei anderen Zellen.

Die mononukleären Zellen wurden bereits identifiziert und stören deshalb nicht bei der Unterscheidung zwischen neutrophilen und eosinophilen Zellen. Auf diesem Diagramm sind sie in der linken unteren Ecke zu erkennen.

2.6.2.3 Abgrenzung mononukleären Zellen (0°/10°-Scattergramm)

Die Daten des 0°-Streulichtes werden auf der y-Achse aufgetragen, die Daten des 10°-Streulichtes auf der x-Achse. Hier lassen sich drei Zellgruppen unterscheiden: Rechts oben stellen sich die Monozyten dar, die links unten gelegene große Wolke beschreibt die Lymphozyten. Basophile erscheinen als eigene Gruppe zwischen den beiden anderen Populationen. Die basophilen Granulozyten werden vom Gerät unter den mononukleären Zellen klassifiziert, da deren Granula vom Sheath-Reagenz gelöst werden und sich damit die Eigenschaften der Zellen verändern.

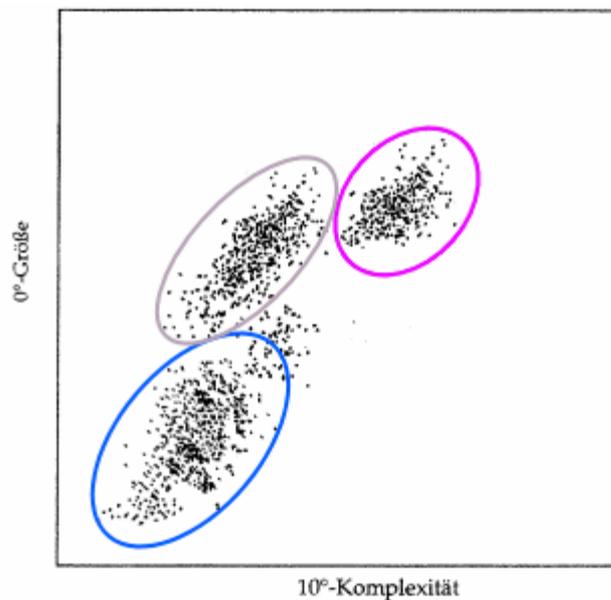


Abb. 11: mononukleäre Zellen; hellblaue: Lymphozyten, violett: Monozyten, grau: Basophile (Abbildung modifiziert aus Bedienungsanleitung Cell-Dyn 3000[®], Abbott Diagnostics)

2.6.3 Optische Darstellung der Ergebnisse

Nach der Berechnung der genannten Parameter werden die Ergebnisse graphisch auf dem Monitor angezeigt. Neben Patientenidentifikationen und numerischen Werten des Blutbildes sind die Scattergramme einsehbar. Die einzelnen Zellpopulationen sind zur optischen Identifizierung farbkodiert. Dabei entsprechen gelbe Punkte den neutrophilen, grüne den eosinophilen und weiße den basophilen Granulozyten. Monozyten werden als violette Punktwolke dargestellt, Lymphozyten erscheinen blau. Außerdem gibt das Gerät Warnungen („flags“) bei pathologischen Ergebnissen (1). Abbildung 12 zeigt ein typisches Ergebnis .

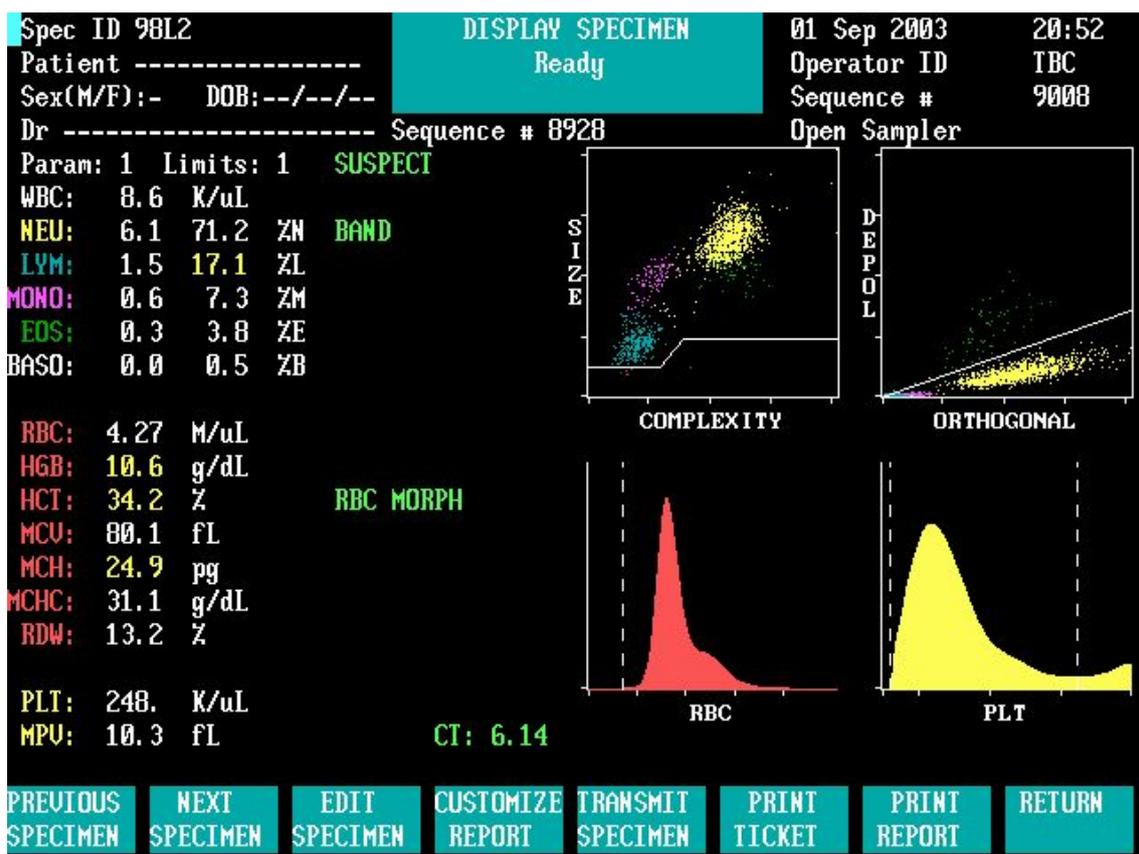


Abb. 12: Screenshot einer typischen Blutanalyse. In den oberen Ecken Patientendaten bzw. geräteinterne Informationen, linke Bildhälfte numerische Darstellung des Blutbildes, rechte Bildhälfte Scattergramme.

2.6.4 Methoden zur Auswertung der Cell-Dyn 3000[®]-Analysen

Zur weiteren Analyse der durch das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät gewonnenen Daten wurde dessen Lobularitäts-Granularitäts-Diagramm (90°/90°dep-Scattergramm) herangezogen.

Wird Blut von Malariapatienten analysiert, so kann eine abnormale Verteilung der Punktwolken beobachtet werden. Auf der linken Seite erscheint eine auffällig hochstreuende Ansammlung von violetten Punkten, die über die Unterscheidungsschwelle – einer vertikalen, von der Software der Cell-Dyn[®] errechneten Linie - reicht (normalerweise finden sich die Monozyten in der linken unteren Ecke nahe des Origos).

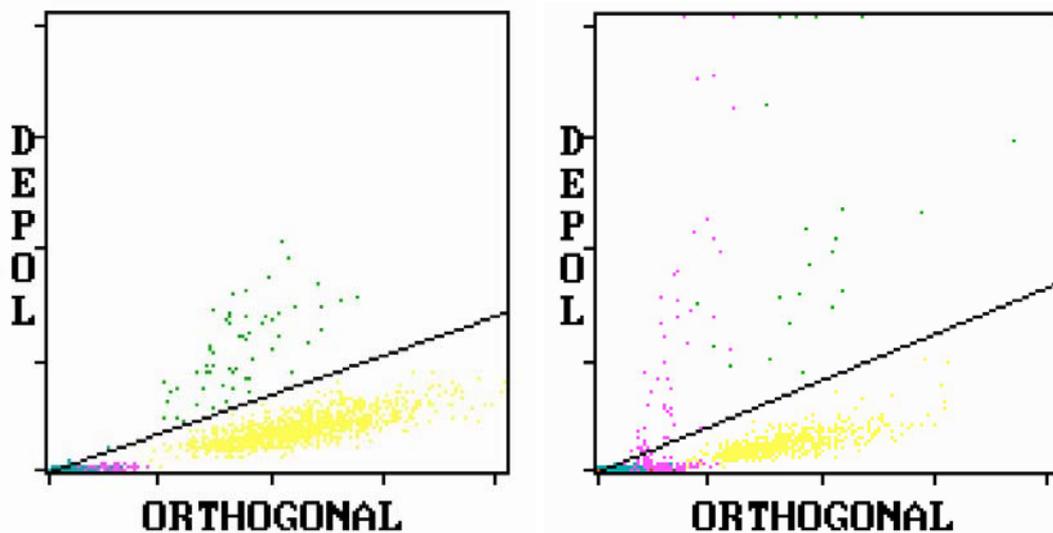


Abb. 13: Beispiele des Lobularitäts-Granularitäts-Diagramms (90°pol/90°depol). Links, gesunder Proband: Normale Verteilung der Leukozyten, Monozyten (violett) in der linken unteren Ecke, eosinophile Granulozyten (grün) als gut umschriebene Punktwolke dargestellt; rechts, Malariainfektion: Streuung der Monozyten oberhalb der Unterscheidungsschwelle (vertikale Linie), atypisch verteilte Eosinophile (Abbildungen zur besseren Darstellung schwarz-weiß invertiert)

Die Eosinophilenwolke ist weit gestreut und reicht über das gesamte Scattergramm. Für beide Erscheinungen wird die Anwesenheit von

doppelbrechendem, depolarisierendem Hämozoïn in den Zellen verantwortlich gemacht: hämozoïnhaltige Monozyten werden dabei von der Wolke der violetten Punkte jenseits der Unterscheidungsschwelle repräsentiert, die weitgestreuten grünen Punkte stellen wahrscheinlich hämozoïnhaltige Neutrophile dar, die vom Gerät falsch klassifiziert wurden, da sie wegen ihrer Eigenschaft der doppelten Lichtbrechung den eosinophilen Granulozyten hinzugezählt wurden (49).

2.6.4.1 Analyse der Monozyten

Bei Auftreten von violetten Punkten (Monozyten) oberhalb der von der Gerätesoftware gesetzten Grenze wurde deren Anzahl ausgezählt. Dabei wurden nur solche Punktsignale gewertet, welche mindestens einen Abstand von einem Pixel (Bildpunkt) von der Unterscheidungsschwelle hatten. Direkt angrenzende Signale wurden nicht gezählt.

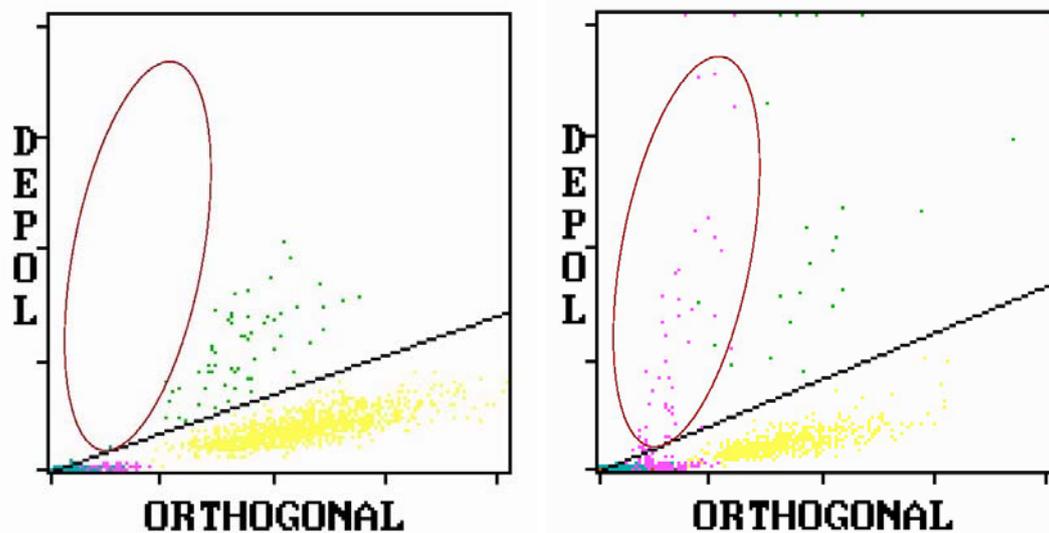


Abb. 14: Gleiche Patienten wie in Abb. 13 : der rot umrandete Bereich gibt den typischen Streubereich der Monozyten bei Malaria wieder. Violette Punktsignale werden oberhalb der Schwelle (vertikale Linie) gezählt. Links gesunder Proband, rechts Malariainfektion (Abbildungen zur besseren Darstellung schwarz-weiß invertiert)

Diese auffällig atypisch verteilten violetten Signale werden im folgenden als atypisch verteilte violette Punktsignale (AVP) bezeichnet.

Zur weiteren Analyse der Verteilung der AVPs wurde der Scatterindex gebildet. Das Schaubild wurde in zehn horizontale Bereiche gleicher Größe aufgeteilt und die darin enthaltenen AVPs gezählt. Zur Berechnung des Scatterindizes wurden alle Punkte zusammengezählt, die einzelnen Bereiche zuvor jedoch unterschiedlich stark gewichtet wurde (10% - 100%). Je höher die AVPs auf dem Schaubild und je mehr AVPs insgesamt auftraten, desto höher fiel der Scatterindex aus.

Berechnung des Scatterindizes im Beispiel (vgl. Abb. 15): $0,1 \times 8 + 0,2 \times 10 + 0,3 \times 6 + 0,4 \times 7 + 0,5 \times 3 + 0,7 \times 0 + 0,8 \times 1 + 0,9 \times 2 + 1,0 \times 2 = 13,5$

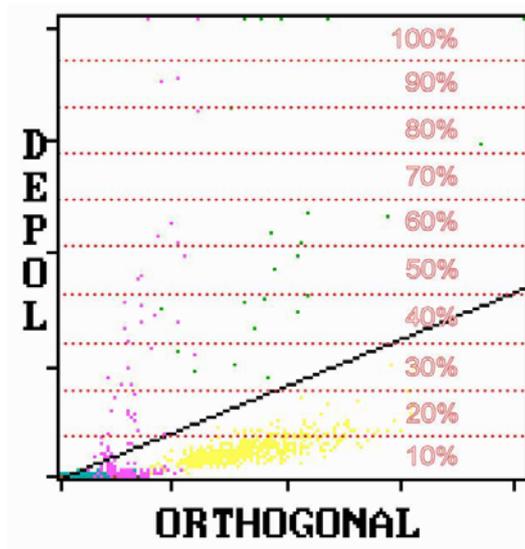


Abb. 15: gleicher Patient wie in Abb. 13 rechts: Dargestellt sind die Zählbereiche mit jeweiliger Gewichtung der AVPs

2.6.4.2 Analyse der neutrophilen Granulozyten

Für die Auswertung der grünen Punkte wurde ein Analysebereich, das sog. 67%-Analysefeld, konstruiert, in dem auftretende Signale erfasst werden: Dieser wird gebildet durch eine Gerade durch den Origo und den Koordinatenpunkt 0.66/1.0, geschnitten von einer Parallelen der Abszisse durch 0/0.25 (vgl. auch Abb. 16). Grüne Punktsignale (eosinophile Granulozyten bzw.

falsch zugeordnete neutrophile Granulozyten), die in diesem Analysefeld lagen, wurden ausgezählt.

Diese auffällig atypisch verteilten grünen Signale werden im folgenden als atypisch verteilte grüne Punktsignale (AGP) bezeichnet.

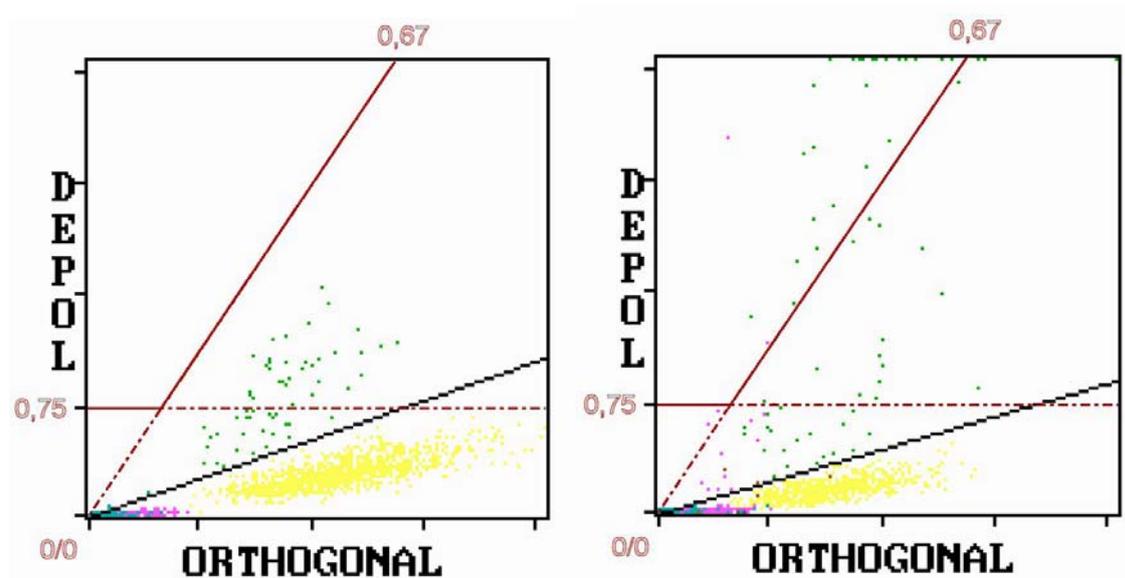


Abb. 16: Gleiche Patienten wie in Abb.: 13 : Die durchgezogenen roten Linien umranden den Bereich, in dem grüne Punktsignale ausgezählt wurden. Links gesunder Proband, rechts Malaria.

2.7 Durchführung der Studie

Die Probanden dieser Studie wurden aus laufenden Studien im Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhaus rekrutiert. Nach der Prüfung der Einschluss- und Ausschlusskriterien wurde ein Proband in die Untersuchung eingeschlossen.

Jedem Probanden wurde eine Studiennummer zugeteilt und das Datum der Aufnahme vermerkt. Initialien, Geschlecht und Alter wurden aufgenommen. Um den Probanden in seiner ursprünglichen Studie eindeutig zu identifizieren, wurde auf die betreffende Studie und Studiennummer verwiesen.

An klinischen und anamnestischen Daten wurden neben Aufnahme diagnosis und Anamnese die Dauer der Symptome, Temperatur, Verlauf der Infektion und

Behandlung vermerkt. Diese Daten wurden entweder direkt vom Patienten erfragt oder aus den Studienunterlagen der betreffenden Studie erhoben.

Im dicken Tropfen der Probanden wurde dann die Parasitämie von *Plasmodium* spp. und der prozentuale Anteil von hämozoinhaltigen Monozyten (PCM) und neutrophilen Granulozyten (PCN) bestimmt. Waren mehrere Dicke Tropfen angefertigt worden, wurde der jeweils erste für die Studie als relevant angesehen und ausgewertet.

Die Analyse des Cell-Dyn[®] führte zur Bestimmung von Differentialblutbild, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozytenzahl. Die einzelnen Analysen der Maschine wurden via Screenshot von der Arbeitsstation der Analyseeinheit auf einen Computer übertragen und mit geeigneten Graphikprogrammen ausgewertet. Dabei wurden unter anderem die Anzahl der atypisch verteilten violetten (AVP) und grünen Punktsignale (AGP) ermittelt. Die Daten des Cell-Dyn[®]-Gerätes und der Dicke Tropfen wurden vom selben Untersucher analysiert, jedoch wurden die zu untersuchenden Objektträger verblindet, die Identität der Probanden war nicht bekannt.

Sämtliche erhobene Daten wurden erst auf Datenblätter notiert, dann in eine elektronische Datenbank übertragen. Diese wurde schließlich statistisch ausgewertet.

2.8 Methoden der statistischen Auswertung

Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde zur Prüfung auf Normalverteilung der Daten genutzt. Zur Analyse der Daten wurden der U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon für unverbundene, nicht normalverteilte Stichproben angewandt. Korrelationen zwischen mikroskopischen und durchflusszytometrischen Ergebnissen wurden mit Spearman's Rho überprüft.

Die Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung des Blutanalysegerätes zur Diagnose einer Malariainfektion erfolgte durch Vierfeldertafeln.

Receiver-Operating-Characteristic-Kurven wurden berechnet, um die Testgüte der atypischen Punktsignale zum Nachweis von komplizierter Malaria zu prüfen.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

3.1.1 Altersgruppen

Von insgesamt 1.046 Probanden waren 368 Kinder bis zum vollendeten 14. Lebensjahr (197 weiblich, 171 männlich). 678 Probanden waren älter als 14 Jahre alt, ausschließlich Frauen in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft.

Altersgruppe	Geschlecht		Total
	weiblich	männlich	
Kinder (bis 14. LJ)	197	171	368
Erwachsene (ab 15. LJ.)	678	0	678
Total	875	171	1.046

Tab. 1: Aufteilung der Probanden in Altersgruppen nach Geschlecht

3.1.2 Diagnosegruppen

807 der Probanden (718 weiblich, 89 männlich) hatten keine Malaria, d.h. waren gesund oder an einer anderen akuten oder chronischen Erkrankungen als Malaria (z.B. Pneumonie, Harnwegsinfekt) erkrankt. Bei 55 weiblichen Probanden konnte eine asymptomatische Parasitämie nachgewiesen werden. 133 Probanden (76 weiblich, 57 männlich) zeigten eine unkomplizierte, 51 Probanden (26 weiblich, 25 männlich) eine komplizierte Malaria.

Diagnosegruppen	Geschlecht		Total
	weiblich	männlich	
keine Malaria	718	89	807
asympt. Parasitämie	55	0	55
unkompl. Malaria	76	57	133
kompl. Malaria	26	25	51
Total	875	171	1.046

Tab. 2: Aufteilung der Probanden in Diagnosegruppen und Geschlecht

3.1.3 Gesamtübersicht des Patientenkollektives

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die Gesamtheit des Patientenkollektives, geordnet nach Geschlecht, Alter und Diagnose.

Altersgruppen	Geschlecht	Diagnosengruppen				
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria	Total
Kinder (bis 14. LJ)	weiblich	127		44	26	197
	männlich	89		57	25	171
	Total	216		101	51	368
Erwachsene (ab 15. LJ)	weiblich	591	55	32		678
	männlich					
	Total	591	55	32		678
Total	weiblich	718	55	76	26	875
	männlich	89		57	25	171
	Total	807	55	133	51	1.046

Tab. 3: Zusammensetzung der Studienpopulation; Darstellung von Fallzahlen in den verschiedenen Altersgruppen, Diagnosegruppen und Geschlecht

3.1.4 Zusammensetzung der nicht malariakranken Probanden

Von 1.046 rekrutierten Probanden zeigten 807 keine Zeichen einer Malariainfektion (asymptomatische Parasitämie, unkomplizierte oder komplizierte Malaria). 640 dieser Probanden waren klinisch gesund, 154 waren akut an einer anderen Krankheit als Malaria erkrankt, bei 13 Probanden wies die Anamnese und Krankenakte auf eine stattgefundene und behandelte Malaria hin (Z.n. Malaria).

Nicht malariakranke Patienten		N
Kinder (bis 14. LJ)	gesund	128
	krank	87
	Z.n. Malaria	1
Erwachsene (ab 15. LJ)	gesund	512
	krank	67
	Z.n. Malaria	12
Total	gesund	640
	krank	154
	Z.n. Malaria	13

Tab. 4: Zusammensetzung der nicht malariakranken Probanden

Bei den akut kranken Patienten wurden die in Tabelle 5 dargestellten Diagnosen gestellt. Probanden mit unspezifischen (z.B. Kopfschmerzen) oder chronischen (z.B. Rückenschmerzen) Symptomen ohne Hinweise auf eine akute Erkrankung wurden zu den gesunden Probanden gezählt.

Häufigste akute Erkrankungen	N
Infektionen des Respirationstraktes	56
Hautinfektionen	35
Unklares Fieber	27
Gastroenteritis	11
Infektionen der Harnwege	10
HNO-Infektionen	7
Schwangerschaftskomplikationen	5
Andere bakterielle Infektionen	3
Total	154

Tab. 5: Darstellung der Diagnosen bei kranken Probanden, in Gruppen zusammengefasst

3.1.5 Kriterienverteilung für komplizierte Malaria

komplizierte Malaria	N
schwere Anämie	19
Hyperparasitämie	19
Konvulsionen	15
Eintrübung	12
Prostration	10
Koma	5
Hypoglykämie	3
ARDS/IRDS	3

Tab. 6: Darstellung der Diagnosen, die zur Klassifizierung der Malaria als kompliziert führten (Mehrfachnennung möglich)

In 184 Fällen wurde eine akute Malariainfektion diagnostiziert. Davon lag in 51 Fällen eine unkomplizierte Malaria vor. Tabelle 6 stellt die Befunde dar, welche zu dieser Diagnose führten, wobei in manchen Fällen mehr als eine Diagnose gestellt wurde.

3.2 Ergebnisse von Mikroskopie und Cell-Dyn 3000®

3.2.1 Hämozoinhaltige Leukozyten in Prozent (PCMs/PCNs)

In beiden Altersgruppen sind die durchschnittliche Anzahl hämozoinhaltiger Leukozyten signifikant verschieden zwischen den Gruppen der malariakranken im Vergleich zu den gesunden Probanden ($p < 0,001$).

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Kinder (Geburt - 14. LJ)	N	89		101	51
	RW [in %]	0,0 - 4,0		0,0 - 50,0	1,0 - 53,0
	ME [in %]	0,0		7,0	15,0
	MW [in %]	0,1		9,5	17,8
	KI [in %]	0,0 - 0,2		7,5 - 11,4	14,3 - 21,3
	SA [in %]	0,4		9,7	12,5
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	340	55	32	
	RW [in %]	0,0 - 6,0	0,0 - 8,0	0,0 - 27,0	
	ME [in %]	0,0	1,0	2,5	
	MW [in %]	0,2	1,9	4,8	
	KI [in %]	0,1 - 0,3	1,3 - 2,6	2,6 - 7,1	
	SA [in %]	0,7	2,4	6,1	

Tab. 7: Tabellarische Darstellung der Verteilung der hämozoinhaltigen Monozyten in Prozent (N=Anzahl Probanden; RW=Reichweite; ME=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Die höchsten durchschnittlichen Hämozoinkonzentrationen sind in den beiden Malariagruppen zu finden, mit signifikant höheren Werten bei den komplizierten Malariafällen (PCMs: 17,8% vs. 9,5% bei Kindern [$p < 0,001$], bei Erwachsenen 4,8%; PCNs: 2,3% vs. 0,5% bei Kindern [$p < 0,001$], bei Erwachsenen 0,8%). Geringere Werte zeigt die Gruppe der asymptomatischen Parasitämie (PCMs: 1,9%; PCNs: 0,1%), allerdings immer noch signifikant höher als bei gesunden Probanden ($p < 0,001$). Nicht malariakranke Probanden zeigen nur in wenigen Fällen einen meist geringen Prozentsatz an hämozoinhaltigen Monozyten (PCMs: 0,1% bei Kindern respektive 0,2% bei Erwachsenen; PCNs: jeweils 0,0%).

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Kinder (Geburt - 14. LJ)	N	89		101	51
	RW [in %]	0,0 - 0,0		0,0 - 2,5	0,0 - 18,0
	ME [in %]	0,0		0,5	1,5
	MW [in %]	0,0		0,5	2,3
	KI [in %]	0,0 - 0,0		0,4 - 0,7	1,5 - 3,1
	SA [in %]	0,0		0,6	2,9
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	340	55	32	
	RW [in %]	0,0 - 2,0	0,0 - 1,0	0,0 - 9,5	
	ME [in %]	0,0	0,0	0,3	
	MW [in %]	0,0	0,1	0,8	
	KI [in %]	0,0 - 0,1	0,1 - 0,2	0,1 - 1,5	
	SA [in %]	0,2	0,3	1,9	

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der Verteilung der hämozoinhaltigen neutrophilen Granulozyten in Prozent (N=Anzahl Probanden; RW=Reichweite; ME=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

3.2.2 Atypische Punktsignale (AVPs/AGPs) und Scatterindex

Ähnlich wie bei den hämozoinhaltigen Leukozyten ist in beiden Altersgruppen auch die durchschnittliche Anzahl atypischer Punktsignale und die Höhe des Scatterindexes signifikant verschieden in den Gruppen der malariakranken im Vergleich zu den gesunden Probanden ($p < 0,001$).

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Kinder (Geburt - 14. LJ)	N	216		101	51
	RW	0 - 12		0 - 108	0 - 171
	ME	0		12	20
	MW	0		21	33
	KI	0 - 0		17 - 26	22 - 44
	SA	1		24	38
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW	0 - 10	0 - 28	0 - 67	
	ME	0	2	4	
	MW	0	4	10	
	KI	0 - 0	2 - 6	5 - 16	
	SA	1	6	16	

Tab. 9: Tabellarische Darstellung der Verteilung der atypischen violetten Punktsignale (N=Anzahl Probanden; RW=Reichweite; ME=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Die höchsten durchschnittlichen Mengen an atypischen Punktsignalen sind auch in diesem Fall in den beiden Malariagruppen zu finden, mit signifikant höheren Werten bei den komplizierten Malariafällen (AVPs: 33 vs. 21 AVPs bei Kindern [$p=0,026$], 10 AVPs bei Erwachsenen; AGPs: 15 vs. sechs AGPs bei

Kindern [$p < 0,001$], vier AGPs bei Erwachsenen; Scatterindex: 11,1 vs. 6,0 bei Kindern [$p = 0,025$], 3,4 bei Erwachsenen). Geringere Werte zeigt wiederum die Gruppe der asymptomatischen Parasitämie (vier AVPs, ein AGP respektive ein Scatterindex von 1,0), allerdings immer noch signifikant höher als bei gesunden Probanden ($p < 0,001$). Bei nicht malariakranken Probanden werden nur in wenigen Fällen und geringer Menge atypische Punktsignale nachgewiesen (null AVPs und AGPs bei Kindern und Erwachsenen, Scatterindizes von jeweils 0,0).

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Kinder (Geburt - 14. LJ)	N	216		101	51
	RW	0 - 2		0 - 37	0 - 68
	ME	0		3	10
	MW	0		6	15
	KI	0 - 0		5 - 8	11 - 19
	SA	0		8	14
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW	0 - 2	0 - 15	0 - 29	
	ME	0	0	1	
	MW	0	1	4	
	KI	0 - 0	0 - 1	2 - 6	
	SA	0	2	6	

Tab. 10: Tabellarische Darstellung der Verteilung der atypischen grünen Punktsignale (N=Anzahl Probanden; RW=Reichweite; ME=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Scatterindex			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Kinder (Geburt - 14. LJ)	N	216		101	51
	RW	0,0 - 1,9		0,0 - 35,2	0,0 - 82,2
	ME	0,0		3,1	5,1
	MW	0,0		6,0	11,1
	KI	0,0 - 0,0		4,6 - 7,5	6,5 - 15,7
	SA	0,1		7,4	16,4
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW	0,0 - 2,4	0,0 - 8,7	0,0 - 33,1	
	ME	0,0	0,4	0,7	
	MW	0,0	1,0	3,4	
	KI	0,0 - 0,1	0,5 - 1,4	1,1 - 5,7	
	SA	0,2	1,7	6,4	

Tab.11: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Scatterindizes (N=Anzahl der Probanden; RW=Reichweite; ME=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

3.3 Korrelationen

Korreliert wurden atypische violette bzw. grüne Punktsignale und hämozoinhaltige Monozyten bzw. neutrophile Granulozyten pro Mikroliter. Dazu wurden die mikroskopisch bestimmten prozentualen Anteile an pigmenthaltigen Leukozyten auf einen absoluten Wert hochgerechnet (Anzahl der hämozoinhaltigen Leukozyten pro Mikroliter).

3.3.1 Korrelation zwischen PCMs und AVPs

Die Korrelation zwischen PCMs und AVPs ergibt ein Spearman's Rho von 0,813 ($p < 0,001$).

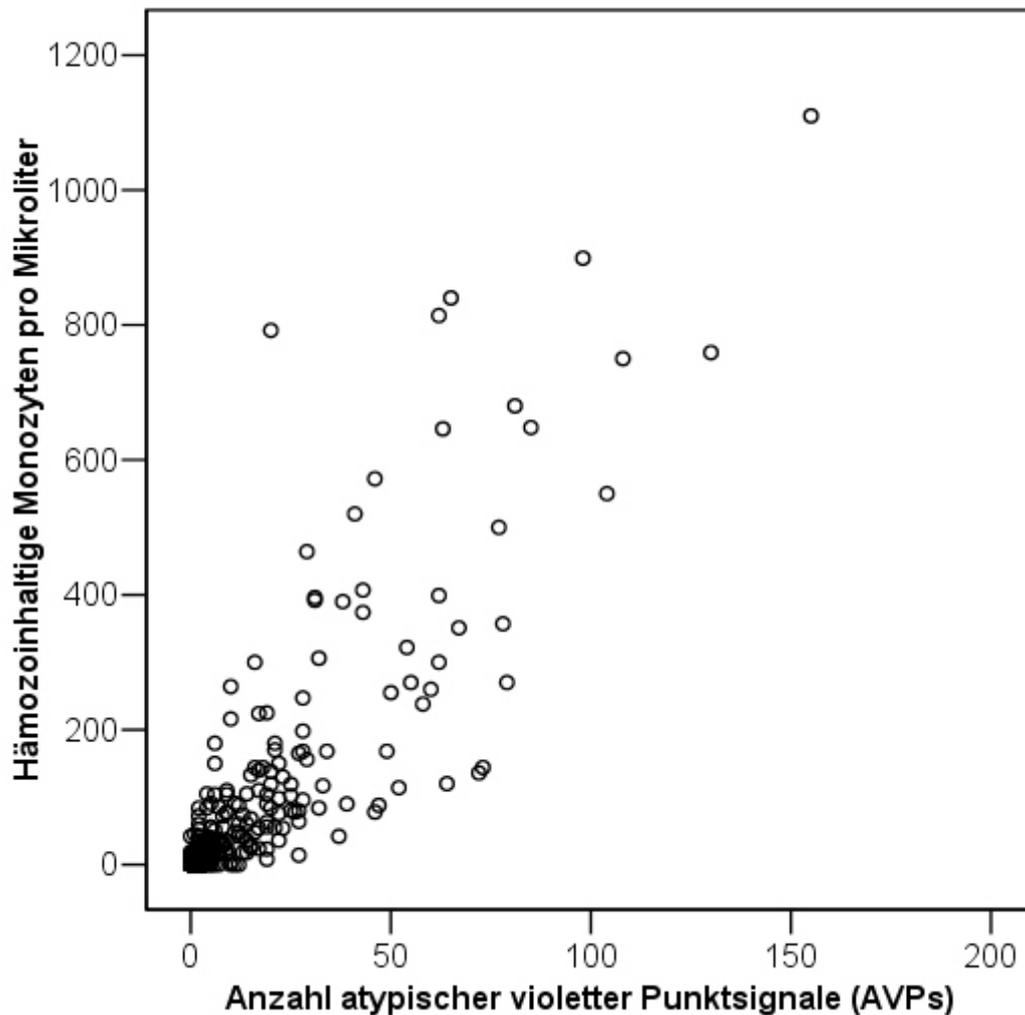


Abb. 17: Darstellung der Korrelation zwischen absoluter Anzahl hämozoinhaltiger Monozyten (pro Mikroliter) und atypischer violetter Punktsignale. Spearman´s Rho $r=0,813$ ($p<0,001$).

3.3.2 Korrelation zwischen PCNs und AGPs

Die Korrelation zwischen PCNs und AGPs ergibt ein Spearman's Rho von 0,635 ($p<0,001$).

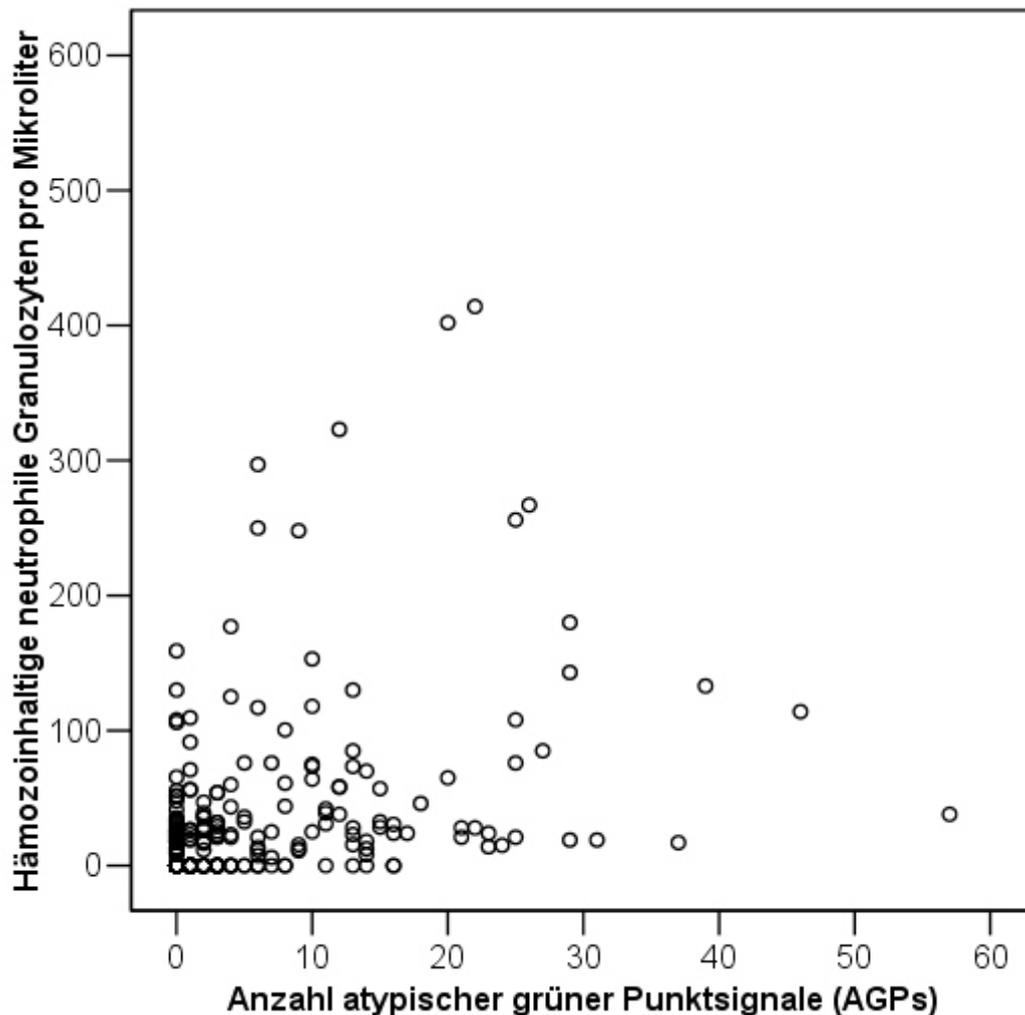


Abb. 18: Darstellung der Korrelation zwischen absoluter Anzahl hämozoinhaltiger neutrophiler Granulozyten (pro Mikroliter) und atypischer grüner Punktsignale. Spearman's Rho $r=0,635$ ($p<0,001$).

3.4 Vergleich zwischen Mikroskopie und Durchflusszytometrie

Für den Vergleich zwischen mikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelten Hämozoinbestimmung (PCMs/PCNs und AVPs/AGPs) wurden 688 von den 1.046 Patientenproben ausgewählt. Bei Ihnen waren neben den durchflusszytometrischen Analysen auch die Bestimmung der prozentualen Anteilen an pigmenthaltigen Leukozyten erfolgt. Die übrigen 358 Probanden wurden in diese Untersuchung nicht eingeschlossen.

3.4.1 Vergleich zwischen PCMs und AVPs

Von 668 Probanden hatten 205 sowohl mikroskopisch nachweisbare hämozoinhaltige Monozyten, als auch atypische violette Punktsignale. 359 wiesen weder PCMs noch AVPs auf. Bei 72 mikroskopisch negativen Probanden wurden AVPs nachgewiesen, 32 Probanden ohne AVPs hatten PCMs im Blut.

Diagnose		AVPs		Total
		nein	ja	
keine Malaria	PCMs nein	344	53	397
	ja	20	12	32
	Total	364	65	429
asympt. Parasit.	PCMs nein	12	10	22
	ja	2	31	33
	Total	14	41	55
unkompl. Malaria	PCMs nein	3	9	12
	ja	9	112	121
	Total	12	121	133
kompl. Malaria	PCMs nein	0	0	0
	ja	1	50	51
	Total	1	50	51

Tab. 12: PCMs innerhalb der einzelnen Diagnosen gegen AVPs aufgetragen. Blau markiert sind übereinstimmende Ergebnisse der Mikroskopie bzw. Durchflusszytometrie, rot die Anzahl der richtig identifizierten Probanden (bei asymptomatischer Parasitämie wurde auf diese Markierung verzichtet).

Diese Ergebnisse lassen sich noch weiter auf die Diagnosen aufteilen:

Keine Malaria: 344 Probanden hatten weder durchflusszytometrisch noch mikroskopisch nachweisbare pigmenthaltige Monozyten, in 12 Fällen wurden mit beiden Methoden hämozoinhaltige Monozyten nachgewiesen.

Darüber hinaus traten auf:

- PCM negativ/AVP positiv: 53 Probanden, die zwischen einem und sechs AVPs aufwiesen. Fünf dieser Probanden waren wegen Malaria behandelt worden. Bei elf der übrigen Probanden lagen die Punktsignale gerade noch über der Schwelle.
- PCM positiv/AVP negativ: 20 Probanden, die zwischen einem und zwei PCMs aufwiesen. Bei vier dieser Probanden waren violette Punktsignale (ein bis zwei Signale) direkt auf der Schwelle zu finden.

Asymptomatische Parasitämie: In 12 Fällen wurden sowohl vom Gerät als auch mikroskopisch keine pigmenthaltige Monozyten gefunden, bei 31 Probanden waren sie mit beiden Methoden nachweisbar.

Darüber hinaus traten auf:

- PCM negativ/AVP positiv: Zehn Probanden, die zwischen einem und sieben AVPs aufwiesen.
- PCM positiv/AVP negativ: Zwei Probanden, die zwischen einem und zwei PCMs aufwiesen. Bei einem dieser Probanden war ein violettes Punktsignal direkt auf der Schwelle zu finden.

Unkomplizierte Malaria: 112 Probanden hatten nachweisbare hämozoinhaltige Monozyten und atypische violette Punktsignale. In drei Fällen konnten weder durchflusszytometrisch noch mikroskopisch pigmenthaltige Monozyten gefunden werden. Darüber hinaus traten auf:

- PCM negativ/AVP positiv: Neun Probanden, die zwischen einem und 12 AVPs aufwiesen. Bei einem der Probanden lagen die Punktsignale gerade noch über der Schwelle.
- PCM positiv/AVP negativ: Neun Probanden, die zwischen einem und zwei PCMs aufwiesen. Bei sieben dieser Probanden waren violette Punktsignale (ein bis drei Signale) direkt auf der Schwelle zu finden.

Komplizierte Malaria: In 50 Fällen wurden mit beiden Methoden pigmenthaltige Monozyten nachgewiesen.

Darüber hinaus traten auf:

- PCM negativ/AVP positiv: Kein Proband.
- AVP negativ/PCM positiv: Ein Proband, der fünf PCMs aufwies.

Tabelle 13 zeigt die relativen Anteile der positiven Hämozoinnachweise bei Probanden ohne, mit unkomplizierter und komplizierter Malaria.

Diagnosen	Positiver Hämozoinnachweis (in %)	
	Mikroskopie	Durchflusszytometrie
keine Malaria	7,5	15,2
unkompl. Malaria	91,0	91,0
kompl. Malaria	100,0	98,0

Tab. 13: relative Frequenzen der positiven Hämozoinnachweise durch Mikroskopie (PCMs) bzw. Durchflusszytometrie (AVPs)

Es fällt auf, dass bei malariakranke Patienten (komplizierte und unkomplizierte Malaria) durch die Mikroskopie und Durchflusszytometrie in ähnlich hohen Anteilen pigmenthaltige Monozyten nachgewiesen werden können (relative Frequenzen positiven Hämozoinnachweises bei unkomplizierter Malaria 91% sowohl bei mikroskopischer als auch durchflusszytometrischer Auswertung, bei komplizierter Malaria 100%, respektive 98%). Bei den neun unkomplizierten Malariafällen, die keine AVPs zeigten, waren bei sieben Probanden violette Punktsignale nachgewiesen worden, die allerdings auf der Schwelle lagen und so nicht als atypisch gewertet wurden.

Bei atypischen Parasitämien erbrachte die Analyse mit der Cell-Dyn 3000® häufiger einen positiven Hämozoinnachweis als die Mikroskopie. In 41 von 55 Fällen von asymptomatischer Parasitämie wurden AVPs detektiert,

mikroskopisch nachweisbare Hämozoineinschlüsse wurden nur in 33 Fällen gefunden.

Der größte Unterschied ist bei den nicht malariakranken Probanden zu vermerken: die Cell-Dyn 3000® detektierte hämozoinhaltige Monozyten bei 33 Patienten mehr als die Mikroskopie (relative Frequenzen: 7,5% mikroskopisch und 15,2% flusszytometrisch positiver Hämozoinnachweis).

3.4.2 Vergleich zwischen PCNs und AGPs

Von 668 Probanden hatten 111 sowohl mikroskopisch nachweisbare hämozoinhaltige Neutrophile als auch atypische grüne Punktsignale. 453 wiesen weder PCNs noch AGPs auf. Bei 65 mikroskopisch negativen Probanden wurden AGPs nachgewiesen, 39 Probanden ohne AGPs hatten PCNs im Blut.

Diese Ergebnisse lassen sich noch weiter auf die Diagnosen aufteilen:

Keine Malaria: 396 Probanden hatten weder durchflusszytometrisch noch mikroskopisch nachweisbare pigmenthaltige Monozyten, in einem Fall wurden mit beiden Methoden hämozoinhaltige Monozyten nachgewiesen.

Darüber hinaus traten auf:

- PCN negativ/AGP positiv: 16 Probanden, die zwischen einem und zwei AGPs aufwiesen. Zwei dieser Probanden waren wegen Malaria behandelt worden. Bei sieben der übrigen Probanden lag eine Eosinophilie vor. In acht Fällen waren die AGPs außerdem in unmittelbarer Nähe der Schwelle.
- PCN positiv/AGP negativ: 16 Probanden, die zwischen 0,5 und zwei PCNs aufwiesen. Bei vier der übrigen Probanden waren ein bis zwei grüne Punktsignale nahe des Analysebereichs zu finden.

Asymptomatische Parasitämie: In 37 Fällen wurden sowohl vom Gerät als auch mikroskopisch keine pigmenthaltige Monozyten gefunden, bei sieben Probanden waren sie mit beiden Methoden nachweisbar.

Darüber hinaus traten auf:

- PCN negativ/AGP positiv: vier Probanden, die je ein AGP aufwiesen. In einem Fall waren die AGPs in unmittelbarer Nähe der Schwelle.
- PCN positiv/AGP negativ: sieben Probanden, die zwischen 0,5 und einem PCN aufwiesen. Bei zwei Probanden waren grüne Punktsignale (ein bzw. fünf Signale) nahe des Analysebereichs zu finden.

Unkomplizierte Malaria: 58 Probanden hatten nachweisbare hämoglobinhaltige Monozyten und atypische violette Punktsignale. In 19 Fällen konnten weder durchflusszytometrisch noch mikroskopisch pigmenthaltige Monozyten gefunden werden. Darüber hinaus traten auf:

- PCN negativ/AGP positiv: 41 Probanden, die zwischen einem und 16 AGPs aufwiesen. In zwei Fällen waren die AGPs außerdem in unmittelbarer Nähe der Schwelle.
- PCN positiv/AGP negativ: 15 Probanden, die zwischen 0,5 und einem PCN aufwiesen. Bei fünf dieser Probanden waren zwischen einem und vier grüne Punktsignale nahe des Analysebereichs zu finden.

Komplizierte Malaria: In 45 Fällen wurden mit beiden Methoden pigmenthaltige Monozyten nachgewiesen. Ein Proband hatte weder durchflusszytometrisch noch mikroskopisch nachweisbare pigmenthaltige Monozyten.

Darüber hinaus traten auf:

- PCN negativ/AGP positiv: Vier Probanden, die zwischen einem und 16 AGPs aufwiesen.
- PCN positiv/AGP negativ: Ein Proband, der 0,5 PCNs aufwies.

Diagnose			AGPs		Total
			nein	ja	
keine Malaria	PCNs	nein	396	16	412
		ja	16	1	17
	Total		412	17	429
asympt. Parasit.	PCNs	nein	37	4	41
		ja	7	7	14
	Total		44	11	55
unkompl. Malaria	PCNs	nein	19	41	60
		ja	15	58	73
	Total		34	99	133
kompl. Malaria	PCNs	nein	1	4	5
		ja	1	45	46
	Total		2	49	51

Tab. 14: PCNs innerhalb der einzelnen Diagnosen gegen AGPs aufgetragen. Blau markiert sind übereinstimmende Ergebnisse der Mikroskopie bzw. Durchflusszytometrie, rot die Anzahl der richtig identifizierten Probanden (bei asymptomatischer Parasitämie wurde auf diese Markierung verzichtet).

Diagnosen	Positiver Hämozoinnachweis (in %)	
	Mikroskopie	Durchflusszytometrie
keine Malaria	4,0	4,0
unkompl. Malaria	54,9	74,4
kompl. Malaria	90,2	96,1

Tab. 15: relative Frequenzen der positiven Hämozoinnachweise durch Mikroskopie (PCNs) bzw. Durchflusszytometrie (AGPs)

Tabelle 15 zeigt die relativen Anteile der positiven Hämozoinnachweise bei Probanden ohne, mit unkomplizierter und komplizierter Malaria.

Der Nachweis von pigmenthaltigen Neutrophilen bei Patienten mit unkomplizierter Malaria gelingt deutlich besser durch durchflusszytometrische als durch mikroskopische Untersuchung (relative Frequenzen positiven Hämozoinnachweises bei unkomplizierter Malaria: 74,4% respektive 54,9%). Bei komplizierter Malaria sind die Unterschiede nur sehr gering (96,1%, respektive 90,2%).

Im Unterschied zu hämozoinhaltigen Monozyten konnten hämozoinhaltige Neutrophile bei asymptomatischer Parasitämie nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden (AGPs: vier von 55 Fällen, PCNs: sieben von 55 Fällen). Nicht malariakranke Probanden zeigten in 396 von 429 Fällen weder mikroskopische noch durchflusszytometrische Anzeichen von Neutrophilen mit Hämozoineinschlüssen. In je 16 Fällen konnten jedoch entweder AGPs oder PCNs nachgewiesen werden.

3.5 Sensitivität und Spezifität der Cell-Dyn 3000® für akute Malaria

Im folgenden soll geprüft werden, ob der positive Nachweis von atypischen Punktsignalen als diagnostischer Test für eine Malariainfektion herangezogen werden kann.

Die Sensitivität und Spezifität der Cell-Dyn 3000® wurde getrennt für 368 Kinder (Geburt bis zur Vollendung des 14. Lebensjahres) und 678 Erwachsene (ab 15. Lebensjahr) berechnet. Unkomplizierte Malaria und komplizierte Malaria wurden zu „akuter Malaria“ zusammengefasst, in den Tabellen aber nochmals getrennt aufgezeigt. Die Gruppe „keine akute Malaria“ beinhaltet Probanden, die nicht an Malaria erkrankt waren oder eine asymptomatische Parasitämie zeigten. Letztere wurde in den Tabellen ebenfalls getrennt dargestellt.

3.5.1 Sensitivität und Spezifität bei Kindern

3.5.1.1 AVPs vs. akute Malaria

Sensitivität und Spezifität in der Gruppe der Probanden bis einschließlich 14. Lebensjahr betragen jeweils 95,4%, positiver und negativer Vorhersagewert sind 94,6% und 96,7%.

Von 216 nicht malariakranken Probanden zeigten nur zehn atypische violette Punktsignale. Die Gruppe dieser zehn falsch positiven Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- Ein Proband hatte sechs Wochen zuvor eine akute Malaria und wurde behandelt. Im Blut wurden keine Parasiten mehr nachgewiesen, allerdings noch geringe Mengen von hämozoinhaltigen Monozyten. 12 AVPs konnten im Scattergramm nachgewiesen werden.
- Ein weiterer Proband zeigte fünf AVPs; außer Fieber konnten bei ihm keine Zeichen einer abgelaufenen oder akuten Malaria festgestellt werden, ebenso wenig Parasiten oder hämozoinhaltige Monozyten.
- Die übrigen acht Probanden waren gesund. Sie präsentierten nur geringe Mengen von AVPs (ein bis zwei AVPs), die außerdem in der Nähe der Unterscheidungsschwelle lagen.

Bei sieben von 152 Probanden mit akuter Malaria konnten keine atypischen violetten Punktsignale nachgewiesen werden, von denen nur einer eine komplizierte Malaria aufwies. Auffallend ist, dass die falsch negativen Probanden häufiger bei unkomplizierter Malaria (sechs von 101) als bei komplizierter Malaria (einer von 51) auftreten.

Die Gruppe dieser sieben falsch negativen Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- ein Proband mit komplizierter Malaria, bei dem keinerlei AVPs nachgewiesen werden konnten, obwohl hämozoinhaltige Monozyten im Blut zu finden waren (fünf Prozent);

- vier Patienten mit unkomplizierter Malaria mit Nachweis von ein bis drei violetten Punktsignalen auf der Schwelle und ein bis zwei Prozent hämozoinhaltigen Monozyten im peripheren Blut;
- zwei Patienten mit unkomplizierter Malaria, bei denen weder AVPs noch hämozoinhaltige Monozyten nachgewiesen werden konnten.

Diagnose	AVPs		Total
	nein	ja	
keine akute Malaria	206	10	216
akute Malaria	7	145	152
- <i>unkompl. Malaria</i>	6	95	101
- <i>kompl. Malaria</i>	1	50	51
Total	213	155	368

Tab. 16: AVPs gegen akute Malaria für Kinder

3.5.1.2 AGPs vs. akute Malaria

Sensitivität und Spezifität in der Gruppe der Probanden bis einschließlich 14. Lebensjahr betragen 82,9% bzw. 96,3%; positiver und negativer Vorhersagewert sind 94,3% und 88,9%.

Von 216 nicht malariakranken Probanden zeigten nur acht atypische grüne Punktsignale. Die Gruppe dieser acht falsch positiven Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- Ein Proband hatte sechs Wochen zuvor eine akute Malaria und war behandelt worden. Im Blut wurden keine Parasiten mehr nachgewiesen, auch keine hämozoinhaltigen Neutrophilen. Ein AGP konnte im Scattergramm nachgewiesen werden.
- Drei Patienten waren erkrankt (unklares Fieber, URTI), es konnten aber keine klinischen oder mikroskopischen Zeichen einer Malariainfektion gefunden werden. Jeweils ein AGP wurde gefunden.

- Vier weitere Patienten waren gesund. Sie präsentierten ebenfalls geringe Mengen von AGPs (ein bis zwei AGPs), allerdings keine hämozoinhaltigen Neutrophilen.

Bei 26 von 152 Probanden mit akuter Malaria konnten keine grünen Punktsignale nachgewiesen werden. Auffallend ist, dass auch hier die falsch negativen Probanden häufiger bei unkomplizierter Malaria (24 von 101) als bei komplizierter Malaria (zwei von 51) auftreten.

Die Gruppe dieser sieben falsch negativen Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- elf Patienten mit Malaria (zehn unkomplizierte, ein komplizierter Fall), bei denen mikroskopisch geringe Mengen von Hämozoin in Neutrophilen nachgewiesen werden konnte (0,5 bis ein Prozent);
- 13 Patienten mit Malaria (12 unkomplizierte, ein komplizierter Fall), bei denen mikroskopisch keine hämozoinhaltigen Neutrophilen gefunden wurden.

Diagnose	AGPs		Total
	nein	ja	
keine akute Malaria	208	8	216
akute Malaria	26	126	152
- <i>unkompl. Malaria</i>	24	77	101
- <i>kompl. Malaria</i>	2	49	51
Total	234	134	368

Tab. 17: AGPs gegen akute Malaria für Kinder

3.5.2 Sensitivität und Spezifität bei Erwachsenen

3.5.2.1 AVPs vs. akute Malaria

Sensitivität und Spezifität in der Gruppe der erwachsenen Probanden betragen 81,3% bzw. 83,6%; positiver und negativer Vorhersagewert sind 19,7% und

98,9%. Die Anzahl der falsch positiven und negativen ist mehr als dreimal so hoch wie bei den Kindern.

Im Unterschied zu den jüngeren existiert bei den älteren Probanden eine große Gruppe von Patienten mit asymptomatischer Parasitämie, die nicht zur akuten Malaria gezählt wurden. Malariapatienten präsentieren ausschließlich unkomplizierte Malaria.

Von 646 nicht malariakranken Probanden zeigten 106 atypische violette Punktsignale. Die Gruppe dieser 106 falsch positiven Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- 12 Probanden waren in den vergangenen sechs Wochen an Malaria erkrankt und behandelt worden. Bei ihnen konnten zwischen einem und zehn AVPs nachgewiesen werden. Sieben dieser Probanden hatten nachweisbare Mengen von hämozoinhaltigen Monozyten im Blut (ein bis fünf Prozent).
- 41 Probanden präsentierten eine asymptomatische Parasitämie bei Untersuchung. Die Anzahl der AVPs schwankten zwischen einem und 28 Signalen. 31 dieser Probanden hatten nachweisbare Mengen von hämozoinhaltigen Monozyten im Blut (ein bis acht Prozent).
- In fünf Fällen war innerhalb vier Wochen vor (drei Fälle) bzw. danach (zwei Fälle) eine asymptomatische Parasitämie aufgetreten. Zwischen einem und zwei AVPs traten auf, nur ein Patient hatte hämozoinhaltige Monozyten im Blut (zwei Prozent).
- In 14 Fällen traten unspezifische Zeichen auf, die auf eine Malariainfektion hinweisen könnten (Thrombozytämie [$<140.000/\mu\text{l}$], ausgeprägte Anämie [$\text{Hb} < 8 \text{ mg/dl}$], Fieberepisoden mit Erbrechen, Kopfschmerzen). Bei diesen Probanden konnten zwischen einem und vier AVPs nachgewiesen werden; nur bei einem wurden hämozoinhaltige Monozyten entdeckt (zwei Prozent).
- 34 Probanden waren gesund, sie hatten zwischen einem und vier AVPs. Nur bei drei konnten hämozoinhaltige Monozyten im Blut gefunden

werden (ein bis zwei Prozent). Bei neun dieser Probanden befanden sich die AVPs in unmittelbarer Nähe zur Unterscheidungsschwelle.

Bei sechs von 32 Probanden mit akuter Malaria konnten keine atypischen violetten Punktsignale nachgewiesen werden. Die Gruppe dieser sechs falsch negativen Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- zwei Probanden mit unkomplizierter Malaria, bei denen keinerlei AVPs nachgewiesen werden konnten, obwohl hämozoinhaltige Monozyten im Blut zu finden waren (ein bzw. zwei Prozent);
- drei Patienten mit unkomplizierter Malaria mit Nachweis von mit je einem violetten Punktsignal auf der Schwelle und hämozoinhaltigen Monozyten im peripheren Blut (ein bis zwei Prozent);
- ein Patient mit unkomplizierter Malaria, bei dem weder AVPs noch hämozoinhaltige Monozyten nachgewiesen werden konnten.

Diagnose	AVPs		Total
	nein	ja	
keine akute Malaria	540	106	646
-asympt. Parasit.	14	41	55
akute Malaria	6	26	32
-unkompl. Malaria	6	26	32
Total	546	132	678

Tab. 18: AVPs gegen akute Malaria für Erwachsene

3.5.2.2 AGPs vs. akute Malaria

Sensitivität und Spezifität in der Gruppe der erwachsenen Probanden betragen 68,8% bzw. 95,2%; positiver und negativer Vorhersagewert sind 41,5% und 98,4%.

Von 646 nicht malariakranken Probanden zeigten 31 atypische grüne Punktsignale. Die Gruppe dieser 31 falsch positiven Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- Ein Proband hatte einige Tage zuvor eine akute Malaria und war behandelt worden. Im Blut wurden keine Parasiten mehr nachgewiesen, auch keine hämozoinhaltigen Neutrophilen. Zwei AGP konnten im Scattergramm nachgewiesen werden.
- Elf Probanden präsentierten eine asymptomatische Parasitämie mit zwischen einem und 17 AGPs. Bei sieben konnten hämozoinhaltige Neutrophile nachgewiesen werden (0,5 bis ein Prozent).
- In acht Fällen traten unspezifische Zeichen auf, die auf eine Malariainfektion hinweisen könnten (Thrombozytämie [$<140.000/\mu\text{l}$], ausgeprägte Anämie [$\text{Hb} <8\text{mg/dl}$]). Bei diesen Probanden konnten zwischen einem und zwei AGPs nachgewiesen werden; allerdings wurden bei keinem dieser Probanden hämozoinhaltige Neutrophile entdeckt.
- Elf weitere Patienten waren gesund. Sie präsentierten ebenfalls geringe Mengen von AGPs (ein bis zwei AGPs), allerdings keine hämozoinhaltigen Neutrophilen.

Von 32 malariakranken Probanden zeigten zehn keine atypischen grünen Punktsignale. Die Gruppe dieser elf falsch negativen Ergebnisse teilt sich wie folgt auf:

- fünf Patienten mit unkomplizierter Malaria, bei denen mikroskopisch geringe Mengen von Hämozoin in Neutrophilen nachgewiesen werden konnte (0,5 Prozent);
- fünf Patienten mit unkomplizierter Malaria, bei denen mikroskopisch keine hämozoinhaltigen Neutrophilen gefunden wurden.

Diagnose	AGPs		Total
	nein	ja	
keine akute Malaria	615	31	646
-asympt. Parasit.	44	11	55
akute Malaria	10	22	32
-unkompl. Malaria	10	22	32
Total	625	53	678

Tab. 19: AGPs gegen akute Malaria für Erwachsene

3.6 Untersuchungen zur Prognoseerhebung durch die Cell-Dyn 3000®

In der Altersgruppe der Kinder (Geburt bis vollendetes 14. Lebensjahr) wurden die Unterschiede zwischen unkomplizierter und komplizierter Malaria näher beleuchtet. Insbesondere wurde untersucht, ob anhand der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Ergebnisse eine automatische Klassifikation der Malaria in kompliziert und unkompliziert möglich ist.

Verglichen wurde die Anzahl der AVPs, der AGPs und der Höhe des Scatterindizes im 90°/90°depol-Scatterplot der Cell-Dyn 3000® bei unkomplizierter und komplizierter Malaria.

3.6.1 AVPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria

Das arithmetische Mittel beträgt in der Gruppe der unkomplizierten bzw. komplizierten Malariafälle 21 respektive 33 (Konfidenzintervalle: 17 – 26 respektive 22 – 44). Der Unterschied ist signifikant mit $p=0,026$ (*).

	unkompl. Malaria	Signifikanz	kompl. Malaria
Anzahl N	101		51
Reichweite	0 - 108		0 - 171
Median	12	p=0,026	20
arithm. Mittelwert	21		33
[Konfidenzintervall]	17 - 26		22 - 44
Standardabweichung	24		38

Tab. 20: Tabellarische Darstellung der Verteilung von AVPs bei Kindern mit unkomplizierter und komplizierter Malaria (Unterschied signifikant mit $p=0,026$)

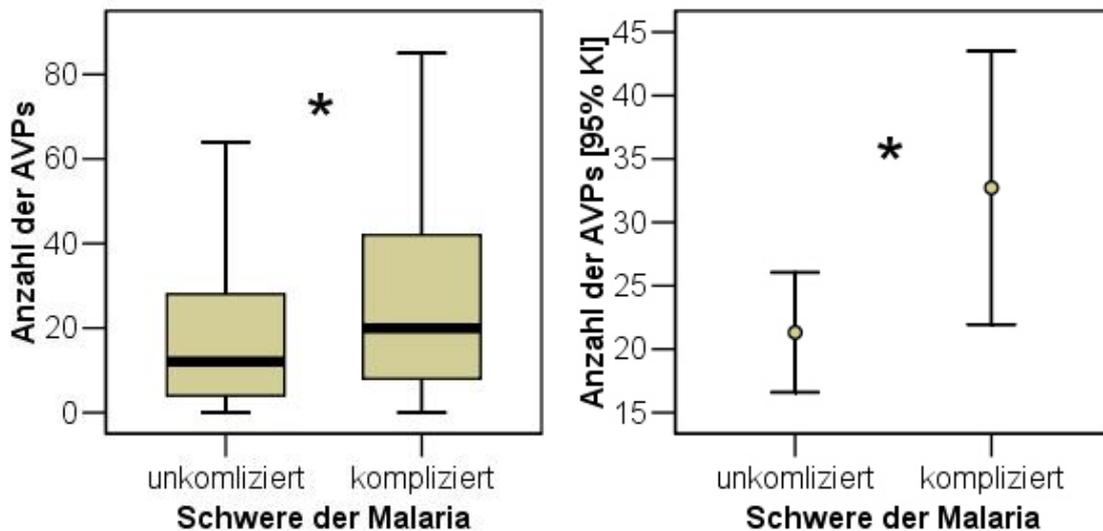


Abb. 19: Boxplot (li.) und Error-Bar-Diagramm (re.). Diagnosen auf der Abszisse, Anzahl der AVPs auf der Ordinate aufgetragen. Boxplot: 5%-, 25%-, 50%-, 75%- und 95%-Perzentilen; Error-Bar-Diagramm: Arithmetische Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle ($p=0,026$ [*]).

3.6.2 AGPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria

Das arithmetische Mittel beträgt in der Gruppe der unkomplizierten bzw. komplizierten Malariafälle 6 respektive 15 (Konfidenzintervalle: 5 – 8 respektive 11 – 19). Der Unterschied ist signifikant mit $p<0,001$ (*).

	unkompl. Malaria	Signifikanz	kompl. Malaria
Anzahl N	101		51
Reichweite	0 - 37		0 - 68
Median	3	p<0,001	10
arithm. Mittelwert	6		15
[Konfidenzintervall]	5 - 8		11 - 19
Standardabweichung	8		14

Tab. 21: Tabellarische Darstellung der Verteilung von AVPs bei Kindern mit unkomplizierter und komplizierter Malaria (Unterschied signifikant mit $p<0,001$)

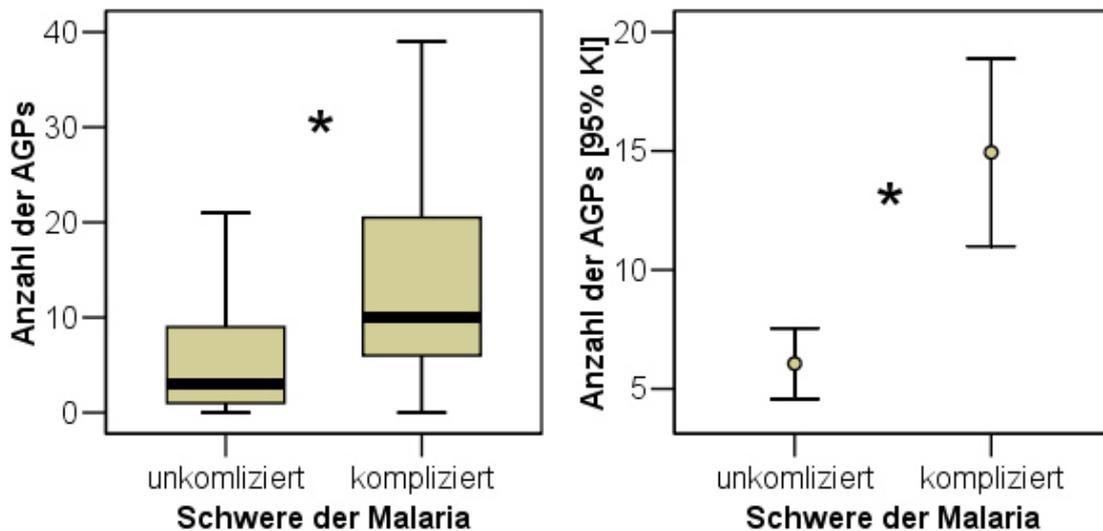


Abb. 20: Boxplot (li.) und Error-Bar-Diagramm (re.). Diagnosen auf der Abszisse, Anzahl der AGPs auf der Ordinate aufgetragen. Boxplot: 5%-, 25%-, 50%-, 75%- und 95%-Perzentilen; Error-Bar-Diagramm: Arithmetische Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle ($p<0,001$ [*]).

3.6.3 Scatterindizes bei unkomplizierter und komplizierter Malaria

Verglichen wurde die Scatterindizes im 90°/90°depol-Scatterplot der Cell-Dyn 3000®.

Das arithmetische Mittel beträgt in der Gruppe der unkomplizierten bzw. komplizierten Malariafälle 6,0 respektive 11,1 (Konfidenzintervalle: 4,6 – 7,5 respektive 6,5 – 15,7). Der Unterschied ist signifikant mit $p=0,025$ (*).

	unkompl. Malaria	Signifikanz	kompl. Malaria
Anzahl N	101		51
Reichweite	0,0 - 35,2		0,0 - 82,2
Median	3,1	P=0,025	5,1
arithm. Mittelwert	6,0		11,1
[Konfidenzintervall]	4,6 - 7,5		6,5 - 15,7
Standardabweichung	7,4		16,4

Tab. 22: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Scatterindizes bei Kindern mit unkomplizierter und komplizierter Malaria (Unterschied signifikant mit $p=0,025$)

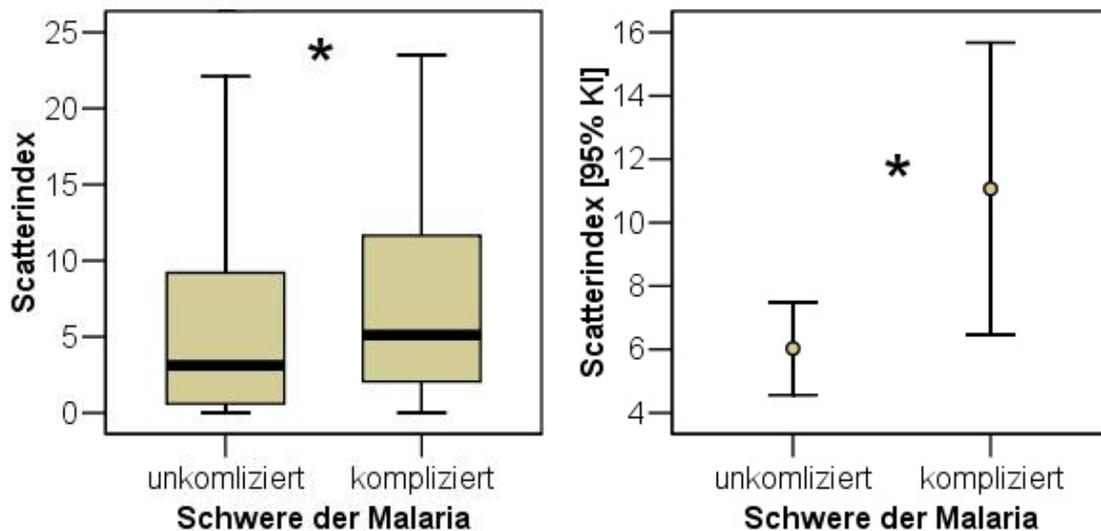


Abb. 21: Boxplot (li.) und Error-Bar-Diagramm (re.). Diagnosen auf der Abszisse, Höhe des Scatterindizes auf der Ordinate aufgetragen. Boxplot: 5%-, 25%-, 50%-, 75%- und 95%-Perzentilen; Error-Bar-Diagramm: Arithmetische Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle ($p=0,025$ [*]) .

3.6.4 ROC-Kurven für komplizierte Malaria

Zur Bestimmung der Testgüte von AVPs, AGPs und Scatterindex zum Nachweis von komplizierter Malaria wurden Receiver-Operating-Characteristics-Kurven (ROC-Kurven) bestimmt. Die Fläche unter der Kurve beträgt für AVPs 0,610, für AGPs 0,756 und für den Scatterindex 0,612.

Die gefundenen Werte für atypische violette Punktsignale und Scatterindex sind als schlecht zu beurteilen, das Ergebnis für atypische grüne Punktsignale als befriedigend.

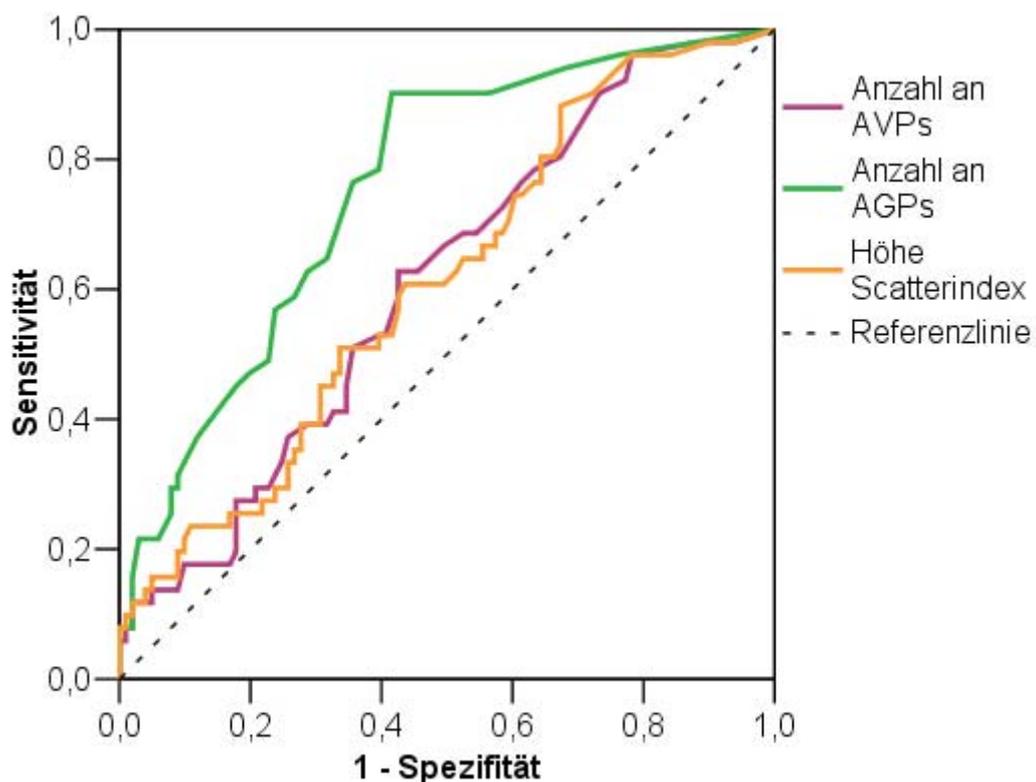


Abb. 22: ROC-Kurve für atypische Punktsignale und Scatterindex. Die Fläche unter der Kurve beträgt 0,610 (AVPs), 0,756 (AGPs) bzw. 0,612 (Scatterindex).

Cut-Off-Schwellen wurden für die einzelnen Testvariablen bestimmt und deren Sensitivität und Spezifität dargestellt. Ein Test gilt als positiv für komplizierte Malaria, wenn der Wert der Schwelle erreicht oder überschritten wird.

Cut-Off	Sensitivität	Spezifität
1	0,98	0,06
3	0,96	0,22
5	0,90	0,27
7	0,78	0,37
10	0,71	0,44
15	0,63	0,54
20	0,51	0,64
30	0,31	0,76
50	0,18	0,85
100	0,08	0,98

Tab. 23: Sensitivität und Spezifität für verschiedene Schwellen bei AVPs

Cut-Off	Sensitivität	Spezifität
1	0,96	0,24
2	0,94	0,32
3	0,90	0,44
5	0,78	0,60
7	0,65	0,68
10	0,57	0,76
15	0,37	0,88
20	0,29	0,92
30	0,08	0,98
50	0,06	1,00

Tab. 24: Sensitivität und Spezifität für verschiedene Schwellen bei AGPs

Cut-Off	Sensitivität	Spezifität
0,1	0,98	0,06
0,5	0,96	0,18
0,7	0,92	0,26
1,0	0,82	0,33
2,0	0,75	0,37
3,0	0,65	0,47
5,0	0,51	0,66
10,0	0,29	0,77
20,0	0,16	0,94
30,0	0,10	0,98

Tab. 25: Sensitivität und Spezifität für verschiedene Schwellen des Scatterindex

4 Diskussion

4.1 Demographische Daten

Es fällt auf, dass die Altersgruppe der Erwachsenen zahlenmäßig am stärksten vertreten ist. Auffallend ist ebenfalls der ausgeprägte Geschlechterbias: während bei den Probanden bis zum vollendeten 14. Lebensjahr die beiden Geschlechter ungefähr gleichmäßig vertreten sind, besteht die Gruppe der Erwachsenen nur aus Frauen. Hinzu kommt, dass diese Frauen ohne Ausnahme schwanger waren.

Auch bei der Diagnosenverteilung fällt der Geschlechterbias ins Auge: Der Hauptteil der nicht malariakranken Probanden sind Frauen, ebenfalls der Probanden mit asymptomatischer Parasitämie. In der Gruppe der unkomplizierten Malariaerkrankten ist dieser Unterschied schon geringer, aber immer noch sichtbar. Nur die Gruppe der Probanden mit komplizierter Malaria scheint gleich verteilt zu sein.

Diese großen Unterschiede sind durch die Auswahl der Studienpopulation bedingt, da nur bereits in andere Studien eingeschlossene Probanden in die vorliegende Studie aufgenommen wurden.

Insbesondere Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnungen müssen so mit Vorsicht bedacht werden: Zwar wurden innerhalb des Studienzeitraumes alle Probanden, welche die Einschlusskriterien erfüllten, in die Studie aufgenommen. Dadurch wurden aber unrepräsentativ viele malariakranke Probanden ausgewählt. Ein großer Teil der sogenannten nicht malariakranken Probanden ist außerdem keineswegs gesund, sondern anderweitig erkrankt. Die Studienpopulation stellt einen Querschnitt durch diejenige Patientenpopulation dar, die im Forschungslabor an Studien teilgenommen hat, somit sind die Ergebnisse nur bedingt repräsentativ für die Gesamtbevölkerung.

4.2 Ergebnisse von Mikroskopie und Cell-Dyn 3000®

4.2.1 Hämozoinhaltige Leukozyten (PCMs und PCNs)

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass im Blut von gesunden, asymptomatischen und an unkomplizierter bzw. komplizierter Malaria erkrankter Probanden signifikant verschiedene Mengen von hämozoinhaltigen Leukozyten nachweisbar sind, auch die Unterschiede zwischen unkomplizierter und komplizierter Malaria sind signifikant (jeweils $P < 0,001$). In verschiedenen früheren Studien zur Hämozoinbeladung von phagozytierenden Leukozyten wurden die Konzentrationen von intrazellulärem Pigment untersucht: Metzger et al. bestimmten 1995 in Lambaréné, Gabun, die intraleukozytären Hämozoinkonzentrationen bei Kindern mit komplizierter und unkomplizierter Malaria und bei Erwachsenen mit unkomplizierter Malaria (72). Die damaligen Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie (Mittelwerte PCMs: 24%, 7% bzw. 1% vs. 17,8%, 9,5% bzw. 4,8%; Mittelwerte PCNs: 2%, 0% bzw. 0% vs. 2,3%, 0,5% bzw. 0,3% in den genannten Gruppen). Die Ergebnisse von Amodu et al. (1998) waren dagegen weitaus höher (PCNs: 27,0%, 9,0%, 6,5%, 2,0% respektive für zerebrale, unkomplizierte Malaria, asymptomatische Parasitämie und gesunde Probanden) (2). Auch Lyke et al. hatten 2003 dargestellt, dass bei komplizierter Malaria weitaus mehr hämozoinhaltige Monozyten und Neutrophile nachzuweisen sind (66). In der Gesamtheit der Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse dieser Untersuchung die bereits mehrfach bestimmten Werte. Es ist weiterhin festzuhalten, dass die Menge der hämozoinhaltigen Leukozyten mit der Schwere der Infektion zunimmt.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass auch bei nicht malariakranken Probanden zu einem gewissen Teil intraleukozytäres Hämozoin nachweisbar war. Auf dieses Phänomen wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

4.2.2 Atypische Punktsignale (AVPs und AGPs)

Sowohl atypische violette, als auch grüne Punktsignale treten in den verschiedenen Diagnosegruppen in signifikant unterschiedlichen Mengen auf ($P < 0,001$). Ähnlich wie bei den hämozoinhaltigen Monozyten besteht ein Zusammenhang zwischen Schwere der Infektion und Anzahl der Signale. Nicht malariakranke Probanden zeigen kaum nachweisbare Mengen von atypischen violetten Bildpunkten, Probanden mit asymptomatischer Parasitämie schon deutlich mehr. Patienten mit akuter Malaria präsentieren hohe Mengen an Signalen, wobei die Konzentrationen bei komplizierter Malaria deutlich am höchsten ist. Der Zusammenhang zwischen mikroskopisch nachweisbaren intraleukozytären Einschlüssen und atypischen Punktsignalen ist nicht verwunderlich. Frühere Studien zeigten bereits, dass hämozoinhaltige Monozyten von der Cell-Dyn 3000[®] als eben solche violette Bildpunkte dargestellt werden (40;46;47;49;59). Dennoch wurden die oben genannten Unterschiede bisher in keiner Untersuchung beschrieben.

Insbesondere die Untersuchung der atypischen grünen Punktsignale war bisher nur unzureichend möglich. Frühere Studien versuchten bereits einen Zusammenhang zwischen den mikroskopisch nachgewiesenen hämozoinhaltigen Neutrophilen und den durch die Cell-Dyn 3000[®] dargestellten Bildpunkten herzustellen (40;46;47;49;59). Diese Versuche scheiterten in der Vergangenheit, da sich hämozoinhaltige Neutrophile als verstreute Wolke falsch klassifizierter Eosinophiler darstellen, die sich mit der Gruppe der echten Eosinophilen vermischt (59). In der vorliegenden Studie konnte nun erstmals durch die Abgrenzung eines konstanten Bereichs oberhalb der typischen Eosinophilenwolke ein Bereich für atypisch verteilte Punktsignale geschaffen werden, welche die Bedingungen für hämozoinhaltige Neutrophile erfüllen. Dadurch werden weitere Möglichkeiten zum Malarianachweis und der Prognostik eröffnet.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass – ähnlich wie bei den mikroskopischen Ergebnissen – auch bei nicht malariakranken Probanden zu einem gewissen

Teil atypische Punktsignale nachweisbar waren. Auf dieses Phänomen wird ebenfalls in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

4.2.3 Scatterindex

Die Blutanalysen von Patienten mit Malaria zeigten im Gegensatz zu den nichtmalariakranken Probanden, bei denen höchstens einige Punkte nahe der Schwelle zu finden sind, oftmals eine sehr große Wolke von atypischen violetten Punktsignalen, die teilweise vor allem entlang der Ordinate sehr hoch streuen. Die Höhe der Verteilung der atypischen violetten Punktsignale ist von der Beladung der einzelnen Monozyten mit Hämazoin abhängig – je mehr Hämazoin phagozytiert wurde, desto stärker depolarisiert der Monozyt Laserlicht. Auf dieser Beobachtung beruht der Scatterindex, der durch stärkere Gewichtung der höher liegenden Punktsignale das Ausmaß und die Größe der Streuung zu analysieren sucht. Der Scatterindex kombiniert also zwei verschiedene Parameter: die Anzahl der atypischen violetten Punktsignale und das Ausmass der vertikalen Streuung. In der Literatur ist dieser Ansatz bisher nicht näher beschrieben worden.

Beruhend auf der Annahme, dass je nach Infektionsstatus der Probanden (gesund, asymptomatische Parasitämie, unkomplizierte und komplizierte Malaria) nicht nur die absolute Anzahl der atypischen violetten Punktsignale, sondern auch die Höhe der Streuung der Signale ansteigt, wurden in einer ersten Untersuchung die einzelnen Gruppen untereinander verglichen.

Die Unterschiede in beiden Altersgruppen zwischen nicht malariakranken Probanden und Patienten mit unkomplizierter oder komplizierter Malaria sind signifikant mit $p < 0,001$. Deutlich ist – wie schon bei den atypischen violetten Punktsignalen beobachtet – der kontinuierliche Anstieg der durchschnittlichen Scatterindizes vom nicht kranken Probanden bis zum Patienten mit komplizierter Malaria.

Die geringen durchschnittlichen Werte bei nicht kranken Probanden und bei Patienten mit asymptomatischer Parasitämie spiegeln die Beobachtung wider, dass Probanden dieser beiden Gruppen oft nur wenige Signale zeigten, die

außerdem sehr dicht an der Unterscheidungsschwelle lokalisiert waren. Weitere Untersuchungen müssen sich anschließen, um durch Optimierung des Scatterindex gegebenenfalls die Unterscheidung zwischen falsch positiven und richtigen Malariafällen zu vereinfachen bzw. überhaupt zu ermöglichen.

4.3 Korrelationen

Wie schon besprochen wurde, repräsentieren im $90^\circ / 90^\circ$ depol Scattergramm der Cell-Dyn 3000[®] nachgewiesene atypische violette Punktsignale in der Blutprobe vorkommende hämozoinhaltige Monozyten (59). Die Annahme liegt nahe, dass die Anzahl der hämozoinhaltigen Zellen auch durch die Menge der atypischen violetten Punktsignale widerspiegelt wird. Die gute Korrelation zwischen PCMs und AVPs in dieser Studie mit einem Spearman's Rho von 0,813 ($p < 0,001$) stützen diese Beobachtung.

Im selben Scattergramm lassen sich neben atypischen violetten auch atypische grüne Punktsignale nachweisen, repräsentativ für hämozoinhaltige Neutrophile (59). Die Korrelation zwischen mikroskopisch und durchflusszytometrisch bestimmten Ergebnissen sind jedoch sehr viel schlechter, Spearman's Rho beträgt nur 0,635 ($p < 0,001$).

Es stellt sich die Frage, warum die Korrelationen nicht noch genauer sind, insbesondere die der hämozoinhaltigen Neutrophilen. Einerseits können Fehler bei der mikroskopischen Auszählung der Leukozyten entstanden sein. Andererseits könnten auch die Zählung bzw. die graphische Darstellung der Cell-Dyn 3000[®] verantwortlich sein.

Die manuelle Auszählung der hämozoinhaltigen Leukozyten unter dem Mikroskop ist nicht fehlerfrei. Zur Bestimmung der hämozoinhaltigen Monozyten und Neutrophilen wurde von durchschnittlich 100, respektive 200 Monozyten die Anzahl derjenigen mit depolarisierenden Pigmenteinschlüssen vermerkt. Zahlreiche Faktoren können dabei zu Fehlern führen, welche in zu hohen oder zu niedrigen Werten resultieren.

Der dicke Tropfen eignet sich zwar hervorragend zur Diagnose einer Malariainfektion, da er – im Vergleich zum Ausstrichpräparat – stärker konzentriert ist. Parasiten sind gut darstellbar, allerdings sind die Leukozyten teilweise schwer voneinander zu unterscheiden. Monozyten können leicht mit großen Lymphozyten oder sogar mit Granulozyten verwechselt werden. So können sich falsch niedrige oder falsch hohe Ergebnisse ergeben. Besonders gravierend ist dies im Falle einer Verwechslung zwischen hämozoinhaltigen Monozyten und Neutrophilen, weil dadurch beide Werte – PCMs und PCNs – verfälscht werden.

Nicht alle intrazellulär erscheinenden depolarisierenden Phänomene sind auch wirklich phagozytiertes Malariapigment. Teilweise kann es durch die Konzentrierung des Blutes im Dicken Tropfen zu Überlagerung von Monozyten und freiem Pigment oder Verunreinigungen (Staub, Erde, etc.), die unter den manchmal erschwerten Bedingungen in ländlichen Gebieten nicht völlig zu vermeiden sind, kommen. Falsch hohe Ergebnisse kommen hierdurch zustande. Auf der anderen Seite sind nicht alle Pigmenteinschlüsse zweifelsfrei zu identifizieren. Gerade kleinere Mengen von depolarisierenden Einschlüssen werden auch bei genauerer lichtmikroskopischer Untersuchung nicht selten übersehen, woraus falsch niedrige Ergebnisse resultieren.

Schließlich müssen die Ergebnisse allein schon aus statistischen Überlegungen mit der nötigen Vorsicht bewertet werden. Bain (2005) wies darauf hin, dass die manuelle Bestimmung von Leukozyten anhand eines Blutausstrichs bei geringer Zellzahl zu außerordentlich großen Fehlern führen kann (5). Werden beispielsweise bei 100 ausgewerteten Monozyten drei hämozoinhaltige Monozyten gefunden, so beträgt das 95%-Konfidenzintervall null bis neun. Dieses Phänomen ist insbesondere bei geringen Pigmenteinschlüssen von entscheidender Bedeutung. Bei hämozoinhaltigen Neutrophilen ist dieses Problem noch stärker ausgeprägt, da die Anteile der pigmenthaltigen Zellen ohnehin sehr viel geringer als bei den Monozyten sind, wodurch die Ergebnisse noch stärker verfälscht werden.

Auch die Analysen des Cell-Dyn 3000®-Gerätes unterliegen einigen Fehlermöglichkeiten. Zum einen werden weitaus mehr Zellen gezählt, als auf den Graphiken als Bildpunkte („Pixel“) dargestellt werden können. In einzelnen Fällen könnten gerade diejenigen Zellen, die zur Darstellung kommen, nicht repräsentativ für die gesamte Population der hämozoinhaltigen Monozyten sein. Es ist ebenfalls durchaus möglich, dass mehrere Signale – also mehrere hämozoinhaltige Monozyten oder Neutrophile – auf den Diagrammen übereinander abgebildet werden. Somit wäre eine Verfälschung vor allem bei großen Mengen an atypischen Signalen zu erklären.

Bei der Beurteilung der atypischen grünen Punktwolken – repräsentativ für hämozoinhaltige Neutrophile – ist die Problematik noch weitaus größer als bei den Monozyten. Da die Eosinophilenwolke einen fließenden Übergang zu den hämozoinhaltigen Neutrophilen bildet und zudem bei jedem Probanden unterschiedlich ausgeprägt ist, wird eine genaue Unterscheidung schwierig. Viele Neutrophile werden nicht erkannt werden können, da sie innerhalb der Eosinophilenwolke verborgen bleiben. Es wird sozusagen nur „die Spitze des Eisberges“ oberhalb der normalen Eosinophilenpopulation überhaupt als atypische Punktsignale erkannt. Dies würde erklären, warum trotz hoher Neutrophilenkonzentrationen oft nur wenige atypische Signale – hervorgerufen durch wenige Neutrophile mit sehr hohen intrazellulären Pigmenteinschlüssen – zu finden sind und warum PCNs und AGPs nur schwach korrelieren: Ein großer Teil der hämozoinhaltigen Neutrophilen wird nicht als solche erkannt! Bei geringen Konzentrationen sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass überhaupt stark depolarisierende Neutrophile gefunden werden, noch weiter.

Erschwerend kommt hinzu, dass bei einigen Patienten eine starke Eosinophilenpopulation im Diagramm zu beobachten ist, die nicht immer durch eine Eosinophilie zu erklären ist. Bei diesen Probanden vermischen sich die Populationen noch mehr, eine Unterscheidung wird fast unmöglich.

In der vorliegenden Studie wurden für die Analyse der atypischen Punktsignale fixe Analysebereiche gewählt. Die von der Software der Cell-Dyn 3000® geschaffenen Unterscheidungsschwellen sind jedoch individuell für jede

Blutprobe berechnet. Eine bessere Korrelation ist zu erwarten, wenn dieser Bereich – ähnlich wie die softwareeigenen Unterscheidungsschwellen für die einzelnen Populationen – variabel und für jede Analyse spezifisch bestimmt werden könnte. Weitere Studien sind für die Bestimmung von solchen Schwellen nötig.

4.4 Vergleich Mikroskopie und Durchflusszytometrie

Stellt man die Anzahl der Probanden mit hämozoinhaltigen Leukozyten der Anzahl der Probanden mit atypisch verteilten Punktsignalen gegenüber, fallen Unterschiede auf. Längst nicht alle Probanden mit atypischen Punktsignalen hatten auch mikroskopisch nachweisbares Hämozoin im Blut. Umgekehrt existierten Probanden, bei denen zwar hämozoinhaltige Leukozyten nachweisbar waren, allerdings keine atypischen Punktsignale gefunden wurden.

Betrachtet man die relativen Häufigkeiten der positiven Hämozoinanalyse bei den verschiedenen Diagnosen, so fällt innerhalb der Gruppe der hämozoinhaltigen Monozyten auf, dass bei nicht malariakranken Probanden durch die durchflusszytometrische Analyse in deutlich mehr Fällen Hämozoineinschlüsse in Monozyten nachgewiesen wurden als durch mikroskopische Analyse (15,2% respektive 7,5%). Die Ergebnisse bei unkomplizierter und komplizierter Malaria sind dagegen praktisch identisch (Durchflusszytometrie: 91% respektive 98%, Mikroskopie: 91% respektive 100%).

Innerhalb der Gruppe der hämozoinhaltigen Neutrophilen verhält sich dies anders: bei nicht malariakranken Probanden wurden in gleich wenigen Fällen Hämozoineinschlüsse nachgewiesen (Flusszytometrie und Mikroskopie jeweils 4% der Probanden). Bei Malaria, insbesondere der unkomplizierten Form, traten in deutlich mehr Fällen AGPs als PCNs auf (unkomplizierte Malaria: 74,4% vs. 54,9%, komplizierte Malaria: 90,2% vs. 96,1%).

Vergleicht man die beiden Gruppen der pigmenthaltigen Leukozyten untereinander, fallen insbesondere die großen Unterschiede bei nicht

malariakranken Probanden (Monozyten: Hämozoineinschlüsse in 7,5% in Mikroskopie, 15,2% in Durchflusszytometrie; Neutrophile: Hämozoineinschlüsse in jeweils 4,0%) und bei unkomplizierter Malaria ins Auge (Monozyten: Hämozoineinschlüsse in 91,0 % in Mikroskopie und Durchflusszytometrie; Neutrophile: Hämozoineinschlüsse in 54,9% respektive 74,4%). Daneben unterscheiden sich auch die Ergebnisse bei den Probanden mit asymptomatischer Parasitämie: In Monozyten wurden deutlich häufiger Hämozoineinschlüsse gefunden als in Neutrophilen (durchflusszytometrischer Nachweis in 41 respektive vier von 55 Fällen, mikroskopischer Nachweis in 33 respektive sieben von 55 Fällen).

Die Ursachen, warum bei manchen Malariakranken kein Pigment nachweisbar ist, während gesunde Probanden Hämozoin in ihrem Blut präsentieren, sind vielfältig. Sie sind sehr spezifisch für die angewandten Nachweismethoden (Mikroskopie oder Durchflusszytometrie), weshalb die Ergebnisse teilweise so stark differieren. Ein Teil dieser Gründe wurde schon im letzten Kapitel eingehend besprochen.

In jedem menschlichen Organismus werden nach Infektion mit *Plasmodium falciparum* von phagozytosefähigen Leukozyten Hämozoinkristalle aufgenommen. Die Menge der im Blut zirkulierenden hämozoinhaltigen Leukozyten ist dabei von Krankheitsdauer, Immunitätslage und schließlich auch der durchschnittlichen Lebensdauer der jeweiligen Leukozyten abhängig (59;76). Sowohl die Mikroskopie als auch durchflusszytometrische Verfahren haben eine Detektionsschwelle, die abhängig ist von der Menge der untersuchten Zellen und der Qualität der Untersuchung.

Mikroskopisch reicht bei geringen Mengen von hämozoinhaltigen Leukozyten – und hier insbesondere bei den Neutrophilen, die eine ausgesprochen kurze Halbwertszeit von wenigen Stunden zeigen und deshalb nur wenig akkumulieren (59;76) – die Inspektion von 100 Monozyten bzw. 200 neutrophilen Granulozyten nicht unbedingt aus, um mit Sicherheit Pigment nachzuweisen.

Rein statistisch ist bei einer solch kleinen Anzahl von 100 bzw. 200 untersuchten Zellen das Konfidenzintervall für keine einzige gefundene hämozoinhaltige Zelle null bis vier respektive null bis zwei (5). Umgekehrt schließen die Konfidenzintervalle bei zwei respektive drei pigmenthaltigen Zellen die Null ein – womit die positiven Hämozoinnachweise bei gesunden Probanden zu erklären wären. Schon allein rechnerisch müssen also Fehler erwartet werden.

Wie bereits im letzten Kapitel besprochen, können Verwechslungen von Monozyten und Neutrophilen und Verschmutzungen zu falschen Ergebnissen führen können.

Die Analyse durch das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät bietet besonders in Hinsicht auf die statistische Genauigkeit entscheidende Vorteile gegenüber der manuellen mikroskopischen Auswertung.

Die laser-durchflusszytometrische Einheit des Cell-Dyn 3000[®]-Geräts analysiert bis zu 10.000 Zellen, von denen auf den Scattergrammen 5.000 angezeigt werden. Aufgrund der hohen Zellzahl und der Methodik der Analyse können die einzelnen Leukozytenpopulationen sehr viel präziser aufgetrennt werden als durch manuelle Mikroskopie. Bei durchschnittlich acht Prozent Monozyten bzw. 50% neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild werden etwa 400 Monozyten bzw. 2.500 neutrophile Granulozyten analysiert, deren hämozoinhaltiger Anteil atypische Punktsignale erzeugt. Diese Zellzahlen sind weitaus höher als die 100 bzw. 200 lichtmikroskopisch ausgewerteten Monozyten bzw. neutrophilen Granulozyten. Dadurch ist anzunehmen, dass die Präzision bei der durchflusszytometrischen Bestimmung hämozoinhaltiger Leukozyten höher ist. Dies wurde in Studien mit experimentellen Zellzählern bereits angesprochen (40). Die gefundenen Ergebnisse, insbesondere in den Malariagruppen, spiegeln dies wider. Auch in der Gruppe der asymptomatischen Parasitämien wurden durch die Maschine sehr viel mehr Pigmenteinschlüsse nachgewiesen, was zu erwarten war, da auch bei einer Erkrankung ohne sichtbare Symptome Hämozoin produziert wird.

Des Weiteren ist die automatische Bestimmung der hämozoinhaltigen Leukozyten untersucherunabhängig. Da die Blutproben direkt verarbeitet werden, treten auch weniger Fehler durch Verschmutzungen auf, wie sie beim Anfertigen des Dicken Tropfens vorkommen.

Allerdings existieren auch Faktoren, die die Präzision des Gerätes einschränken.

Zwar wird wie oben besprochen die Präzision durch hohe Zellzahlen erhöht. Insbesondere bei niedrigen Monozytenkonzentrationen (wie sie vor allem in der Gruppe der nicht kranken Probanden vorkommen) können jedoch statistische Fehler auftreten. Bei einer Monozytenkonzentration von zwei Prozent werden genauso viele Monozyten analysiert, wie bei der mikroskopischen Auszählung. Die Neutrophilenkonzentrationen sind zwar normalerweise weitaus höher, allerdings können hier falsch negative Ergebnisse wegen der meist sehr niedrigen Anzahlen an hämozoinhaltigen Neutrophilen auftreten. In beiden Fällen können geringe Zahlen hämozoinhaltiger Leukozyten zu falsch negativen Resultaten führen.

Ein weiteres Problem stellt die Unterscheidung zwischen „normalen“ Signalen und atypischen Signalen dar. Das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät ist nicht für den Nachweis von Malariapigment konzipiert. Diese Eigenschaft ist sozusagen ein Nebenprodukt der Zelldifferenzierung durch Laser-Durchflusszytometrie. Dementsprechend existieren weder Schwellen noch Warnmeldungen als Teil der Gerätesoftware für atypische Signale.

Die Unterscheidungsschwellen für atypische Signale sind folglich künstlich geschaffen und im Gegensatz zu softwareeigenen Schwellen nicht individuell für jede einzelne Blutprobe berechnet. Im Falle der Monozyten ist die Unterscheidung zwischen „normalen“ und atypischen Punktsignalen relativ einfach: normale Monozyten depolarisieren praktisch gar nicht, während hämozoinhaltige Monozyten eine mehr oder weniger weit gestreute Punktwolke erzeugen. „Normale“ und atypische Signale sind relativ gut durch die Unterscheidungsschwelle für Eosinophile/Neutrophile im 90°/90°depol-Scattergramm getrennt. Gerade bei niedrigen Mengen an atypischen Signalen

nahe der Schwelle ist diese Trennung allerdings schwierig; normale Signale können knapp über der Schwelle liegen und so atypische Punktsignale erzeugen. Umgekehrt führen theoretisch denkbare schwach depolarisierende hämozoinhaltige Monozyten zu Signalen unterhalb der Schwelle, die innerhalb der normalen Monozytenpopulation nicht nachweisbar sind.

Da neutrophile Granulozyten nur schwach Licht depolarisieren, befinden sie sich normalerweise im unteren Bereich des $90^\circ/90^\circ$ depol-Scattergramm unterhalb der Schwelle, wodurch sie auch von der Software von den Eosinophilen getrennt werden. Hämozoinhaltige Neutrophile depolarisieren – ähnlich wie hämozoinhaltige Monozyten – abhängig von der Menge der phagozytierten Malariapigments und werden dementsprechend mehr oder weniger nahe des oberen Randes des Scattergramms abgebildet. Ein Großteil der schwach brechenden Zellen wird jedoch innerhalb der Eosinophilenwolke zur Abbildung kommen und damit nicht von echten Eosinophilen zu unterscheiden sein. Bei geringen Konzentrationen sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass überhaupt stark depolarisierende Neutrophile gefunden werden.

Weiterhin sind Verunreinigungen, wie sie bei der Mikroskopie auftreten können, unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen. Durch direkte Verarbeitung jeder Blutprobe können durch die Probe selbst deutlich weniger Verunreinigungen die Analyse stören. Allerdings kann es unter schwierigen Bedingungen zu Verschmutzungen der optischen Einheit des Gerätes kommen, wodurch die Analyse nachhaltig verfälscht wird. Diese Verschmutzungen fallen jedoch normalerweise durch ein typisches Muster auf und interagieren nicht mit atypischen Signalen.

Wie lassen sich also die unterschiedlichen Resultate im Kontext der Vor- und Nachteile der beiden Methoden erklären?

Nachgewiesene Hämozoineinschlüsse in Monozyten bei nicht malariakranken Probanden können einerseits als messtechnisch falsche Ergebnisse interpretiert werden, die durch Verschmutzungen auf den Objektträgern, falsche Grenzwerten bei der Durchflusszytometrie oder statistische Fehler aufgetreten sind. Allerdings ist durchaus anzunehmen, dass bei einem Teil der

Probanden zwar eine Malaria vorlag, diese jedoch durch den dicken Tropfen nicht nachgewiesen wurde. Der große Anteil an schwangeren Frauen, welche oft nur geringe Parasitämien entwickeln (69;105), bekräftigt dieses Argument. PCR-Analysen sollten in zukünftigen Studien deshalb angeschlossen werden, um den wahren Infektionsstatus der Probanden zu ermitteln. Sollten diese Probanden tatsächlich falsch negativ diagnostiziert worden sein, so ließe sich der höhere Anteil an Hämozoineinschlüssen bei der durchflusszytometrischen Analyse erklären. Diese hat eine höhere Genauigkeit und kann deshalb geringere Parasitämien nachweisen.

In diesem Zusammenhang muss allerdings diskutiert werden, warum die Ergebnisse der Neutrophilen praktisch identisch sind, wenn doch das Gerät eine höhere Genauigkeit durch größere Zellzahl erbringt. Erklärungsmöglichkeiten sind hier insbesondere die fix gewählte Schwelle und die Vermischung von hämozoinhaltigen Neutrophilen mit den Eosinophilen auf dem Scattergramm. Der Vorteil der Maschine wird so durch die Einschränkungen der Analysemethode wieder aufgehoben.

Malariapatienten zeigen mit beiden Methoden eine hohe Nachweisrate von Hämozoineinschlüssen in Leukozyten. Dies lässt sich durch die normalerweise sehr viel höheren Parasitämien und Pigmentlasten, insbesondere bei komplizierter Malaria erklären (66). Eine Ausnahme bilden die neutrophilen Granulozyten bei unkomplizierter Malaria. Erklären lässt sich dieses Phänomen anhand der – wegen ihrer kurzen Halbwertszeit – geringen Mengen von hämozoinhaltigen Neutrophilen, die bei einer Malariainfektion anfallen. Ein mikroskopischer oder durchflusszytometrischer Nachweis kann deshalb schwierig sein. Der Anteil der positiven Hämozoinnachweise in Neutrophilen ist bei der Durchflusszytometrie höher als bei der manuellen Auszählung: Möglicherweise liegt dies an einem höheren Anteil an Neutrophilen mit großen Hämozoineinschlüssen bei einer klinischen Malaria, die sich wegen ihrer depolarisierenden Eigenschaften eher ausserhalb der Eosinophilenpopulation darstellen als z.B. bei einer subklinischen Infektion.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die durchflusszytometrische Methode zum Nachweis von Hämozoineinschlüssen sowohl in Monozyten als auch in neutrophilen Granulozyten geeignet und sogar zuverlässiger als die Mikroskopie ist. Primär verantwortlich dafür sind eine um den Faktor 4 bis 25 höhere Anzahl von analysierten Zellen und den weitgehenden untersucher- und umweltunabhängigen Prozess der Analyse. Weitere Verbesserungen an der Maschine und Software sind jedoch notwendig, um die Methode zu optimieren.

4.5 Sensitivität und Spezifität der Cell-Dyn 3000® für akute Malaria

4.5.1 Sensitivität und Spezifität für AVPs bei Kindern/Erwachsenen

Sensitivität und Spezifität für AVPs sind in der Gruppe der Probanden bis zum vollendeten 14. Lebensjahr sehr hoch (jeweils 95,4%). In der Gruppe der Erwachsenen sind Sensitivität und Spezifität deutlich niedriger (81,3% bzw. 83,6%).

Falsch positive Resultate traten bei Kindern bzw. Erwachsenen in zehn von 216 respektive 106 von 646 Fällen auf, falsch negative in sieben von 152 respektive sechs von 32 Fällen. Die Anzahl der falsch positiven und negativen Ergebnisse ist bei Erwachsenen demnach mehr als dreimal so hoch wie bei Kindern.

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen früherer Studien (Mendelow et al. 1999, Sensitivität und Spezifität: 90% respektive 96% (71); Hänscheid et al. 2001: 95% respektive 88% (46); Kramer et al. 2001: jeweils 100% (59); Grobusch et al. 2003: 74% respektive 96% (40)).

Wie sind die falsch negativen und falsch positiven Ergebnisse zu erklären? Um diese Frage zu klären, müssen zuerst einmal die falschen Ergebnisse in beiden Gruppen näher untersucht werden.

Ein Kind und 12 Erwachsene litten zwar nicht mehr an einer akuten Malaria; allerdings waren noch Abbauprodukte der Parasiten in Form von hämozoinhaltigen Monozyten im Blut nachweisbar, welche vom Gerät als atypische violette Punktsignale dargestellt wurden. Hämozoinhaltige Monozyten sind nach einer Infektion mit Plasmodien noch Wochen nach erfolgreicher

Behandlung im Blut nachweisbar (17). Hier zeigt sich eine Ungenauigkeit bei der Malariadiagnostik: kürzlich abgelaufene Malariainfektionen können nicht sicher von akuten Malariaepisoden unterschieden werden, da nicht die Parasiten sondern deren Abbauprodukte nachgewiesen werden. Auf diese Problematik wurde schon in anderen Studien hingewiesen (17).

Bei 41 Erwachsenen konnte eine asymptomatische Parasitämie, d.h. eine subklinisch verlaufende Malariainfektion, nachgewiesen werden. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass ein Großteil dieser Probanden als falsch positive Ergebnisse gewertet wird. Obwohl die Patienten keine Symptome präsentieren, findet eine Vermehrung von Plasmodien im Blut statt. Abbauprodukte sammeln sich auch hier an und werden von Monozyten über längere Zeit gespeichert (17).

Fünf erwachsene Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei, allerdings konnte aus früheren oder späteren Kontrollen ermittelt werden, dass sie kürzlich entweder eine asymptomatische Parasitämie hatten oder sie kurz nach Einschluss in die Studie entwickelten. Im ersten Fall darf angenommen werden, dass noch Hämозoin nachweisbar ist, ähnlich wie bei einer therapierten Malaria. Im zweiten Fall muss man davon ausgehen, dass bereits eine sehr geringe, mikroskopisch noch nicht nachweisbare Parasitämie vorliegt, die zur Bildung von Hämозoin geführt hat.

Diese beiden letzten Gruppen sind verantwortlich für mehr als die Hälfte (54 von 106) der falsch positiven Ergebnisse bei Erwachsenen; zwar können sie formal nicht als akute Malaria klassifiziert werden, allerdings hat eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* stattgefunden. Dieses Phänomen schränkt die Möglichkeiten der Malariadiagnostik mit dem Cell-Dyn 3000[®]-Gerät ein, da es nicht in der Lage ist zwischen „blande“ verlaufender Infektion beim Semi-Immunen bzw. bereits therapierter Malaria und akuter Malariaepisode zu unterscheiden. Neben der Patientengeschichte (Malaria in den letzten Wochen?) ist weiterhin der Dicke Tropfen als Bestätigungstest nötig, um eine akute Malaria sicher diagnostizieren zu können.

Die schon im letzten Kapitel angesprochene bessere Genauigkeit auf Grund höherer Zellzahlen bzw. die Unpräzision bei der mikroskopischen Auswertung von Leukozyten wird wahrscheinlich für die negativen mikroskopischen Ergebnisse bei sechs der Patienten mit therapierter Malaria und zehn der Probanden mit asymptomatischer Parasitämie verantwortlich sein.

Ein Kind und 14 Erwachsene präsentierten bei der Untersuchung unspezifische Krankheitssymptome, die Anzeichen einer Malariainfektion hätten sein können, bei keinem der Probanden wurde jedoch mikroskopisch eine Malaria nachgewiesen. Anämie und Thrombozytämie können auch Folgen wiederholter parasitärer Infektionen in der Vergangenheit oder – bei weiblichen Erwachsenen – Schwangerschaft sein. Fieber, Kopfschmerzen und Erbrechen sind Symptome von vielen verschiedenen Erkrankungen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht doch eine unter der mikroskopischen Nachweisgrenze liegende Parasitämie vorliegt, die jedoch bereits zur Anreicherung von nachweisbaren Abbauprodukten geführt hat. Gerade bei schwangeren Frauen sind subklinische Infektionen wegen geringer Parasitämie oft schwer nachzuweisen (69;105), möglicherweise wurden durch das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät bereits hämozoinhaltige Monozyten nachgewiesen, die in der Mikroskopie unerkant geblieben waren.

Acht Kinder zeigten keinerlei Symptome einer Infektion, auch mikroskopisch konnten keine Zeichen nachgewiesen werden. Weitere 33 erwachsene Probanden waren ebenfalls klinisch gesund, bei drei waren jedoch hämozoinhaltige Monozyten mikroskopisch nachweisbar. Die atypischen Punktsignale bei den Kindern sowie bei neun der 33 Erwachsenen gruppieren sich in diesen Fällen nahe der Unterscheidungsschwelle – ganz im Gegensatz zu den AVPs bei akuter Malaria, die normalerweise zahlreicher und weiter gestreut sind. Als Ursache wären für diese falsch positiven Ergebnisse tatsächliche Fehler der Cell-Dyn 3000[®] bei der richtigen Leukozyten-Klassifizierung denkbar. Wie schon diskutiert, sind Gerät und Software (und

damit die Unterscheidungsschwelle) nicht primär darauf ausgelegt, hämoglobinhaltige Leukozyten nachzuweisen. Optimierung der Hard- und Software könnten in Zukunft diese Fehlklassifizierungen einschränken. Verschmutzungen und Rückstände könnten ebenfalls verantwortlich sein für solche zufälligen Ereignisse, insbesondere unter schwierigen klimatischen Bedingungen.

Die 33 erwachsenen Probanden waren zudem schwangere Frauen. Während der Schwangerschaft ist eine Malariainfektion sehr viel schwieriger zu diagnostizieren, da die Parasiten insbesondere in der Plazenta sequestrieren und im peripheren Blut nicht nachweisbar sind (69;105). Schwangere Frauen sind wegen der veränderten Immunitätslage sehr viel empfänglicher für eine Infektion als nicht schwangere (19). Es ist deshalb auch denkbar, dass viele dieser Frauen wirklich eine subklinische, mikroskopisch nicht nachweisbare Malariainfektion aufwiesen, die allerdings von der Cell-Dyn 3000[®] erkannt wurde.

Weitere Ursachen für falsch positive Ergebnisse bei klinisch gesunden Probanden könnten andere parasitäre Infektionen sein, die ähnliche Ergebnisse bei der durchflusszytometrischen Analyse ergeben wie eine Malariainfektion. Bei Filarieninfektionen wurden ähnliche atypische Streuungen der Monozytenpopulation im Scattergramm der Cell-Dyn 3000[®] beschrieben wie bei Malaria (15). Des Weiteren entsteht auch bei *Schistosoma* spp. Hämoglobin als Abbauprodukt (77), so dass falsch positive Ergebnisse auf eine Bilharziose zurückzuführen sein könnten. Weitere Studien müssen den Zusammenhang zwischen Malaria und anderen parasitären Infektionen weiter untersuchen, um den Einfluss auf die durchflusszytometrischen Analysen zu klären.

Neben falsch positiven sind auch falsch negative Ergebnisse aufgetreten.

Ein Kind mit komplizierter Malaria und zwei erwachsene Patienten mit unkomplizierter Malaria hatten keine atypischen Punktsignale, obwohl hämoglobinhaltige Monozyten nachweisbar waren. Eigentlich dürfte dieser Fall nicht vorkommen, da das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät weitaus mehr Zellen auswertet

als manuell durch die Mikroskopie möglich ist (vgl. auch letztes Kapitel). Denkbar sind zwei Erklärungen, warum das Gerät in diesen Fällen versagt hat: Entweder sind nur einige wenige schwach polarisierende hämozoinhaltige Monozyten unterhalb der Schwelle aufgetreten und waren somit nicht nachweisbar. Alternativ kann tatsächlich der statistisch mögliche, aber seltene Fall eingetreten sein, dass unter den ausgezählten Zellen keine einzige hämozoinhaltige war. Anpassung der Schwelle, höhere Zählraten und höhere Auflösung des Scattergrammes könnten die Genauigkeit erhöhen.

Vier Kinder und drei Erwachsene mit unkomplizierter Malaria präsentierten mikroskopisch nachgewiesene hämozoinhaltige Monozyten in geringen Mengen und violette Punktsignale direkt auf der Unterscheidungsschwelle. Es wurde bereits an anderer Stelle in diesem Kapitel besprochen, dass in falsch positiven Fällen oft AVPs nahe der Schwelle auftreten. Ebenso findet man auch falsch negative, deren Punktsignale gerade nicht mehr oberhalb der Schwelle liegen. In diesem Fall wurden zwar atypisch verteilte Punktsignale gefunden, diese lagen jedoch auf der Schwelle und wurden deshalb definitionsgemäß nicht in die Gruppe der AVPs aufgenommen. Dies stellt ein grundsätzliches Problem dar: je weiter die Schwelle gefasst wird, desto mehr falsch positive Ergebnisse treten auf; je enger, desto mehr falsch negative. Höhere Zählraten und Auflösungen können dieses Problem nur bedingt lösen, es gilt durch geeignete Wahl der Schwelle beide Fehler möglichst klein zu halten.

Bei zwei Kindern und einem Erwachsenen mit komplizierter Malaria konnten weder AVPs noch hämozoinhaltige Monozyten gefunden werden. Wie schon in anderen Studien beschrieben, können nicht in jedem Malariafall intraleukozytäre Hämozoineinschlüsse nachgewiesen werden (40;46;47;49). Je nach Immunitätslage dauert es einige Zeit, bis nach Infektion genügend Abbauprodukte angereichert werden können, um einen positiven Nachweis zu ermöglichen (17;76). Gerade bei rapide verlaufenden Infektionen und insbesondere bei Kindern, die noch keine ausreichende Semi-Immunität

aufgebaut haben, ist dieses Phänomen besonders ausgeprägt (76). Umso erstaunlicher ist es, dass die Sensitivität bei jungen Patienten so hoch ist.

Bei erwachsenen Patienten in holoendemischen Gebieten liegt aber normalerweise eine Semi-Immunität vor. Da alle erwachsenen Probanden der Studie schwangere Frauen waren, könnte darin die Ursache der früheren Erkrankung sowie des geringeren Nachweises von Pigment und schließlich der niedrigeren Sensitivität und Spezifität liegen. Da eine Malariainfektion immunsuppressive Wirkung hat (19), reicht in manchen Fällen möglicherweise schon eine geringe Parasitenlast, um klinische Symptome hervorzurufen.

In diesem Zusammenhang muss noch auf die als negativ klassifizierten atypischen Parasitämien eingegangen werden. Weiter oben wurde diskutiert, dass atypische Parasitämien mit Recht als falsch positiv klassifiziert werden, da ähnlich wie bei einer Malariaepisode eine subklinische Infektion mit Plasmodienerrägern stattfindet. Warum nicht diese 14 Fälle? Gerade asymptomatische Parasitämien sind – im Gegensatz zu akuten Malariainfektionen – längerfristige Infektionen, die der Körper selbst limitiert. Eigentlich sollte sich ausreichend Malariapigment anreichern, um es mikroskopisch oder durchflusszytometrisch nachzuweisen zu können. Besteht in diesen Fällen die Parasitämie erst kurze Zeit, sodass noch nicht genug Hämozoine phagozytiert werden konnte? Kontrolliert der Körper die Infektion so weit, dass nur sehr geringe Mengen von Erregern und somit auch Pigment im Blut vorkommen? Die Antwort auf diese Fragen bleibt unklar, wahrscheinlich ist eine Kombination von mehreren Faktoren verantwortlich für den fehlenden Hämozoinnachweis.

4.5.2 Sensitivität und Spezifität für AGPs bei Kindern/Erwachsenen

Die Spezifität für AGPs ist in der Gruppe der Probanden bis zum vollendeten 14. Lebensjahr sehr hoch (jeweils 96,3%), die Sensitivität hoch (82,9%). In der Gruppe der Erwachsenen ist die Spezifität ähnlich hoch wie bei den Kindern (95,3%), die Sensitivität allerdings deutlich niedriger (66,7%).

Falsch positive Resultate traten bei Kindern bzw. Erwachsenen in acht von 216 respektive 31 von 646 Fällen auf, falsch negative in 26 von 152 respektive zehn von 32 Fällen. Im Vergleich zu den Ergebnissen der atypischen violetten Punktsignale fallen geringere Anzahlen an falsch positiven, jedoch eine größere Anzahl an falsch negativen Fällen auf.

In früheren Studien wurden atypische grüne Punktsignale wegen der schwierigen Abgrenzung zu Eosinophilen nicht genauer untersucht; es existieren also im Gegensatz zu AVPs keine vergleichbaren Ergebnisse.

Ähnlich wie schon für die AVPs erörtert stellen sich auch bei den AGPs die Fragen, wie die falsch negativen und falsch positiven Ergebnisse zu erklären sind, und worin der Unterschied zwischen den sehr guten Ergebnissen bei Kindern und den eher schlechten bei Erwachsenen Probanden besteht, insbesondere in Bezug auf die eher mäßige Sensitivität bei Erwachsenen.

Eine generelle Problematik, die sich bei der Analyse der AGPs stellt und die wahrscheinlich verantwortlich ist für sowohl einen großen Teil der falsch positiven wie auch der falsch negativen Ergebnisse, ist der fließende Übergang zwischen den Populationen der echten Eosinophilen und der fälschlich als Eosinophile dargestellten hämozoinhaltigen Neutrophilen im Scattergramm. Wie bereits erwähnt wird die Blutanalyse durch die Cell-Dyn 3000[®] individuell gesteuert, wohingegen in der vorliegenden Studie mit fix definierten Schwellen gearbeitet wurde. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass bei einzelnen Proben „echte“ Eosinophile als AGPs klassifiziert werden und so falsch positive Ergebnisse entstehen. Zwischen AGPs und wahren Eosinophilen finden sicherlich Vermischungen statt, Neutrophile mit nur wenigen intrazellulären Hämozoineinschlüssen sind wegen ihren ähnlichen Eigenschaften (schwächere Depolarisierung) nicht von Eosinophilen zu unterscheiden. Werden keine stark polarisierenden hämozoinhaltigen Neutrophilen vom Gerät detektiert, fällt das Ergebnis falsch negativ aus. Diese Erklärung ist für alle falsch positiven Proben gültig. Eine große Eosinophilenwolke, wie sie zum Beispiel bei Eosinophilie auftritt, kann ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen führen. Im Gegensatz zu echten AGPs befinden sich diese Signale allerdings oft in geringem Abstand zu

Schwelle. „Echte“ atypische grüne Punktsignale tendieren eher zu einer breiteren Streuung innerhalb des Scattergramms.

Die Problematik der richtigen Unterscheidung zwischen den beiden Populationen ist wegen der Übergänge schwierig zu lösen. Durch geeignete Software, die Schwellen variabel für jeden Patienten berechnet, ließen sich sicher Fehler vermeiden. Höhere Zählraten und Auflösungen sollten die Genauigkeit ebenfalls erhöhen, da dann die Wahrscheinlichkeit steigt, stärker polarisierende Neutrophile nachzuweisen. Die Vermischung der beiden Populationen lässt sich allerdings nicht vermeiden. Schwellen müssen deshalb so gesetzt werden, dass Fehler 1. und 2. Ordnung möglichst klein sind.

Im folgenden sollen nun die falschen Ergebnisse in beiden Gruppen noch genauer untersucht werden.

Ein Kind und ein Erwachsener waren vor Studieneinschluss an Malaria erkrankt und behandelt worden. Warum bei diesen Patienten AGPs auftreten bleibt unklar. Das Kind war schon sechs Wochen zuvor behandelt wurde, weshalb AGPs wegen ihrer kurzen Halbwertszeit nicht mehr nachweisbar sein sollten (17). Denkbar wäre eine Reinfektion, die allerdings noch keine klinischen Symptome zeigt oder eine unzureichende Behandlung. Die Infektion des erwachsenen Probanden war nur wenige Tage zuvor behandelt worden. Es ist also durchaus möglich, dass noch nicht alle Parasiten und Abbauprodukte aus dem Blut entfernt wurden. Deshalb waren wohl sowohl AVPs als auch AGPs nachzuweisen. Eine durch die Untersuchungsmethode bedingte Fehlklassifikation ist nicht auszuschließen.

Elf erwachsene Probanden zeigten bei mikroskopischer Untersuchung eine asymptomatische Parasitämie. Die Gründe für den Nachweis von hämozoinhaltigen Leukozyten in diesen Fällen wurden schon im letzten Kapitel eingehend behandelt. Erstaunlich ist aber, dass sehr viel weniger Probanden mit asymptomatischer Parasitämie AGPs als AVPs aufweisen (11 von 55 vs. 41 von 55). Darauf wird im Verlauf noch eingegangen werden. Eine durch die

Untersuchungsmethode bedingte Fehlklassifikation ist auch in diesen Fällen nicht auszuschließen.

Drei Kinder und acht Erwachsene zeigten klinische Symptome, jedoch konnten keine Malariaerreger nachgewiesen werden. Wie schon für die falsch positiven AVPs diskutiert wurde, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass Fieber, Anämie und Thrombozytopenie unspezifische Zeichen einer beginnenden, mikroskopisch nicht nachweisbaren Malariainfektion darstellen. Die erhöhte Zellzählrate des Gerätes im Gegensatz zur Mikroskopie könnte erste hämozoinhaltige Leukozyten nachgewiesen haben, bevor mikroskopisch überhaupt eine Infektion festgestellt worden war. Wie in den vorangegangenen Abschnitten kann auch hier eine durch die Untersuchungsmethode bedingte Fehlklassifikation verantwortlich für die falsch positiven Ergebnisse sein, insbesondere da bei vier Probanden erhöhte Eosinophilenwerte gefunden wurden.

Bei vier gesunden Kindern und elf Erwachsenen konnten geringe Mengen von AGPs nachgewiesen werden. Diese falsch positiven Ergebnisse sind am ehesten durch Fehlklassifikation von Eosinophilen als hämozoinhaltige Neutrophile zu erklären, insbesondere da bei fünf Probanden eine Eosinophilie gefunden wurde.

Weitere Ursachen für falsch positive Ergebnisse bei klinisch gesunden Probanden könnten andere parasitäre Infektionen sein, die ähnliche Ergebnisse bei der durchflusszytometrischen Analyse ergeben wie eine Malariainfektion. Filarieninfektionen, wie sie als Ursachen für falsch positive Ergebnisse bei AVPs beschrieben wurden, erzeugen keine eosinophilenähnlichen Punktsignale und können so als Ursachen weitgehend ausgeschlossen werden (15). Allerdings entsteht bei *Schistosoma* spp. Hämozoin als Abbauprodukt (77), welches nicht nur von Monozyten, sondern auch Neutrophilen phagozytiert wird und so zum Nachweis atypischer grüner Punktsignale führen könnte. Weitere Studien müssen den Zusammenhang zwischen Malaria und anderen

parasitären Infektionen untersuchen, um den Einfluss auf die durchflusszytometrischen Analysen zu klären.

Neben falsch positiven sind auch falsch negative Ergebnisse aufgetreten.

Bei elf Kindern und fünf Erwachsenen mit akuter Malariainfektion konnten zwar mikroskopisch hämozoinhaltige Neutrophile gefunden werden, allerdings waren keine atypischen grünen Punktsignale nachweisbar. Davon ausgehend, dass die geringen Prozentzahlen an hämozoinhaltigen Neutrophilen präzise sind, lassen sich die falsch negativen Fälle durch die bereits mehrfach angesprochene Problematik bei neutrophilen Granulozyten mit geringen Hämozoinkonzentrationen erklären.

13 Kinder und fünf Erwachsene mit einer akuten Malariainfektion zeigten weder mikroskopisch nachweisbare hämozoinhaltige Neutrophile noch atypische grüne Punktsignale. Im Zusammenhang mit AVPs wurde dieses Phänomen der mikroskopisch und durchflusszytometrisch falsch negativen Ergebnis bereits ausführlich diskutiert. Die Gründe für den fehlenden Nachweis liegen in der Immunitätslage der Probanden begründet (17;76). In verschiedenen früheren Studien konnte ebenfalls nicht in allen Malariafällen Hämozoin nachgewiesen werden (40;46;47;49). Ein wichtiger Grund für die falsch negativen Ergebnisse bei Erwachsenen könnte die Schwangerschaft sein, die eine bereits erworbene Semi-Immunität vermindert und so bereits klinische Symptome auftreten, wenn die Parasitenlast gering ist.

Auch muss in diesem Zusammenhang wieder auf die als negativ klassifizierten atypischen Parasitämien eingegangen werden. Mehrfach wurde bereits erörtert, dass atypische Parasitämien mit Recht als falsch positiv klassifiziert werden, da ähnlich wie bei einer Malariaepisode eine subklinische Infektion mit Plasmodienregern stattfindet. Es stellt sich jedoch die Frage, warum in 44 von 55 Fällen keine atypischen grünen Punktsignale nachweisbar waren. Als Gründe können wiederum nur Vermutungen angestellt werden: zu kurze

Parasitämien bzw. zu geringe Parasitenlasten und im Vergleich zu einer akuten Malaria andere Immunreaktionen des Körpers.

Interessant ist außerdem, warum der große Unterschied in der Detektion von AGPs und AVPs (11 von 55 vs. 41 von 55) besteht. Im Prinzip sollten bei einer subklinischen Infektion Abbauprodukte von *Plasmodium falciparum* sowohl in phagozytierenden Monozyten als auch Neutrophilen zu finden sein, was aber offensichtlich nicht immer der Fall ist. Eine Erklärung dieses Phänomens liegt möglicherweise in unterschiedlichen immunologischen Reaktionen der Probanden auf eine Infektion mit Malariaerregern. Möglicherweise werden bei einer symptomatischen, fieberhaften Infektion sowohl Monozyten als auch Neutrophile phagozytotisch aktiv. Bei einer asymptomatischen Infektion wären dann nur die Monozyten aktiviert.

Eine weitaus trivialere Erklärung für dieses Ergebnis ist statistisch zu begründen: hämozoinhaltige Neutrophile sind typischerweise weniger zahlreich als Monozyten im Blutbild zu finden, da sie sich wegen ihrer kurzen Halbwertszeit nicht anreichern (17). Die Bestimmung der Menge im Blutaussstrich ist deshalb oft sehr unpräzise (5). So kann die Zählung negativ ausfallen, obwohl hämozoinhaltige Granulozyten vorhanden sind. Die Bestimmung der atypischen Punktsignale ist nicht zweifelsfrei, wenn nur wenige Neutrophile geringe Mengen an Hämozoin phagozytiert haben, weil sie dann innerhalb der Eosinophilenwolke erscheinen und nicht gezählt werden können. Hämozoinhaltige Monozyten sind sowohl mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch einfacher und sicherer zu identifizieren. Die vielen negativen asymptomatischen Parasitämien können so nur ein zufälliges Ergebnis darstellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich sowohl atypische violette, als auch atypische grüne Punktsignale als Screeningmethode für eine Malariainfektion durchaus eignen.

In früheren Untersuchungen wurde mehrfach auf die Möglichkeit zur Malariadiagnostik durch atypische violette Punktsignale im Scattergramm der

Cell-Dyn 3000[®] hingewiesen (40;46;47;49). Auch in der vorliegenden Studie konnten hohe Sensitivitäten und Spezifitäten reproduziert werden. Im Unterschied zu früheren Studien wurden jedoch erstmals zwei Patientenkollektive untersucht, die bisher nicht speziell betrachtet worden waren: Kinder und schwangere Frauen. Es stellte sich heraus, dass bei Kindern die Ergebnisse deutlich besser sind als bei schwangeren Frauen.

Erstmals wurden auch atypische grüne Punktsignale als diagnostischer Marker für eine Malariainfektion untersucht. Auch hier fielen starke Unterschiede zwischen den Gruppen der Kinder und schwangeren Frauen auf. Insgesamt sind die Ergebnisse für atypische grüne etwas schlechter als für atypische violette Punktsignale.

Gerade wegen der Einsatzmöglichkeit der Cell-Dyn 3000[®] als Routineinstrument in der Blutanalyse bietet sich die Möglichkeit, durch einen einzigen Blick auf die Scattergramme des Gerätes einen ersten Verdacht auf eine mögliche Malariainfektion zu stellen. Da der Nachweis von hämozoinhaltigen Leukozyten jedoch nicht spezifisch für eine akute Infektion ist, sondern auch eine asymptomatische Parasitämie oder eine bereits behandelte Infektion darstellen kann, muss sich die mikroskopische Untersuchung anschließen.

In Zentralafrika wird jedoch der Nutzen des Gerätes durch seine hohen Anschaffungs- und laufenden Kosten eingeschränkt: Falls in Zukunft nicht die Produktion von Durchflusszytometern und deren Unterhalt billiger werden sollte, bleiben die Einsatzmöglichkeiten dieser Technik den reicheren Ländern vorbehalten.

Die durchflusszytometrische Analyse von atypischen Punktsignalen kann noch weiter verbessert werden. Die geräteinterne Software sollte soweit verändert werden, dass individuelle Analysebereiche berechnet werden können und so die große Anzahl der falsch positiven Ergebnisse vermindert werden kann. Durch eine Vergrößerung der Anzahl der vom Gerät untersuchten Zellzahlen kann eine weitere Verbesserung der Ergebnisse erwartet werden. Zukünftige

Studien müssen zudem die Immunitätslage der schwangeren Frau genauer untersuchen, um zu klären, ob das Cell-Dyn 3000[®]-Gerät möglicherweise in der Lage ist, Infektionen früher als die Mikroskopie zu erkennen. Die Klärung des Infektionsstatus der Probanden durch PCR spielt hierbei eine zentrale Rolle, um falsch positive oder negative Ergebnisse besser zu darstellen zu können.

4.6 Untersuchungen zur Prognoseerhebung durch die Cell-Dyn 3000[®]

In der Gruppe der Kinder wurden die verschiedenen Analyseverfahren zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Hämozoinkonzentration auf Unterschiede bei unkomplizierter und komplizierter Malaria getestet. Die Ergebnisse der beiden Gruppen wurden miteinander verglichen und auf Signifikanz getestet.

4.6.1 AVPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria

Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen unkomplizierter und komplizierter Malaria sichtbar: Bei Patienten mit komplizierter Malaria sind durchschnittlich deutlich mehr atypische violette Punktsignale nachweisbar als bei Probanden mit unkomplizierter Malaria.

In vorangegangenen Studien wurden hämozoinhaltige Monozyten schon als prognostisches Kriterium herangezogen, hohe Werte wurden so vor allem bei komplizierter und zerebraler Malaria gefunden (2;72;76). Da – wie in einem der letzten Kapitel gezeigt wurde – atypische violette Punktsignale und hämozoinhaltige Monozyten gut miteinander korrelieren, ist es nicht verwunderlich, dass bei komplizierter Malaria auch hohe Werte von AVPs gefunden werden.

Zu bemerken ist allerdings auch, dass die Reichweite der Werte sehr breit und die Standardabweichung sehr hoch ist. Dies bedeutet, dass zwar im Mittel bei komplizierten Fällen mehr AVPs zu erwarten sind. Allerdings können auch nur sehr wenige oder sogar gar keine zu finden sein.

4.6.2 AGPs bei unkomplizierter und komplizierter Malaria

Auch bei den atypischen grünen Punktsignalen sind signifikante Unterschiede zwischen den beiden Malariagruppen zu erkennen: Patienten mit komplizierter Malaria präsentieren durchschnittlich deutlich mehr atypische grüne Punktsignale als Probanden mit unkomplizierter Malaria.

In vergangenen Studien wurden neben den hämozoinhaltigen Monozyten auch die Neutrophilen als prognostisches Kriterium analysiert (2;72;76). Hämozoinhaltige Neutrophile wurden sogar als besseres Kriterium beschrieben, da ein hoher Anteil weitaus genauer mit komplizierter Malaria korreliert als bei hämozoinhaltigen Monozyten (66;76).

Der Schluss liegt auch hier nahe, ähnliche Ergebnisse bei der durchflusszytometrischen Analyse zu erwarten. Allerdings ist die gefundene Korrelation zwischen mikroskopisch ermittelten pigmenthaltigen Neutrophilen und den durchflusszytometrisch beobachteten atypischen grünen Punktsignalen deutlich schlechter als die der Monozyten. Außerdem versuchten bereits frühere Studien einen Zusammenhang zwischen den mikroskopisch nachgewiesenen hämozoinhaltigen Neutrophilen und den durch die Cell-Dyn 3000® repräsentierten Bildpunkte herzustellen (59). Diese Versuche scheiterten in der Vergangenheit, da sich hämozoinhaltige Neutrophile als verstreute Wolke falsch klassifizierte Eosinophile darstellen, die sich mit der Gruppe der echten Eosinophilen vermischt. Um diese Problematik zu umgehen, wurde in der vorliegenden Studie ein Bereich für atypisch verteilte Punktsignale geschaffen, welcher die Bedingungen für hämozoinhaltige Neutrophile erfüllen.

Aber auch hier – wie bei den pigmenthaltigen Monozyten – muss darauf hingewiesen werden, dass die Reichweite der Werte sehr breit und die Standardabweichung sehr hoch ist. Dies bedeutet, dass zwar im Mittel bei komplizierten Fällen mehr AVPs zu erwarten sind. Allerdings können auch nur sehr wenige oder sogar gar keine zu finden sein.

4.6.3 Scatterindizes bei unkomplizierter und komplizierter Malaria

Die Blutanalysen von Patienten mit Malaria zeigten im Gegensatz zu den nichtmalariakranken Probanden, bei denen höchstens einige Punkte nahe der Schwelle zu finden sind, oft eine sehr große Wolke von atypischen violetten Punktsignalen, die vor allem entlang der Ordinate teilweise sehr hoch streuen. Auf dieser Beobachtung beruht der Scatterindex, der durch stärkere Gewichtung der höher liegenden Punktsignale das Ausmaß und die Größe der Streuung zu analysieren sucht. Der Scatterindex kombiniert also zwei verschiedenen Parameter: die Anzahl der atypischen violetten Punktsignale und das Ausmass der vertikalen Streuung.

Der Hintergrund hierfür ist die Annahme, dass nicht nur die Anzahl der mit Pigment beladenen Leukozyten repräsentativ für die Schwere der Malaria ist, sondern auch die Menge des phagozytierten Hämozins. Die Höhe der Verteilung der atypischen violetten Punktsignale ist von der Beladung der einzelnen Monozyten mit Hämozoin abhängig – je mehr Hämozoin phagozytiert wurde, desto stärker depolarisiert der Monozyt Laserlicht. In der Literatur ist dieser Ansatz bisher nicht näher beschrieben worden.

Die Mittelwerte des Scatterindizes sind für komplizierte und unkomplizierte Malaria signifikant verschieden. Reichweite und Standardabweichung sind ähnlich groß wie auch bei den atypischen violetten Punktsignalen. Allerdings lässt sich nicht klar sagen, ob dieser Unterschied allein auf der Anzahl der atypischen Punktsignale beruht, oder ob die Stärke der Depolarisation einen bedeutenden Einfluss hatte. Zumindest kann ausgeschlossen werden, dass ein negativer Einfluss besteht.

Dieser Ansatz bleibt weiterhin erfolgversprechend, wenn man die Analysen verfeinert. Genauere, computergestützte Bildanalysen könnten eine Möglichkeit zur Verbesserung der Resultate darstellen.

Zusammenfassend zeigen sowohl atypische violette – quantitativ wie skaliert – als auch atypische grüne Punktsignale bei komplizierter Malaria deutlich höhere Mengen als bei unkomplizierter. Man kann daraus schließen, dass große

Mengen an atypischen Bildsignalen für eine schlechtere Prognose sprechen. Bisherige Methoden zur Einschätzung der Malaria sind allerdings noch recht vage (76).

Ist es unter Umständen möglich, Werte zu bestimmen, bei denen der Kliniker automatisch eine komplizierte Malaria annehmen muss und folglich eine intensivierete Behandlung einleitet? Bestünde diese Möglichkeit, könnte bei der Behandlung von Patienten wertvolle Zeit gespart werden. Gerade bei Kindern kann die Schwere der Malaria in relativ kurzer Zeit zunehmen und zum Tode führen. Die frühe Diagnose einer schweren Malaria ist deshalb von großer Bedeutung.

4.6.4 ROC-Kurven für komplizierte Malaria

Nachdem im vorhergehenden Kapitel der Nutzen von Hämozoineinschlüssen als prognostischer Marker diskutiert wurde, sollen im folgenden die verschiedenen Methoden auf ihre Güte geprüft werden. Dazu wurden Receiver-Operating-Characteristic-Kurven (ROC-Kurven) gezeichnet. ROC-Kurven wurden für atypische violette, atypische grüne Punktsignale und den Scatterindex erstellt.

Die Kurvenverläufe bei AVPs und dem Scatterindex lassen nicht darauf hoffen, einen Schwellenwert definieren zu können. In beiden Fällen scheinen die oberen Grenzen der Variablen bei unkomplizierter Malaria fließend in die unteren Grenzen der komplizierten Malaria übergehen. Dies ist aufgrund der langen Halbwertszeit und der Anhäufung von pigmenthaltigen Monozyten bei Malariainfektion auch nicht anders zu erwarten (17;76). Bei einer akuten Malaria kann so nicht unterschieden werden, ob die Infektion unkompliziert ist aber schon länger verläuft, oder ob eine schwere Malaria mit hoher Parasitämie in der Peripherie vorliegt. In beiden Fällen wären hohe Werte an hämozoinhaltigen Monozyten und dementsprechend auch hohe Werte an atypischen violetten Punktsignalen zu erwarten.

Der Kurvenverlauf bei atypischen grünen Punktsignalen ist vielversprechender. Die Genauigkeit des Testes ist mit einer Fläche unter der Kurve von $>0,7$ als befriedigend einzuschätzen, es zeichnet sich eine Tendenz ab. In verschiedenen Vorarbeiten wurde bereits darauf hingewiesen, dass hämozoinhaltige Neutrophile sehr viel bessere Marker für komplizierte Malaria als hämozoinhaltige Monozyten und sogar Hyperparasitämie darstellt (66;76). Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit geben sie sehr viel besser die wahre Parasitendichte wieder (17), insbesondere auch die in der peripheren Endstrombahn, wo sequestrierte Parasiten aus dem Blutstrom entfernt sind und im Dicken Tropfen nicht zu erkennen sind.

Die Tabellen mit Cut-Off-Werten für die Punktsignale und Scatterindex spiegeln die mäßigen Ergebnisse der ROC-Kurven wieder. Einen Schwellenwert, der gute Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und Spezifität bietet, ist leider nicht vorhanden. Warum kein deutlicher Schwellenwert zu finden ist, bleibt unklar. Zwar sind signifikante Unterschiede zwischen komplizierter und unkomplizierter Malaria vorhanden, allerdings sind die Punktsignale zu breit gestreut, um einen Cut-Off-Wert zu definieren. Es ist anzunehmen, dass bei komplizierter Malaria eine größere Parasitämie in der Endstrombahn vorliegt und so auch mehr Hämozoin von Leukozyten phagozytiert wird. Jedoch scheinen durch unterschiedliche Erkrankungsdauer und Immunitätslage der Patienten auch unkomplizierte Malariafälle mit hoher Hämozoinlast und umgekehrt komplizierte Fälle mit niedriger Hämozoinlast vorzukommen, wodurch die Bestimmung eines Schwellenwertes schwierig wird.

Wahrscheinlich ließe sich die Genauigkeit der ROC-Kurven, insbesondere diejenigen der atypischen grünen Punktsignale noch weiter verbessern, wenn eine Möglichkeit gefunden würde, die Unterscheidungsschwellen dynamisch zu gestalten. Deutlicher genauere Ergebnisse dürften erwartet werden, wenn auch depolarisierende Neutrophile innerhalb der Eosinophilenwolke identifiziert werden könnten.

Ein entscheidender Aspekt bei der Untersuchung der hämozoinhaltigen Leukozyten als prognostischer Marker wurde bisher nicht behandelt: Da diese Studie nur einen Querschnitt des Patientenkollektives des Labors darstellte, konnten keine Verlaufsuntersuchungen vorgenommen werden. Somit ist es durchaus möglich, dass Patienten, die sich trotz hoher Hämozoinwerte mit einer unkomplizierten Malaria präsentierten, sich in den folgenden Tagen verschlechterten und schließlich als komplizierte Malaria definiert werden mussten. Dies ist ein sehr wichtiger Aspekt und sollte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, vorzugsweise Längsschnittstudien mit Verlaufsbeschreibung der Klinik von Malariapatienten.

5 Zusammenfassung

Malaria ist weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten. Jährlich erkranken bis zu 500 Millionen Menschen an einer Malariainfektion, etwa zwei Millionen Menschen versterben an einer durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufenen Malaria tropica. Besonders gefährdet durch Malaria sind Kleinkinder, die noch keine ausreichende Immunität besitzen.

Neben umfassender Prävention und adäquater Behandlung der Infektion mit Chemotherapeutika hat vor allem die rechtzeitige Diagnose große Bedeutung im Management der Malaria.

In den letzten Jahren wurde der Nachweis von hämozoinhaltigen Leukozyten als Marker für eine akute Malariainfektion wiederentdeckt. Hämozoin, ein Abbauprodukt des Malariaerregers, wird von Monozyten und neutrophilen Granulozyten phagozytiert und ist mikroskopisch an seiner doppelbrechenden optischen Eigenschaft erkennbar. Der Nachweis von pigmenthaltigen Leukozyten wurde nicht nur als diagnostisches Kriterium beschrieben, sondern auch als prognostischer Marker mit der Schwere der Erkrankung in Verbindung gebracht.

Laser-Durchflusszytometer vom Typ des Blutanalysegerätes Cell-Dyn 3000® sind in der Lage, hämozoinhaltige Leukozyten anhand der optischen Eigenschaften des Hämozoin-Kristalles als fehlklassifizierte Punktsignale zu identifizieren. In verschiedenen Studien wurden bereits sog. atypische violette Punktsignale zur Malariadiagnostik genutzt. Unklar war bisher die Bedeutung von atypischen grünen Punktsignale geblieben, welche hämozoinhaltige neutrophile Granulozyten repräsentieren.

In der vorliegenden Studie wurden die durchflusszytometrischen Daten von Kindern und schwangeren Frauen in Lambaréné, Gabun, untersucht, um Sensitivität, Spezifität und prognostischen Wert des Cell-Dyn 3000®-Gerätes in Bezug auf Malariainfektion zu prüfen.

Es stellte sich heraus, dass bei Kindern das Auftreten von atypischen violetten und grünen Punktsignalen hoch sensitiv und spezifisch für eine Malariainfektion (AVPs: 95,4% respektive 95,4%; AGPs: 82,9% respektive 96,3%) ist.

Erstaunlicherweise sind Sensitivität und Spezifität bei Erwachsenen deutlich niedriger (AVPs: 81,3% respektive 83,6%; AGPs: 68,8% respektive 95,2%), hohe Raten an falsch positiven Fällen wurden beobachtet. Ursächlich für diese Ergebnisse sind neben der noch nicht vollständig ausgereiften Identifizierungsmethode von atypischen Punktsignalen auch die unterschiedliche Immunitätslage von Kindern und Erwachsenen, insbesondere schwangeren Frauen. In holoendemischen Gebieten wie Lambaréné scheint die Durchflusszytometrie als Screeningmethode durchaus sinnvoll zu sein. Die Ergebnisse in der Gruppe der schwangeren Frauen jedoch müssen durch zukünftige Studien genauer evaluiert werden.

Des Weiteren wurden bei Kindern atypische Punktsignale auf ihr Potential zur Diagnose der Schwere der Malaria untersucht. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den Mengen der atypischen violetten und grünen Punktsignale zwischen unkomplizierter und komplizierter Malaria (21 AVPs vs. 33 AVPs [$p=0,026$] respektive sechs AGPs vs. 15 AGPs [$p<0,001$]). Allerdings scheiterten Versuche, einen Schwellenwert zu finden, welcher dem Kliniker eine Klassifikation in komplizierte und unkomplizierte Malaria allein anhand der Anzahl der Punktsignale ermöglichen sollte. Die Signale sind in beiden Gruppen zu gleichmäßig verteilt, als dass eine klare Unterscheidung möglich ist. Weitere Studien sind notwendig, um die Schwellenwerte der Cell-Dyn 3000[®] für atypische Signale zu verbessern und genauere Aussagen über die Verlaufsprognose von malariakranken Patienten zu ermöglichen.

6 Abkürzungsverzeichnis

®	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
A	Österreich
Abb.	Abbildung
AGP	atypisches grünes Punktsignal
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ARDS	adult respiratory distress syndrome
arithm.	arithmetisch
asympt.	asymptomatisch
AVP	atypisches violette Punktsignal
BCS	Blantyre Coma Scale
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CSA	Chondroitinsulfat A
D	Deutschland
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
dep	depolarisierend
d.h.	das heißt
DIC	disseminated intravascular coagulation
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic acid
EIR	entomologische Inokulationsrate
et al.	et alii
etc.	et cetera
g	Gramm
GB	Großbritannien
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	hyaluronic acid

HDL	high-density lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HRP-2	histidine rich protein 2
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
Inc.	incorporated
IRDS	infant respiratory distress syndrome
K	Tausend
KI	Konfidenzintervall
km	Kilometer
km ²	Quadratkilometer
kompl.	kompliziert
li.	links
LJ.	Lebensjahr
LUC	large unstained lymphocytes
M	Millionen
M.A.P.S.S. TM	multi-angle polarized scatter separation
ME	Median
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmol	Millimol
MW	Mittelwert
mW	Milliwatt
N	Anzahl
nm	Nanometer
NO	Stickoxid

O ₂ ⁻	Superoxidation
OH ⁻	Hydroxylradikal
P	Wahrscheinlichkeit
Parasit.	Parasitämie
PCM	pigment containing monocyte
PCN	pigment containing neutrophile
PCR	polymerase chain reaction
PfEMP ₁	<i>plasmodium falciparum</i> erythrozyte membrane protein 1
Pfhrp	<i>Plasmodium falciparum</i> histidine rich Proteine
pH	pondus hydrogenii
P.	<i>Plasmodium</i>
pLDH	plasmodienspezifische Laktatdehydrogenase
pol	polarisierend
QBC [®]	quantitative buffy coat
r	rho
re.	rechts
RNA	ribonucleic acid
ROC-Kurve	receiver-operating-characteristic-Kurve
RW	Reichweite
SA	Standardabweichung
SP	Sulfadoxin/Pyrimethamin
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TM	trademark
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	und andere
unkompl.	unkompliziert
URTI	upper respiratory tract infection
USA	United States of America
vgl.	vergleiche
vs.	versus

WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
µl	Mikroliter

7 Anhang – Studien-Datenblatt und Rohdaten

Cell-Dyn Flowcytometry case report sheet

Study ID CD- Ex: y n Cell-Dyn Sequence: Date:

Cross-reference to Study (name): Patient ID in this study:

Patient initials: Age (y): Sex (m/f): m f

Admission note: healthy (no palu): y n

Established Dx: impcn y n Prostr y n

Clinical notes, if relevant:

Hypogl y n anemia y n

Convul y n Coma y n

Parasit y n ards y n

Duration of clinical Symptoms (d): Temperature (C):

If malaria: severe/non-severe, according to WHO-definition (s/n): s n cerebral: y n

Patient treated/untreated/hospitalized (t/u/h): t u h Patient admitted to:

Outcome, if applicable:

Thick smear results

Plamodium falciparum: /ul

Haemozoin (neutrophils): % Haemozoin (monocytes): %

Cell-Dyn results

WBC Total	<input type="text"/> K/ul	%100	<input type="text"/>	Scatter Eosinophiles: <input type="radio"/> no <input type="radio"/> few <input type="radio"/> many (>10)	axe 25%:	<input type="text"/>		
Neutrophils	<input type="text"/>	%90	<input type="text"/>		axe 33%:	<input type="text"/>		
Lymphocytes	<input type="text"/>	%80	<input type="text"/>		<input type="radio"/> no <input type="radio"/> few <input type="radio"/> many (>10)	pixMax1: <input type="radio"/> y <input type="radio"/> n		
Monocytes	<input type="text"/>	%70	<input type="text"/>				<input type="radio"/> no <input type="radio"/> few <input type="radio"/> many (>10)	pixMax2: <input type="radio"/> y <input type="radio"/> n
Eosinophils	<input type="text"/>	%60	<input type="text"/>					
Basophils	<input type="text"/>	%50	<input type="text"/>					
RBC	<input type="text"/> M/ul	%40	<input type="text"/>					
Hb	<input type="text"/> g/dl	%30	<input type="text"/>					
Hkt	<input type="text"/> %	%20	<input type="text"/>					
Plt	<input type="text"/> K/ul	%10	<input type="text"/>	Monozyte Scatter				

Scatter profile

Monocytes: normal/abnormal (n/a) n a No. of purple dots (2.try):

Eosinophils: normal/abnormal (n/a) n a Shape:

Remarks:

Abb. 23: Studien-Datenblatt, welches zur Erhebung der Patientendaten benutzt wurde

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [K/μl]	4,2 - 35,2		4,2 - 16,6	9,1 - 19,7
	M [K/μl]	9,1		9,8	13,7
	MW [K/μl]	9,6		9,4	14,0
	KI [K/μl]	9,1 - 10,1		7,8 - 11,1	5,3 - 22,8
	SA [K/μl]	3,7		3,5	5,5
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [K/μl]	4,3 - 9,3		2,9 - 18,2	2,3 - 26,6
	M [K/μl]	6,8		7,8	8,8
	MW [K/μl]	6,8		8,9	10,6
	KI [K/μl]	-25,0 - 38,6		7,6 - 10,3	8,3 - 12,9
	SA [K/μl]	3,5		4	5,9
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [K/μl]	5,0 - 6,8		2,0 - 13,4	3,8 - 19,2
	M [K/μl]	5,9		6,4	7,7
	MW [K/μl]	5,9		6,8	7,8
	KI [K/μl]	-5,5 - 17,3		6,0 - 7,6	5,9 - 9,6
	SA [K/μl]	1,3		2,8	3,8
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [K/μl]	2,7 - 26,1	3,0 - 17,3	2,9 - 14,6	
	M [K/μl]	7,4	7,2	6,4	
	MW [K/μl]	8,0	7,8	7,1	
	KI [K/μl]	7,8 - 8,2	7,1 - 8,5	6,0 - 8,2	
	SA [K/μl]	2,8	2,6	3	

Tab. 26: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Leukozytenzahlen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [K/ μ l]	0,4 - 28,3		0,8 - 8,9	2,5 - 8,9
	M [K/ μ l]	1,9		2,4	2,7
	MW [K/ μ l]	2,7		2,9	4,2
	KI [K/ μ l]	2,3 - 3,1		2,0 - 3,7	-10
	SA [K/ μ l]	2,8		1,8	3,2
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [K/ μ l]	1,2 - 1,7		1,1 - 8,4	1,0 - 13,8
	M [K/ μ l]	1,5		3,1	3,8
	MW [K/ μ l]	1,5		3,9	4,8
	KI [K/ μ l]	-1,7 - 4,6		3,2 - 4,5	3,5 - 6,1
	SA [K/ μ l]	0,4		2,0	3,4
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [K/ μ l]	2,8 - 5,0		1,0 - 10,4	0,7 - 7,6
	M [K/ μ l]	3,9		2,9	4,9
	MW [K/ μ l]	3,9		3,4	4,3
	KI [K/ μ l]	-10,1 - 17,9		2,8 - 4,0	3,3 - 5,2
	SA [K/ μ l]	1,6		2,0	2,0
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [K/ μ l]	1,2 - 23,8	1,2 - 15,5	1,5 - 11,3	
	M [K/ μ l]	4,4	4,4	3,9	
	MW [K/ μ l]	5,1	5	4,8	
	KI [K/ μ l]	4,8 - 5,3	4,4 - 5,6	3,9 - 5,8	
	SA [K/ μ l]	2,6	2,4	2,6	

Tab. 27: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Neutrophilen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [K/ μ l]	1,3 - 13,5		1,3 - 9,6	4,2 - 9,4
	M [K/ μ l]	5,4		3,5	5,9
	MW [K/ μ l]	5,6		4,3	6,3
	KI [K/ μ l]	5,3 - 5,9		3,2 - 5,4	2,5 - 10,1
	SA [K/ μ l]	1,9		2,4	2,4
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [K/ μ l]	2,3 - 5,0		0,4 - 9,0	0,9 - 7,6
	M [K/ μ l]	3,7		2,5	2,6
	MW [K/ μ l]	3,7		3,2	3,4
	KI [K/ μ l]	-13,5 - 20,8		2,5 - 4,0	2,6 - 4,3
	SA [K/ μ l]	1,9		2,3	2,2
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [K/ μ l]	1,3 - 1,6		0,4 - 8,5	0,4 - 10,3
	M [K/ μ l]	1,5		1,8	1,4
	MW [K/ μ l]	1,5		2	2
	KI [K/ μ l]	-0,5 - 3,4		1,6 - 2,5	1,0 - 3,1
	SA [K/ μ l]	0,2		1,4	2,2
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [K/ μ l]	0,3 - 6,0	0,6 - 3,8	0,3 - 3,3	
	M [K/ μ l]	1,8	1,5	0,9	
	MW [K/ μ l]	1,8	1,7	1,2	
	KI [K/ μ l]	1,8 - 1,9	1,5 - 1,9	1,0 - 1,5	
	SA [K/ μ l]	0,7	0,7	0,7	

Tab. 28: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Lymphozytenzahlen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [K/ μ l]	0,0 - 2,7		0,6 - 3,8	1,7 - 3,7
	M [K/ μ l]	0,7		1,7	2,1
	MW [K/ μ l]	0,8		1,8	2,4
	KI [K/ μ l]	0,7 - 0,9		1,4 - 2,2	0,9 - 3,8
	SA [K/ μ l]	0,5		0,8	0,9
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [K/ μ l]	0,5 - 0,7		0,2 - 4,0	0,2 - 5,8
	M [K/ μ l]	0,6		1,3	1,1
	MW [K/ μ l]	0,6		1,3	1,8
	KI [K/ μ l]	-0,7 - 1,9		1,0 - 1,6	1,2 - 2,4
	SA [K/ μ l]	0,1		0,8	1,5
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [K/ μ l]	0,3 - 0,3		0,2 - 2,6	0,2 - 4,3
	M [K/ μ l]	0,3		0,9	0,6
	MW [K/ μ l]	0,3		0,9	1
	KI [K/ μ l]	0,3 - 0,3		0,7 - 1,0	0,5 - 1,4
	SA [K/ μ l]	0,0		0,5	1,0
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [K/ μ l]	0,1 - 1,5	0,1 - 1,6	0,1 - 2,7	
	M [K/ μ l]	0,4	0,6	0,6	
	MW [K/ μ l]	0,5	0,6	0,8	
	KI [K/ μ l]	0,4 - 0,5	0,5 - 0,7	0,6 - 1,0	
	SA [K/ μ l]	0,2	0,3	0,5	

Tab. 29: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Monozytenzahlen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [K/ μ l]	0,0 - 2,7		0,0 - 0,7	0,1 - 0,8
	M [K/ μ l]	0,3		0,1	0,2
	MW [K/ μ l]	0,4		0,2	0,3
	KI [K/ μ l]	0,3 - 0,4		0,1 - 0,3	-0,2 - 0,8
	SA [K/ μ l]	0,4		0,2	0,3
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [K/ μ l]	0,2 - 1,8		0,0 - 5,0	0,0 - 1,1
	M [K/ μ l]	1		0,2	0,2
	MW [K/ μ l]	1		0,4	0,3
	KI [K/ μ l]	-9,2 - 11,2		0,1 - 0,6	0,2 - 0,5
	SA [K/ μ l]	1,1		0,8	0,3
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [K/ μ l]	0,0 - 0,2		0,0 - 6,6	0,1 - 1,7
	M [K/ μ l]	0,1		0,1	0,2
	MW [K/ μ l]	0,1		0,4	0,4
	KI [K/ μ l]	-1,2 - 1,4		0,0 - 0,8	0,2 - 0,6
	SA [K/ μ l]	0,1		1,2	0,4
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [K/ μ l]	0,0 - 4,8	0,0 - 3,3	0,0 - 1,7	
	M [K/ μ l]	0,4	0,2	0,2	
	MW [K/ μ l]	0,6	0,5	0,3	
	KI [K/ μ l]	0,5 - 0,6	0,3 - 0,7	0,1 - 0,4	
	SA [K/ μ l]	0,6	0,7	0,3	

Tab. 30: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Eosinophilen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [K/μl]	0,0 - 0,6		0,1 - 1,4	0,1 - 1,8
	M [K/μl]	0,1		0,2	0,8
	MW [K/μl]	0,1		0,3	0,9
	KI [K/μl]	0,1 - 0,2		0,1 - 0,4	-0,4 - 2,2
	SA [K/μl]	0,1		0,3	0,8
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [K/μl]	0,1 - 0,1		0,0 - 1,1	0,0 - 1,1
	M [K/μl]	0,1		0,1	0,1
	MW [K/μl]	0,1		0,2	0,2
	KI [K/μl]	0,1 - 0,1		0,1 - 0,2	0,1 - 0,3
	SA [K/μl]	0		0,2	0,2
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [K/μl]	0,0 - 0,1		0,0 - 0,6	0,0 - 0,6
	M [K/μl]	0,1		0,1	0,1
	MW [K/μl]	0,1		0,1	0,1
	KI [K/μl]	-0,6 - 0,7		0,1 - 0,1	0,1 - 0,2
	SA [K/μl]	0,1		0,1	0,1
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [K/μl]	0,0 - 0,3	0,0 - 0,1	0,0 - 0,3	
	M [K/μl]	0,1	0,0	0,0	
	MW [K/μl]	0,1	0,0	0,1	
	KI [K/μl]	0,1 - 0,1	0,0 - 0,1	0,0 - 0,1	
	SA [K/μl]	0,1	0,1	0,1	

Tab. 31: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Basophilen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	211		18	4
	RW [M/μl]	2,6 - 7,3		2,4 - 5,0	0,8 - 2,4
	M [M/μl]	4,2		3,7	2,1
	MW [M/μl]	4,1		3,7	1,8
	KI [M/μl]	4,1 - 4,2		3,3 - 4,0	0,7 - 3,0
	SA [K/μl]	0,6		0,7	0,7
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		36	24
	RW [M/μl]	3,7 - 4,1		2,3 - 5,6	1,2 - 5,2
	M [M/μl]	3,9		3,4	2,9
	MW [M/μl]	3,9		3,5	2,9
	KI [M/μl]	1,4 - 6,4		3,3 - 3,8	2,5 - 3,3
	SA [M/μl]	0,3		0,8	1,0
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		42	18
	RW [M/μl]	3,2 - 3,6		2,0 - 5,2	1,6 - 4,5
	M [M/μl]	3,4		3,8	3,1
	MW [M/μl]	3,4		3,7	3,1
	KI [M/μl]	1,2 - 5,6		3,4 - 3,9	2,7 - 3,6
	SA [M/μl]	0,2		0,8	0,9
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	589	54	31	
	RW [M/μl]	1,2 - 6,5	1,8 - 5,2	2,7 - 4,2	
	M [M/μl]	3,7	3,4	3,4	
	MW [M/μl]	3,7	3,3	3,4	
	KI [M/μl]	3,7 - 3,8	3,1 - 3,5	3,3 - 3,6	
	SA [M/μl]	0,5	0,6	0,4	

Tab. 32: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Erythrozytenzahlen in Millionen/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	212		20	4
	RW [g/dl]	7,2 - 16,6		6,2 - 10,5	1,7 - 5,3
	M [g/dl]	9,9		8,6	5
	MW [g/dl]	9,8		8,3	4,3
	KI [g/dl]	9,7 - 10,0		7,7 - 8,8	1,5 - 7,0
	SA [g/dl]	1,1		1,2	1,7
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		37	28
	RW [g/dl]	10,2 - 10,2		5,7 - 13,0	2,9 - 11,8
	M [g/dl]	10,2		8,6	6,3
	MW [g/dl]	10,2		8,3	6,5
	KI [g/dl]	10,2 - 10,2		7,8 - 8,9	5,7 - 7,4
	SA [g/dl]	0,0		1,7	2,2
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		44	19
	RW [g/dl]	10,0 - 11,2		5,3 - 12,9	4,3 - 11,5
	M [g/dl]	10,6		8,9	7,9
	MW [g/dl]	10,6		8,9	7,8
	KI [g/dl]	3,0 - 18,2		8,4 - 9,5	6,7 - 8,9
	SA [g/dl]	0,8		1,8	2,2
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [g/dl]	3,5 - 17,6	4,8 - 13,3	7,2 - 12,0	
	M [g/dl]	9,9	9,0	9,2	
	MW [g/dl]	9,9	9,0	9,3	
	KI [g/dl]	9,8 - 10,0	8,5 - 9,4	8,8 - 9,8	
	SA [g/dl]	1,4	1,6	1,4	

Tab. 33: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Hämoglobinkonz. in Gramm/Deziliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	211		18	4
	RW [in %]	20,8 - 53,5		18,8 - 30,1	5,3 - 16,1
	M [in %]	28,7		24,8	15,5
	MW [in %]	28,8		24	13,1
	KI [in %]	28,4 - 29,2		22,4 - 25,7	4,8 - 21,4
	SA [in %]	3,4		3,3	5,2
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		36	24
	RW [in %]	29,3 - 32,0		15,8 - 43,3	9,6 - 38,3
	M [in %]	30,7		25,3	18,4
	MW [in %]	30,7		25,4	20,7
	KI [in %]	13,5 - 47,8		23,6 - 27,3	17,6 - 23,7
	SA [in %]	1,9		5,6	7,2
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		42	18
	RW [in %]	28,7 - 31,8		16,2 - 37,1	13,3 - 35,8
	M [in %]	30,3		28,6	22,6
	MW [in %]	30,3		27,4	23,3
	KI [in %]	10,6 - 49,9		25,6 - 29,2	19,7 - 26,8
	SA [in %]	2,2		5,8	7,1
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	589	54	31	
	RW [in %]	10,5 - 55,6	13,7 - 42,4	21,3 - 35,0	
	M [in %]	28,9	27,4	26,7	
	MW [in %]	29,3	27,2	27	
	KI [in %]	28,9 - 29,6	25,7 - 28,7	25,6 - 28,4	
	SA [in %]	4,2	5,4	3,8	

Tab. 34: Tabellarische Darstellung der Verteilung des Hämatokrits in Prozent (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Säuglinge (bis 1. LJ)	N	210		18	4
	RW [K/μl]	100 - 769		65 - 427	83 - 244
	M [K/μl]	423		146	136
	MW [K/μl]	430		163	150
	KI [K/μl]	414 - 447		118 - 208	41 - 258
	SA [K/μl]	121		91	68
Kleinkinder (2. - 3. LJ)	N	2		36	24
	RW [K/μl]	266 - 322		37 - 513	35 - 430
	M [K/μl]	294		136	113
	MW [K/μl]	294		148	139
	KI [K/μl]	-62 - 650		118 - 178	98 - 179
	SA [K/μl]	40		90	96
Schulkinder (4. - 14. LJ)	N	2		42	18
	RW [K/μl]	155 - 179		47 - 269	23 - 364
	M [K/μl]	167		115	67
	MW [K/μl]	167		130	102
	KI [K/μl]	15 - 319		111 - 150	58 - 145
	SA [K/μl]	17		63	87
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	587	54	31	
	RW [K/μl]	20 - 500	65 - 380	18 - 344	
	M [K/μl]	207	183	98	
	MW [K/μl]	211	190	120	
	KI [K/μl]	206 - 216	174 - 207	94 - 146	
	SA [K/μl]	59	60	71	

Tab. 35: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Thrombozytenzahlen in Tausend/Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

Altersgruppen		Diagnosegruppen			
		keine Malaria	asympt. Parasit.	unkompl. Malaria	kompl. Malaria
Kinder (Geburt - 14. LJ)	N	216		101	51
	RW [μ l]	0 - 0		70 - 250.000	440 - 996.000
	M [μ l]	0		34.200	142.000
	MW [μ l]	0		55.125	245.779
	KI [μ l]	0 - 0		43.277 - 66.972	169.243 - 322.315
	SA [μ l]	0		60.014	272.122
Erwachsene (ab 15. LJ)	N	591	55	32	
	RW [μ l]	0 - 0	12 - 18.600	0 - 170.000	
	M [μ l]	0	700	6.450	
	MW [μ l]	0	2.174	17.396	
	KI [μ l]	0 - 0	1.150 - 3.198	4.929 - 29.862	
	SA [μ l]	0	3.788	34.577	

Tab. 36: Tabellarische Darstellung der Verteilung der Parasitämien pro Mikroliter (N=Anzahl Probanden; R=Reichweite; M=Median; MW=Mittelwert; KI=Konfidenzintervall; SA=Standardabweichung)

8 Literaturverzeichnis

1. Abbott Diagnostics. Bedienungsanleitung CELL-DYN(R) 3000, 82-8841/R2. Allgemeine Systemfunktionen. 1996.
2. Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadegesin RA. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1998;92(1):54-6.
3. Apitzsch L, Rasch G, Kiehl W. Imported malaria in Germany in 1996. *Euro.Surveill* 1998;3(4):35-6.
4. Atamna H, Ginsburg H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 1993;61(2):231-41.
5. Bain B. *Blood Cells: A Practical Guide*. 3ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2002.
6. Beeson JG, Brown GV. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol.Life Sci.* 2002;59(2):258-71.
7. Biswas S, Karmarkar MG, Sharma YD. Antibodies detected against *Plasmodium falciparum* haemozoin with inhibitory properties to cytokine production. *FEMS Microbiol.Lett.* 2001;194(2):175-9.
8. Bohle DS, Dinnebier RE, Madsen SK, Stephens PW. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *J.Biol.Chem.* 1997;272(2):713-6.
9. Bradley DJ, Warhurst DC, Blaze M, Smith V, Williams J. Malaria imported into the United Kingdom in 1996. *Euro.Surveill* 1998;3(4):40-2.
10. Brown GV, Battye FL, Howard RJ. Separation of stages of *Plasmodium falciparum*-infected cells by means of a fluorescence-activated cell sorter. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1980;29(6):1147-9.
11. Bunyaratvej A, Butthep P, Bunyaratvej P. Cytometric analysis of blood cells from malaria-infected patients and in vitro infected blood. *Cytometry* 1993;14(1):81-5.
12. Burchard GD. Malariaschnelltests. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 1999;42:643-9.
13. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin.Microbiol.Rev.* 2000;13(3):439-50.

14. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Proc.Natl.Electronics Conf. 1956;12:1034.
15. Crespo S, Palacios G, Scott S, Lago M, Puente S, Martinez M et al. Abnormal depolarizing patterns in three patients with filarial infection. Ann.Hematol. 2004;83(5):313-5.
16. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. Nature 1953;171(4340):37-8.
17. Day NP, Pham TD, Phan TL, Dinh XS, Pham PL, Ly VC et al. Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. Blood 1996;88(12):4694-700.
18. Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. Nature 1995;374(6519):269-71.
19. Duffy PE, Fried M. *Plasmodium falciparum* adhesion in the placenta. Curr.Opin.Microbiol. 2003;6(4):371-6.
20. Eckman JR, Modler S, Eaton JW, Berger E, Engel RR. Host heme catabolism in drug-sensitive and drug-resistant malaria. J.Lab Clin.Med. 1977;90(4):767-70.
21. Edington GM. Pathology of malaria in West Africa. Br.Med.J. 1967;1(542):715-8.
22. Egan TJ, Mavuso WW, Ncokazi KK. The mechanism of beta-hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. Biochemistry 2001;40(1):204-13.
23. Fairfield AS, Abosch A, Ranz A, Eaton JW, Meshnick SR. Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. Mol.Biochem.Parasitol. 1988;30(1):77-82.
24. Fialon P, Macaigne F, Becker M, Boisseau MR, Cazenave J, Ripert C. [Hematologic features in imported malaria. Value for the diagnosis of forms with low parasitemia]. Pathol.Biol.(Paris) 1991;39(2):122-5.
25. Fiori PL, Rappelli P, Mirkarimi SN, Ginsburg H, Cappuccinelli P, Turrini F. Reduced microbicidal and anti-tumour activities of human monocytes after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. Parasite Immunol. 1993;15(12):647-55.
26. Fitch CD, Cai GZ, Chen YF, Shoemaker JD. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. Biochim.Biophys.Acta 1999;1454(1):31-7.

27. Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Banerjee D, Goldberg DE. Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation. *Mol.Biochem.Parasitol.* 1996;83(2):189-200.
28. Francis SE, Sullivan DJ, Jr., Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu.Rev.Microbiol.* 1997;51:97-123.
29. Franklin RM, Brun R, Grieder A. Microscopic and flow cytophotometric analysis of parasitemia in cultures of *Plasmodium falciparum* vitally stained with Hoechst 33342--application to studies of antimalarial agents. *Z.Parasitenkd.* 1986;72(2):201-12.
30. Frerichs FT. *Klinik der Leberkrankheiten.* Braunschweig: Viewig,F.und Sohn; 1858.
31. Giacomini T, Lusina D, Foubard S, Baledent F, Guibert F, Le Penne MP. [Biological diagnosis of malaria: dangers of the automated blood differential count]. *Bull.Soc.Pathol.Exot.* 1991;84(4):330-7.
32. Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem.Pharmacol.* 1998;56(10):1305-13.
33. Giribaldi G, Ulliers D, Schwarzer E, Roberts I, Piacibello W, Arese P. Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. *Haematologica* 2004;89(4):492-3.
34. Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Smith CE, Duffin KL, Goldberg DE. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J.Clin.Invest* 1994;93(4):1602-8.
35. Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Bryceson AD, Palit A. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet* 1972;1(7743):169-72.
36. Greenwood BM, Playfair JH, Torrigiani G. Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics. *Clin.Exp.Immunol.* 1971;8(3):467-78.
37. Grobusch MP. Self-diagnosis and self-treatment. In: Keystone J, Kozarsky P, Nothdurft H, Freedman D, Connor B, editors. *Travel Medicine.* London: Mosby; 2003.
38. Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, Jelinek T, Warhurst DC. False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet* 1999;353(9149):297.

39. Grobusch MP, Hanscheid T, Gobels K, Slevogt H, Zoller T, Rogler G et al. Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travellers returning to Berlin, Germany. *Parasitol.Res.* 2003;89(5):354-7.
40. Grobusch MP, Hanscheid T, Kramer B, Neukammer J, May J, Seybold J et al. Sensitivity of hemozoin detection by automated flow cytometry in non- and semi-immune malaria patients. *Cytometry* 2003;55B(1):46-51.
41. Grobusch MP, Hanscheid T, Zoller T, Jelinek T, Burchard GD. Rapid immunochromatographic malarial antigen detection unreliable for detecting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2002;21(11):818-20.
42. Grobusch MP, Jelinek T, Hanscheid T. False positivity of rapid antigen detection tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria: issue appears to be more complicated than presented. *J.Clin.Microbiol.* 1999;37(11):3781-2.
43. Grobusch MP, Kremsner PG. Uncomplicated malaria. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2005;295:83-104.
44. Grogan JL, Kremsner PG, Deelder AM, Yazdanbakhsh M. Elevated proliferation and interleukin-4 release from CD4+ cells after chemotherapy in human *Schistosoma haematobium* infection. *Eur.J.Immunol.* 1996;26(6):1365-70.
45. Hanscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin.Lab Haematol.* 1999;21(4):235-45.
46. Hanscheid T, Melo-Cristino J, Pinto BG. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2001;64(5-6):290-2.
47. Hanscheid T, Pinto BG, Cristino JM, Grobusch MP. Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500: What does the instrument detect? *Clin.Lab Haematol.* 2000;22(5):259-61.
48. Hanscheid T, Valadas E. Malaria diagnosis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1999;61(2):179.
49. Hanscheid T, Valadas E, Grobusch MP. Automated malaria diagnosis using pigment detection. *Parasitol.Today* 2000;16(12):549-51.
50. Hansen-Prus OC. The circulating blood cells as seen by dark-ground illumination. *Am.J.Clin.Pathol.* 1936;6:423-31.
51. Ho M, Webster HK. Immunology of human malaria. A cellular perspective. *Parasite Immunol.* 1989;11(2):105-16.

52. Hoffmann JJ, Pennings JM. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin.Lab Haematol.* 1999;21(4):257-60.
53. Janeway CA, Jr., Travers P. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* 2nd ed.ed. London, England: Current Biology Ltd.; 1996.
54. Jelinek T, Nothdurft HD, Loscher T. Malaria in Nonimmune Travelers: A Synopsis of History, Symptoms, and Treatment in 160 Patients. *J.Travel.Med.* 1994;1(4):199-202.
55. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z et al. Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin.Infect.Dis.* 2002;34(5):572-6.
56. Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin.Infect.Dis.* 1998;27(1):142-9.
57. Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect.Immun.* 2004;72(8):4868-73.
58. Klein Klouwenberg PM, Oyakhirome S, Schwarz NG, Glaser B, Issifou S, Kiessling G et al. Malaria and asymptomatic parasitaemia in Gabonese infants under the age of 3 months. *Acta Trop.* 2005;95(2):81-5.
59. Kramer B, Grobusch MP, Suttorp N, Neukammer J, Rinneberg H. Relative frequency of malaria pigment-carrying monocytes of nonimmune and semi-immune patients from flow cytometric depolarized side scatter. *Cytometry* 2001;45(2):133-40.
60. Kremsner PG. Malaria in Central Europe: fears and facts. *Wien.Klin.Wochenschr.* 2000;112(10):421-2.
61. Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial combinations. *Lancet* 2004;364(9430):285-94.
62. Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY. Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. *J.Cell Biol.* 1985;101(6):2302-9.
63. Lawrence C. Laveran remembered: malaria haemozoin in leucocytes. *Lancet* 1999;353(9167):1852.
64. Lawrence C, Olson JA. Birefringent hemozoin identifies malaria. *Am.J.Clin.Pathol.* 1986;86(3):360-3.

65. Legros F, Danis M. Surveillance of malaria in European Union countries. *Euro.Surveill* 1998;3(5):45-7.
66. Lyke KE, Diallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A et al. Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2003;69(3):253-9.
67. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am.J.Pathol.* 1985;119(3):385-401.
68. Makler MT, Lee LG, Recktenwald D. Thiazole orange: a new dye for *Plasmodium* species analysis. *Cytometry* 1987;8(6):568-70.
69. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J.Clin.Microbiol.* 2005;43(8):3630-5.
70. Meckel H. Über schwarzes Pigment in der Milz und dem Blut einer Geisteskranken. *Zeitschrift für Psychatrie* 1847:193.
71. Mendelow BV, Lyons C, Nhlangothi P, Tana M, Munster M, Wypkema E et al. Automated malaria detection by depolarization of laser light. *Br.J.Haematol.* 1999;104(3):499-503.
72. Metzger WG, Mordmuller BG, Kremsner PG. Malaria pigment in leucocytes. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1995;89(6):637-8.
73. Molineaux L. Malaria and mortality: some epidemiological considerations. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 1997;91(7):811-25.
74. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin.Microbiol.Rev.* 2002;15(1):66-78.
75. Mullaney PF, Van Dilla MA, Coulter JR, Dean PN. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev.Sci.Instrum.* 1969;40(8):1029-32.
76. Nguyen PH, Day N, Pham TD, Ferguson DJ, White NJ. Intraleukocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1995;89(2):200-4.
77. Oliveira MF, d'Avila JC, Torres CR, Oliveira PL, Tempone AJ, Rumjanek FD et al. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 2000;111(1):217-21.

78. Oliaro PL, Goldberg DE. The *Plasmodium* digestive Vacuole: Metabolic Headquarters and Choice Drug Target. *Parasitol.Today* 1995;11(8):294-7.
79. Orjih AU, Fitch CD. Hemozoin production by *Plasmodium falciparum*: variation with strain and exposure to chloroquine. *Biochim.Biophys.Acta* 1993;1157(3):270-4.
80. Padial MM, Subirats M, Puente S, Lago M, Crespo S, Palacios G et al. Sensitivity of laser light depolarization analysis for detection of malaria in blood samples. *J.Med.Microbiol.* 2005;54(Pt 5):449-52.
81. Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* 2000;404(6775):307-10.
82. Pandey AV, Babbarwal VK, Okoyeh JN, Joshi RM, Puri SK, Singh RL et al. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003;308(4):736-43.
83. Pandey AV, Bisht H, Babbarwal VK, Srivastava J, Pandey KC, Chauhan VS. Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem.J.* 2001;355(Pt 2):333-8.
84. Perkins DJ, Moore JM, Otieno J, Shi YP, Nahlen BL, Udhayakumar V et al. In vivo acquisition of hemozoin by placental blood mononuclear cells suppresses PGE2, TNF-alpha, and IL-10. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003;311(4):839-46.
85. Phillips-Howard PA, Radalowicz A, Mitchell J, Bradley DJ. Risk of malaria in British residents returning from malarious areas. *BMJ* 1990;300(6723):499-503.
86. Pichyangkul S, Saengkrai P, Webster HK. *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1994;51(4):430-5.
87. Pichyangkul S, Saengkrai P, Yongvanitchit K, Heppner DG, Kyle DE, Webster HK. Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1997;57(4):383-8.
88. Prada J, Malinowski J, Muller S, Bienzle U, Kremsner PG. Hemozoin differentially modulates the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor in murine malaria. *Eur.Cytokine Netw.* 1995;6(2):109-12.

89. Ramharter M, Grobusch MP, Kiessling G, Adegnika AA, Moller U, Agnandji ST et al. Clinical and parasitological characteristics of puerperal malaria. *J.Infect.Dis.* 2005;191(6):1005-9.
90. Risch L, Bader M, Huber AR. Self-use of rapid tests for malaria diagnosis. *Lancet* 2000;355(9199):237.
91. Salzman GC, Crowell JM, Martin JC, Trujillo TT, Romero A, Mullaney PF et al. Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytol.* 1975;19(4):374-7.
92. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infect.Immun.* 1998;66(4):1601-6.
93. Schwarzer E, Arese P. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 1996;1316(3):169-75.
94. Schwarzer E, Kuhn H, Valente E, Arese P. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* 2003;101(2):722-8.
95. Schwarzer E, Turrini F, Giribaldi G, Cappadoro M, Arese P. Phagocytosis of *P. falciparum* malarial pigment hemozoin by human monocytes inactivates monocyte protein kinase C. *Biochim.Biophys.Acta* 1993;1181(1):51-4.
96. Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J.Exp.Med.* 1992;176(4):1033-41.
97. Scott CS, Van Zyl D, Ho E, Meyersfeld D, Ruivo L, Mendelow BV et al. Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis. *Clin.Lab Haematol.* 2003;25(2):77-86.
98. Scott CS, Van Zyl D, Ho E, Ruivo L, Kunz D, Coetzer TL. Patterns of pseudo-reticulocytosis in malaria: fluorescent analysis with the Cell-Dyn CD4000. *Clin.Lab Haematol.* 2002;24(1):15-20.
99. Sherman IW. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull.World Health Organ* 1977;55(2-3):265-76.
100. Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several

- potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *J.Inflamm.* 1995;45(2):85-96.
101. Silamut K, White NJ. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1993;87(4):436-43.
 102. Slater AF, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 1992;355(6356):167-9.
 103. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2001;64(1-2 Suppl):28-35.
 104. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA et al. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J.Infect.Dis.* 1999;179(6):1580-3.
 105. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Lau A, Meshnick SR. Placental haemozoin and malaria in pregnancy. *Placenta* 2000;21(4):417-21.
 106. Sullivan DJ, Jr., Gluzman IY, Goldberg DE. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* 1996;271(5246):219-22.
 107. Sylla EH, Lell B, Kun JF, Kremsner PG. *Plasmodium falciparum* transmission intensity and infection rates in children in Gabon. *Parasitol.Res.* 2001;87(7):530-3.
 108. Tappel AL. The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by heme compounds. *Arch.Biochem.Biophys.* 1953;44(2):378-95.
 109. Taramelli D, Basilico N, Pagani E, Grande R, Monti D, Ghione M et al. The heme moiety of malaria pigment (beta-hematin) mediates the inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Exp.Parasitol.* 1995;81(4):501-11.
 110. Terstappen LW, de Groot BG, Visscher K, van Kouterik FA, Greve J. Four-parameter white blood cell differential counting based on light scattering measurements. *Cytometry* 1988;9(1):39-43.
 111. Troye-Blomberg M, Perlmann P. T cell functions in *Plasmodium falciparum* and other malarias. *Prog.Allergy* 1988;41:253-87.
 112. UNICEF and WHO. Africa Malaria Report. 2006.

113. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1969;163(872):1213-4.
114. van Vianen PH, van Engen A, Thaithong S, van der KM, Tanke HJ, van der Kaay HJ et al. Flow cytometric screening of blood samples for malaria parasites. *Cytometry* 1993;14(3):276-80.
115. Virchow R. Zur pathologischen Physiologie des Bluts. *Archiv für Pathologie und Anatomie* 1849;2:587-98.
116. Warren HS, Weidanz WP. Malarial immunodepression in vitro: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. *Eur.J.Immunol.* 1976;6(11):816-9.
117. Weidanz WP. Malaria and alterations in immune reactivity. *Br.Med.Bull.* 1982;38(2):167-72.
118. Wernli M, Tichelli A, von Planta M, Gratwohl A, Speck B. Flow cytometric monitoring of parasitaemia during treatment of severe malaria by exchange transfusion. *Eur.J.Haematol.* 1991;46(2):121-3.
119. Wever PC, Henskens YM, Kager PA, Dankert J, van Gool T. Detection of imported malaria with the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. *J.Clin.Microbiol.* 2002;40(12):4729-31.
120. Whaun JM, Rittershaus C, Ip SH. Rapid identification and detection of parasitized human red cells by automated flow cytometry. *Cytometry* 1983;4(2):117-22.
121. White NJ, Chapman D, Watt G. The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1992;86(6):590-7.
122. White NJ, Krishna S. Treatment of malaria: some considerations and limitations of the current methods of assessment. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1989;83(6):767-77.
123. WHO. Severe falciparum malaria. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2000;94(Suppl.1).
124. Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop.Med.Parasitol.* 1995;46(2):77-82.
125. Williams W.J, Beutler E., Erslev A.J., Lichtman M.A. *Hematology.* New York: McGraw-Hill; 1990.
126. Wongsrichanalai C, Namsiripongpun V, Pornsilapatip J, Kyle DE, Wilde H. Sensitivity of QBC malaria test. *Lancet* 1992;340(8822):792-3.

127. World Health Organization. The world health report 2003: shaping the future. 2003. WHO, Geneva, Switzerland.
128. Yayon A, Vande Waa JA, Yayon M, Geary TG, Jensen JB. Stage-dependent effects of chloroquine on *Plasmodium falciparum* in vitro. J.Protozool. 1983;30(4):642-7.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Grobusch für die Ermöglichung der Dissertation und die hervorragende Betreuung in Lambaréné und Tübingen.

Vielen Dank gebührt Prof. Dr. Peter Kremsner, der meinen Aufenthalt in Lambaréné ermöglichte. Ebenfalls vielen Dank an Prof. Dr. Thomas Hänscheid und Dr. Bertrand Lell, die während der Auswertung der Daten mit viel Geduld Fragen zu statistischen Problemen beantworteten.

Ich danke all meinen Kollegen in Lambaréné, die mit ihren Studien diese Untersuchungen ermöglichten. Stellvertretend für eine Vielzahl von beteiligten Mitarbeitern möchte ich folgenden Personen für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung danken: Dr. Akim Adegnika, Iris Appelmann, Dr. Sadou Issifou, Dr. Joe Jarvis, Martin Kramer, Dr. Pierre-Blaise Matsiegui, Dr. Magdalena Necek, Marc Poetschke, Dr. Annika Rudat, Dr. Sunny Oyakhirome, Dr. Dorrih Schonkeren und Dr. Norbert Schwarz.

Allen Probanden, die an dieser Studie teilgenommen und sie so überhaupt erst ermöglicht haben, bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet.

Abbott Diagnostics, insbesondere seiner Niederlassung in Libreville, ein besonderes Dankeschön für unermüdlichen Einsatz bei der Wartung und Pflege des Analysegerätes, selbst in scheinbar ausweglosen Situationen.

Vielen Dank der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mich während meines Forschungsaufenthaltes finanziell unterstützt hat.

Ein großes Dankeschön von ganzem Herzen an Daniela Schütte, die mich während meiner Dissertation seelisch und moralisch stützte.

Der größte Dank gebührt meinen lieben Eltern Margund und Werner Längin, die mich nicht nur während der Zeit in Lambaréné, sondern mein gesamtes Studium über mit Rat und Tat begleiteten und mich in allen Vorhaben unterstützten.

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Matthias Urs Längin
Geburtsdatum: 23.05.1977
Geburtsort: Lörrach
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE UND UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

08/1983–07/1987 Eichendorff-Grundschule Lörrach
07/1987–06/1996 Hebel-Gymnasium Lörrach
06/1996 Allgemeine Hochschulreife
Seit 10/1998 Studium der Humanmedizin,
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
31/08/2000 Ärztliche Vorprüfung
28/08/2001 1. Teil Ärztl. Prüfung
23/03/2005 2. Teil Ärztl. Prüfung
27/04/2006 3. Teil Ärztl. Prüfung
10/2001–09/2002 Studium der Humanmedizin (Erasmus-Programm),
Université Victor Segalen, Bordeaux, Frankreich
05/2003–04/2004 Forschungsaufenthalt, Medical Research Unit,
Hôpital du Dr. Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun

KLINISCHE AUSBILDUNG

08/1999–09/1999 Krankenpflegepraktikum, Alyn Pediatric Hospital and
Rehabilitation Center, Jerusalem, Israel
10/2001–07/2002 Blockpraktika (HNO, Päd., Ortho., Derma., Tropenmedizin),
Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Bordeaux,
Frankreich

03/2003	Famulatur Viszeral- und Unfallchirurgie (Prof. Schlickewei), St. Josefskrankenhaus, Freiburg
04/2003	Famulatur Infektiologie und Pneumologie (Prof. Suttorp), Charité Berlin
08/2003	Famulatur pädiatrische Poliklinik (Dr. Kokou), Hôpital du Dr. Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun
03/2004	Famulatur Allgemeinchirurgie (Dr. Adzoda), Hôpital du Dr. Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun
04/2005–08/2005	1. Terial PJ, Innere Medizin (Prof. Osterhues), Kreiskrankenhaus Lörrach
08/2005–11/2005	2. Terial PJ, Allgemeinchirurgie (Prof. Carvalho), Hospital Universitario Prof. Edgar Santos, Salvador, Brasilien
11/2005–02/2006	3. Terial PJ, Anästhesie (Dr. Dr. Heindl), Kreiskrankenhaus Lörrach
Seit 07/2006	Assistenarzt in der anästhesiologischen Abteilung, Kreiskrankenhaus Lörrach (Dr. Dr. Heindl)

WEITERE TÄTIGKEITEN

02/1999–02/2006	Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
09/1996–10/1997	Zivildienst in der Krankenpflege, KKH Schopfheim
11/1997–05/1998	Auslandsaufenthalt, Kibbuz Kfar Szold, Israel
06/1998–10/1998	Auslandsaufenthalt, London, Großbritannien
03/1999–08/2001	Sitzwache, Caritasverband Freiburg-Stadt e.V.

SPRACHKENNTNISSE

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Französisch	fließend in Wort und Schrift
Portugiesisch	gute Kenntnisse
Latein	Latinum