

**Nachweisgrenzen der Mikroskopie von *Plasmodium
falciparum* in einem endemischen Malariagebiet
Zentralafrikas**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Löhr, Sascha Johannes Zo-Ri

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|----|
| I. | Inhaltsverzeichnis..... | 3 |
| II. | Abkürzungen..... | 5 |
| III. | Abbildungen und –Tabellenverzeichnis | 7 |
| IV. | Hauptteil | 9 |
| 1. | Einleitung | 9 |
| 1.1. | Malaria | 9 |
| 1.1.1. | Malaria im Laufe der Geschichte..... | 9 |
| 1.1.2. | Parasit und Lebenszyklus..... | 12 |
| 1.1.3. | Krankheitsbild der Malaria | 14 |
| 1.1.4. | Epidemiologie und aktuelle Situation..... | 17 |
| 1.2. | Diagnostik der Malaria..... | 18 |
| 1.2.1. | Malariakontrolle..... | 18 |
| 1.2.2. | Goldstandard Mikroskopie des Dicken Tropfen..... | 20 |
| 1.2.3. | Alternative labortechnische Methoden | 22 |
| 1.2.4. | Probleme und Limitierung der Mikroskopie des Dicken Tropfens | 24 |
| 1.3. | <i>Limit of Blank (LoB)</i> und <i>Limit of Detection (LoD)</i> als Nachweisgrenzen.. | 24 |
| 1.4. | Hypothese und Zielsetzung der Arbeit..... | 25 |
| 2. | Methoden..... | 27 |
| 2.1. | Studienort | 27 |
| 2.2. | CLSI/NCCLS Guideline EP17..... | 29 |
| 2.3. | Studiendesign | 29 |
| 2.4. | Statistik..... | 32 |
| 2.4.1. | Statistischer Ansatz zur Bestimmung des <i>LoD</i> und <i>LoB</i> | 32 |
| 2.4.2. | Bestimmung des <i>LoB</i> | 34 |
| 2.4.3. | Determination of <i>LoD</i> | 35 |
| 2.5. | Mikroskopie des Dicken Tropfens | 37 |
| 2.5.1. | WHO-Methode | 37 |
| 2.5.2. | Lambaréné Methode | 38 |
| 2.6. | Herstellung der Dicken Tropfen..... | 40 |
| 2.6.1. | Herstellung negative dicke Tropfen..... | 40 |
| 2.6.2. | Herstellung positive Dicke Tropfen..... | 41 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 2.6.3. Färbung der Dicken Tropfen..... | 42 |
| 2.7. Randomisierung und Verblindung | 43 |
| 2.8. Lektüre der Dicken Tropfen | 45 |
| 2.9. Verifizierung mittels nested PCR..... | 45 |
| 2.10. Datenauswertung | 47 |
| 3. Material..... | 49 |
| 3.1. Equipement..... | 49 |
| 3.2. Reagenzien | 49 |
| 3.3. Mikroskopisten..... | 50 |
| 4. Ergebnisse..... | 51 |
| 4.1. <i>LoB</i> | 51 |
| 4.2. <i>LoD</i> | 53 |
| 4.2.1. Vorbereitung und Herstellung niedrig positiver Dicker Tropfen | 53 |
| 4.2.2. <i>LoD</i> Lambaréné Methode | 55 |
| 4.2.3. <i>LoD</i> WHO Methode..... | 61 |
| 4.3. Verifizierung mittels nested PCR..... | 66 |
| 5. Diskussion | 67 |
| 5.1. Stellenwert der Mikroskopie des Dicken Tropfen | 67 |
| 5.2. Einordnung der Studienresultate | 67 |
| 5.3. Vergleich mit aktueller Datenlage..... | 68 |
| 5.4. Einschränkungen der Arbeit..... | 68 |
| 5.5. Schlussfolgerung | 70 |
| 6. Zusammenfassung | 72 |
| V Literaturverzeichnis..... | 74 |
| VI Danksagung | 83 |
| VII Lebenslauf..... | 84 |
| VIII Erklärung zum Eigenanteil | 85 |

II. Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| A. | <i>Anopheles</i> |
| Abb. | Abbildung |
| ACT | <i>Artemisin-based combination therapy</i> |
| AMD | <i>Antimalarial drugs</i> |
| ARDS | <i>Acute respiratory distress syndrome</i> |
| CERMEL | <i>Centre de Recherche Medicale de Lambaréné</i> |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i> |
| CSP | <i>Circumsporozite protein</i> |
| DDT | <i>Dichloridphenyltrichlorethan</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DTG | Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| h | Stunde |
| Hb | Hämoglobin |
| HAS | <i>Hôpital Albert Schweitzer</i> |
| HPF | <i>High power field</i> |
| IL1 | <i>Interleukin 1</i> |
| LIMS | Laborinformationsmanagementsystem |
| <i>LoD</i> | <i>Limit of Detection</i> |
| <i>LoB</i> | <i>Limit of Blank</i> |
| MF | Mikroskopfaktor |
| ml | Milliliter |
| MSA1 | <i>Merozoite Surface Antigen 1</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| M. | Malaria |
| MF | Mikroskopfaktor |
| min | Minute |
| MW | Mittelwert |
| N | Anzahl |
| nPCR | <i>nested Polymerase chain reaction</i> |
| NCCLS | National Comitee for Clinical Laboratory Standards |

Abkürzungen

| | |
|--------------|---|
| neg. | negativ |
| <i>P.</i> | Plasmodium |
| pf | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfEMP 1 | <i>Plasmodium falciparum erythorcyte membrane protein 1</i> |
| PfHRP2 | <i>Plasmodium falciparum-Histidine Rich Protein 2</i> |
| pos. | positiv |
| RDT | <i>Rapid diagnostic test</i> |
| RKI | Robert Koch Institut |
| SD | Standardabweichung |
| SIRS | <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> |
| SOP | <i>Standard Operating Procedure</i> |
| ssp | Subspezies |
| tab | Tabelle |
| TNF α | Tumornekrosefaktor alpha |
| URM | <i>Unité de recherches médicales de Lambaréné</i> |
| v. Chr. | vor Christus |
| VRF | <i>Visiting Relative and Friends</i> |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| α | alpha |
| β | beta |
| μ l | Mikroliter |

III. Abbildungs und –Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb.1: P. falciparum Parasiten im Dicken Tropfen | 21 |
| Abb.2: Luftaufnahme des Areal des Hôpital Albert Schweitzer | 28 |
| Abb.3: Voraussetzungen Studiendesign..... | 30 |
| Abb.4: Arbeitsplatz Mikroskopie Dicker Tropfen | 31 |
| Abb.5: Verteilung von Messergebnissen neg. und pos. Probe | 32 |
| Abb.6: Relation LoD zu LoB | 33 |
| Abb.7: Herstellung Dicker Tropfen Lambaréné Methode..... | 38 |
| Abb.8: Beispiel <i>LoD-L-P4-3</i> : <i>LoD</i> , Lambaréné Methode, Proband Nummer 4, Färbung Nummer 3, unverblindet..... | 41 |
| Abb.9: Beispiel <i>LoD-L-4-7</i> : Studie <i>LoD</i> , Lambaréné Methode, vierte Sequenz, Dicker Tropfen Nummer 7, verblindet..... | 44 |
| Abb.10: Histogramm Lambaréné Methode | 58 |
| Abb.11: Histogramm transformiert Lambaréné Methode | 59 |
| Abb.12: Histogramm WHO Methode | 63 |
| Abb.13: Histogramm WHO Wurzeltransformation | 64 |
| Abb.14: nested PCR negative LOD-1-5 und positive LOD-11-15, C =Negativ Kontrolle | 66 |
| Tab.1: Symptomenkomplexe der komplizierten Malaria tropica..... | 15 |
| Tab.2: Anzahl zu zählende Leukozyten WHO Methode..... | 38 |
| Tab.3: Anzahl zu zählender HPFs Lambaréné Methode..... | 40 |
| Tab.4: Färbeschema Giemsalösung | 43 |
| Tab.5: 1. Pipettierschema PCR 1..... | 46 |
| Tab.6: Temperatur und Zyklen nested PCR | 47 |
| Tab.7: 2. Pipettierschema PCR 2..... | 47 |
| Tab.8: Rangfolge Lektüre LoB n=100 Messungen | 51 |
| Tab.9: Rangfolge Lektüre LoB n=160 Messungen | 52 |
| Tab.10: Initiale Parasitämie 200 HPFs in [pf/ μ l] | 53 |
| Tab.11: Herstellung Verdünnungsreihen niedrig positive Dicke Tropfen | 54 |
| Tab.12: Auswahl niedrig positive Dicke Tropfen Lambaréné-Methode..... | 55 |
| Tab.13: Auswahl niedrig positive Dicke Tropfen WHO-Methode | 55 |
| Tab.14: Parasitämie Lektüre Lambaréné Methode (n=30); [pf/ μ l] | 56 |

Abbildungs-Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab.15: Mittelwert, Median, Standardabweichung [pf/ μ l]; Lambaréné..... | 57 |
| Tab.16: Standardabweichung, Mittelwert, Median nach Wurzeltransformation; Lambaréné | 60 |
| Tab.17: Lektüre <i>LoD</i> WHO-Methode | 61 |
| Tab.18: Mittelwert (MW), Median, Standardabweichung (ST) [pf/ μ l]; WHO..... | 62 |
| Tab.19: Wurzeltransformation Standardabweichung, Mittelwert (MW), Median; WHO | 65 |

Alle Abbildungen, Photographien und Tabellen wurden, wenn nicht eindeutig anders vermerkt und gekennzeichnet vom Autor dieser Arbeit erstellt.

IV. Hauptteil

1. Einleitung

1.1. Malaria

1.1.1. Malaria im Laufe der Geschichte

„Wer in der Zukunft lesen will, muss in der Vergangenheit blättern“ bemerkte der französische Schriftsteller André Malraux und auch Dietrich von Bohnhoeffler behauptete: „Die Ehrfurcht vor der Vergangenheit und die Verantwortung gegenüber der Zukunft geben fürs Leben die richtige Haltung“. Auch im Bezug auf die Malaria sind diese Aussagen trefflich; ihr weltweiter Einfluss und Stellenwert ist deutlicher im Kontext der Geschichte zu verstehen. Ist sie uns heutzutage vor allem als Tropenerkrankung bekannt, war sie früher auch in der nördlichen Hemisphäre unter anderem in Europa und Nordamerika endemisch, ganz abgesehen von den aktuell aufgetretenen autochthonen Malariafällen in Lakonien [1, 2].

Auch bekannt als Wechsel- oder Sumpffieber leitet sich der Name Malaria etymologisch aus dem italienischem *Mala aria* – schlechte Luft ab, welcher die damals angenommene Pathogenese impliziert, die sich auf die von Hippokrates von Kos (460-377 vor Christus (v. Chr.)) begründete Miasmentheorie stützt [3]. Diese versteht giftige Ausdünstungen des Bodens als Ursache für die Übertragung und Verbreitung einer Vielzahl von Krankheiten [4, 5]. Dass Malaria vor allem in der Nähe von Sumpf- und Feuchtgebieten auftrat, schien diese Theorie zu festigen und in frankophonen Gebieten spricht man bis heute von *Paludisme*, dessen Abstammung aus dem lateinischen Wort für Sumpf *Paludis* herrührt. Es dauerte noch bis ins 19. Jahrhundert bis man sich endgültig von jener im *Corpus hippocraticum* beschriebenen Theorie abwandte.

Jedoch lässt sich die Geschichte weitaus länger, bis etwa 2700 Jahre v. Chr. bis zur Hochkultur des Alten Ägypten zurückverfolgen, wo neben den ersten Beschreibungen der Erkrankung im *Papyros Ebers* [6] auch ein DNA-Nachweis von *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica aus Gewebe von Mumien aus Theben gelang [7, 8]. Selbst die Todesursache des Pharaos *Tutanchemun* wird mit einer Malaria in Zusammenhang gebracht und kontrovers diskutiert [9, 10].

Im antiken Griechenland befassten sich neben Hippokrates unter anderem auch bedeutende griechische Philosophen wie Sokrates, Platon und sein Schüler Aristoteles mit der Beschreibung des Wechselfiebers, wie die Malaria zu Zeiten genannt wurde. Bereits Herodot (484-425 v. Chr.) erwähnt auf seiner Ägyptenreise explizit die Verwendung von Moskitonetzen, obwohl der Zusammenhang der Übertragung noch unbekannt war [11]:

Das Land wird von Schwärmen von Stechmücken befallen, und die Menschen bedienen sich verschiedener Methoden um mit ihnen fertig zu werden ... Jedermann ist mit einem Netz ausgestattet, welches er tagsüber zum Fischen gebraucht, nachts über seinem Bett festmacht und darunter schläft. (Herodot [12])

Das römische Reich wurde immer wieder von Malariaepidemien heimgesucht und es scheint erwiesen, dass die Krankheit auf der Apenninhalbinsel endemisch war und sich in dieser Zeit in Europa ausbreiten konnte [13, 14]. Gar mancher militärischer Feldzug ist entscheidend durch plötzlich auftretende Epidemien beeinflusst worden; bekannt ist die Belagerung Mantuas durch Napoleon 1796-1797 [15]. Ein weiteres Zeugnis für den großen gesellschaftlichen Einfluss in der Zeit des römischen Imperiums sind die der Göttin des Wechselfiebers, der *Dea Febris* geweihten Tempel, die in der Schrift „*De legibus II*“ des römischen Philosophen Cicero Erwähnung finden.

Der Übergang ins byzantinische Reich Konstantins und in das Frühmittelalter hat die Verbreitung der Malaria kaum beeinflusst. Kaiser Friedrich der I, bekannter als Barbarossa, musste Rom nach dessen erfolgreicher Eroberung aufgrund einer Malariaepidemie verlassen [16]. Im 18. Jahrhundert war die Malaria nicht nur in Europa, sondern auch auf allen anderen Kontinenten verbreitet, ohne dass die Wissenschaft Fortschritte im Verständnis der Erkrankung gewann [17].

Einer der ersten Meilensteine im Kampf gegen die Malaria war die Entdeckung der therapeutischen Wirkung von Rindenextrakten einiger *Cinchona* Arten vor etwa 500 Jahren durch Jesuiten im heutigen Peru. Die Isolierung des reinen Alkaloids Chinin aus dem Chinarindenbaum *Cinchona officinalis* und damit die Möglichkeit einer genauen Dosierung des Wirkstoffes gelang jedoch erst 1820 durch die Chemiker Joseph Pelletier und Jean Biename Caventou, die damit einen bis dato in dieser Form noch nicht

bekannte Hause und Export der neuen Wunderdroge bis in die entlegensten Kolonien der damaligen europäischen Großmächte auslösten [18].

Erst ab 1880 begann mit der Entdeckung des Malariaparasiten in Blutaustriechen unter dem Mikroskop durch den französischen Militärarzt Alphonse Laveran in Algerien [19], der Erkenntnis des Übertragungsmechanismus durch Mücken der Gattung *Anopheles* durch Giovanni Battista Grassi 1889 und die zeitgleichen Arbeiten von Ronald Ross, der *Culex* als Überträger der Malaria beschrieb, allmählich die Zeit des Verstehens und der Entmystifizierung der Malaria [20]. Die Gattungsbezeichnung *Plasmodium* wurde 1885 von den Italienern Marchiafava und Celli etabliert [21]. Durch den währenden wissenschaftlichen Fortschritt im 20. Jahrhundert standen nun neue, effektive Möglichkeiten für den Kampf gegen die Malaria zur Verfügung. Jedoch besonders in Kriegs- und Krisenzeiten konnte sich die Malaria mit der einhergehenden Armut immer wieder verbreiten [22, 23]. Im Zuge des Zweiten Weltkrieges 1939-1945 traten in Deutschland etwa 13000 Malariafälle auf, bevor diese in den Nachkriegsjahren stark zurückgingen. 1950 wurde in Ostfriesland der letzte autochthone Fall in Deutschland gemeldet [24, 25].

In der Nachkriegszeit wurden verschiedenen Maßnahmen, die größte war die globale Kampagne der WHO 1952-1975, die eine vollständige Eradikation der Malaria zum Ziel hatte, durchgeführt [26]. Tatsächlich konnte die Erkrankung im Laufe des 20. Jahrhunderts in Europa, Nordamerika und einigen Ländern Asiens erfolgreich zurück gedrängt werden [27]. Die ursprünglich geplante Ausrottung gelang jedoch nicht und Malaria ist und bleibt weiterhin die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit.

Als Erkrankung, die vor allem in Regionen mit hoher Bevölkerungsarmut, sowie in Kriegs- und Krisengebieten besonders stark um sich greift, hat vor allem der afrikanische Kontinent die größte Bürde mit ins 21. Jahrhundert getragen [28, 29].

Der Verlauf der Geschichte zeigt uns, dass die Malaria die Menschheit schon seit Beginn medizinischer Aufzeichnungen in allen Teilen der Erde begleitet und somit nicht ausschließlich als Problem der Tropen und Subtropen sondern als weltweite Herausforderung verstanden werden sollte.

1.1.2. Parasit und Lebenszyklus

What's the most resilient parasite? An idea! An idea can transform the world and rewrite all the rules. (Nolan 2010)

Die Parabel aus dem Film *Inception* erscheint nur im ersten Moment abwägig, verdeutlicht jedoch metaphorisch die ungemeine Wirkung und den Einfluss, welche von einem Gedanken oder einem Parasiten ausgehen kann. Nicht nur deshalb ist die Kenntnis des Lebenszyklus des Malariaparasiten unabdinglich für das Verständnis dieser Erkrankung.

Malariaparasiten sind Protozoen der Gattung *Plasmodium* und gehören taxonomisch der Gruppe der *Apicomplexa* an, die sich durch einen charakteristischen Generationswechsel, und ein spezielles Plastid, den Apikoplasten kennzeichnen [30, 31]. Es sind bisher etwa 200 *Plasmodium* Arten beschrieben, von denen alle einen Wirtswechsel vollziehen und von blutsaugenden Stechmücken als Vektoren hauptsächlich der Gattungen *Culex* und *Anopheles* übertragen werden [32].

Zurzeit sind fünf Plasmodienarten bekannt, die beim Menschen das Krankheitsbild der Malaria auslösen und alle von Stechmücken der Gattung *Anopheles* übertragen werden. Neben *Plasmodium (P.) falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* und *P. malariae* wurde 2004 *P. knowlesi*, eine Art, die in erster Linie Makakenarten in Südostasien infiziert, als humanpathogene Spezies beschrieben, da es regelmäßig zu Infektionen des Menschen kommt [33, 34].

Der Lebenszyklus von Plasmodien zeichnet sich durch einen Generationswechsel mit einer geschlechtlichen Phase, der Gamogonie und einer ungeschlechtlichen Phase, der sogenannten Schizogonie aus.

Die Infektionszyklus beginnt mit der Übertragung von Sporozoiten bei der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles* Stechmücke über die Inokulation des Speichels. Über den Blutstrom gelangen die Sporozoiten via *Vena portae* in die Lebersinusoiden, dem Mikrozirkulationssystem der Leber. Dort erfolgt die Passage der Sporozoiten über eine Barriere, bestehend aus Endothel- und *Kupfferschen* Sternzellen in den *Disseschen* Raum [35], welcher die Hepatozyten vom Blutstrom trennt. Hierbei spielt der Transfer über *Kupffersche* Sternzellen eine zentrale Rolle [36, 37]. Im *Disseschen* Raum invadieren Sporozoiten mithilfe von exprimierten Oberflächenproteinen, unter anderem dem *circumsporozite protein (CSP)* die Hepatozyten [38, 39].

Anschließend beginnt die erste Phase der ungeschlechtlichen Vermehrung, die sogenannte hepatozytäre Schizogonie.

In den Hepatozyten reifen die Sporozoiten zu Leberschizonten und weiter zu Merozoiten heran. Bis vor Kurzem wurde angenommen, dass der befallene Hepatozyt lysiert und dabei die Merozoiten in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Forschungen im Mausmodell zeigten, dass die Parasiten in Vakuolen, bestehend aus Membranbestandteilen der Hepatozyten, in sogenannten Merosomen in die Lebersinusoiden geschleust werden [40].

Nach der Leberschizogonie invadieren die in den Blutstrom freigesetzten Merozoiten Erythrozyten und die Phase der erythrozytären Schizogonie beginnt. Die Merozoiten wandeln sich in junge Trophozoiten, so genannte Ringstadien um. Auf der lichtmikroskopischen Sichtbarkeit dieser intraerythrozytäre Form der Parasiten beruht die Malariadiagnostik mittels Dicken Tropfen.

Durch Entwicklung und Wachstum im Erythrozyten entstehen Schizonten, die sich wiederum zu Merozoiten differenzieren. Nach der Lyse der Erythrozyten werden diese in den Blutstrom freigesetzt und der Zyklus der erythrozytären Schizogonie beginnt von Neuem. Im Gegensatz zur Vermehrung in der hepatischen Phase kommt es also zu einer erneuten Infektion des gleichen Zelltyps (Erythrozyten) und damit zu einer exponentiellen Vermehrung, die nur durch das Immunsystem und metabolische Restriktion gebremst werden kann. Ausschließlich in dieser Phase entwickeln sich die Symptome und Komplikationen der Malaria.

Während der erythrozytären Schizogonie entwickelt sich ein Bruchteil der Merozoiten nicht zu Trophozoiten, sondern zu männlichen und weiblichen Mikro- und Makrogamonten, welche die infektiösen Stadien für die Vektoren darstellen. Erst nach der Aufnahme der Gamonten bei der Blutmahlzeit einer empfindlichen Stechmücke findet deren Weiterentwicklung statt. Im Mückendarm erfolgt die Befruchtung des weiblichen Makrogamonten durch den männlichen Mikrogamonten. Es entsteht eine Zygote, welche als Ookinet mobil ist, aktiv die Darmwand durchdringt und sich in den Gewebsschichten des Mückenmagens anlagert. Nach der Entwicklung zur Oozyste wachsen in ihr für den Menschen infektiösen Sporozoiten heran (Sporogonie). Die Sporozoiten gelangen in die Speicheldrüse der *Anopheles* Mücke und Menschen können

erneut inokuliert werden. An diesem Punkt schließt sich der Lebenszyklus des Parasiten [40–42].

1.1.3. Krankheitsbild der Malaria

Die Inkubationszeit bis zur Ausbildung des klinisch apparenten Bild einer Malaria beträgt je nach *Plasmodium subspezies*(*ssp.*) etwa 6-40 Tage, für *P. falciparum* etwa 10-14 Tage. Nach einem Prodromalstadium mit unspezifischen Allgemeinsymptomen, wie Müdigkeit, Glieder- und Kopfschmerzen, beginnt die Manifestation in der Regel mit einsetzendem Fieber, welches zeitlich im Zusammenhang mit der Ruptur der parasitierten Erythrozyten mit der einhergehenden Freisetzung von Merozoiten gesehen wird. In dieser Phase der erythrozytären Schizogonie wird die Krankheit klinisch apparent [43].

Neben den Merozoiten werden unter anderem Zelldebris, Hämozoin und parasitäre DNA in den Blutstrom freigesetzt, wobei Hämozoin das kristalloide Abbauprodukt des für den Malariaparasiten toxischen Häms ist, welches im Rahmen der Aminensäuregewinnung aus Hämoglobin entsteht und auch als Malariapigment bekannt ist [44]. Möglicherweise spielen diese Komponenten bei der Pyrogenese über eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α eine Rolle [45]. Die molekularen Details und die Pathogenese des Temperaturanstieges sind jedoch noch nicht hinlänglich bekannt.

Auch wenn sich die *Termini tertiana* und *quartana* von den alle 48h bzw 72h auftretenden Fieberschüben ableiten, kann anhand der Fieberperiodik keine Diagnose der Malariaform oder gar ein Ausschluss der Erkrankung erfolgen, da alle Formen atypische und sogar afebrile Verläufe zeigen können [46].

Einige der Gründe hierfür sind die individuelle Immunität des Erkrankten, der Tagesrythmus der Körpertemperatur [47], aber auch ein vorzeitiger Therapiebeginn sowie eine Chemoprophylaxe. Diese Faktoren beeinflussen direkt die Manifestation, verschleiern die Klinik und erschweren die prompte Diagnose.

Von den fünf humanpathogenen Spezies hat die Infektion durch *P. falciparum*, die die potentiell tödlich verlaufende Malaria tropica verursacht, die größte klinische Relevanz. Sie ist für annähernd alle Malaria Todesfälle verantwortlich. *P. ovale* und *P. vivax* sind die Erreger der Malaria tertiana, die Malaria quartana wird durch *P. malariae*

verursacht. Letale Verläufe sind in der Tertiana und Quartana-Gruppe extrem selten und meistens durch eine Milzruptur bedingt [48, 49]. *P. knowlesi* Infektionen haben lokal in Südostasien vor allem auf der Insel Borneo eine klinisch relevante Bedeutung. Es wurden schwere Verläufe mit letalem Ausgang dokumentiert, die oft auf einer mikroskopischen Fehldiagnose mit der weniger gefährlich verlaufenden *P. malariae* Infektion beruhten und mit einer verspäteten Therapie einhergingen [33, 50].

Klinisch unterscheidet man zwischen einer unkomplizierten und einer komplizierten Verlaufsform. Typischerweise finden man bei den unkomplizierten Verläufen nach einem unspezifischem Prodromalstadium mit grippalen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen, Schweißausbrüche und Schüttelfrost, eine leichte bis mittelschwere Anämie, Splenomegalie, oft auch mit Hepatomegalie und abdominelle Beschwerden mit Diarrhoen und Erbrechen [51].

Von einer komplizierten oder schweren Malaria, die fast ausschließlich durch Infektionen mit *P. falciparum* bedingt wird spricht man, wenn unter anderem folgende Symptome oder Symptomkomplexe in Erscheinung treten, die im Einzelnen oder ihrer Gesamtheit ein lebensbedrohlichen Krankheitsbild zeichnen:

Tab.1: Symptomenkomplexe der komplizierten Malaria tropica

- schwere Bewusstseinstörungen bis hin zum Koma
 - Konvulsionen, i.d.R. generalisiert
 - intrazerebrale Hämorrhagien mit Hirnödemen
 - hämolytische, schwere Anämien (Hb < 5g/dl) bei Hyperparasitämien
 - ikterische Verläufe mit Leberausfallkoma
 - Hypoglykämien
 - schwere Azidose
 - *Acute respiratory distress syndrome, ARDS*
 - Dysenterie
 - Lungenödem
 - Nierenversagen, prärenal
 - disseminierte intravasaler Koagulopathie
 - Thrombozytopenie mit Spontanblutungen
 - *Systemic inflammatory response syndrome, SIRS*
-

[52, 53].

Eine der schwerwiegendsten Komplikationen der Malaria tropica stellt die zerebrale Verlaufsform dar, die für einen großen Anteil der Todesfälle im Krankenhaus verantwortlich ist. Besonders Kinder im Alter unter fünf Jahren sind gefährdet eine komplizierte Verlaufsform zu entwickeln und die Mortalität liegt in dieser Gruppe in Gabun bei etwa 9% [54]. Für die zerebrale Verlaufsform liegt die Mortalität nochmals höher und wird mit bis zu 20% angegeben [55–57].

Klinisch äußert sich die zerebrale Malaria bei Kindern im Anfangsstadium durch unscheinbare Symptome wie Ess- und Trinkschwäche. Neben weiteren neurologischen Symptomen wie Konvulsionen konnten als klinisch prädiktive Faktoren für einen letalen Ausgang eine vertiefte Atmung, Prostration und Koma identifiziert werden.

Diese Faktoren finden im klinischen Instrument des *LODS/Lambaréné Organ Dysfunction Score* Anwendung, der prädiktiv zur Identifizierung von Kindern mit einem hohen Risiko für einen letalen Malariaverlauf geeignet ist. Dabei wird jeweils ein Punkt für das Vorhandensein der Symptome Prostration, Koma und vertiefte Inspiration vergeben und summiert, so dass ein *LODS* zwischen 0 und 3 liegen kann. Ein *LODS* von 0 ist ein sehr guter Prediktor für das Überleben des Kindes, mit jedem Punkt steigt die Wahrscheinlichkeit des Todes um den Faktor 3,5 [57].

Die schwere Anämie stellt eine weitere wichtige Komplikation im Zusammenhang mit der komplizierten Malaria da. Oft präsentiert sie sich nicht so eindrücklich wie andere der oben genannten Symptome, jedoch ist sie eine der häufigsten assoziierten Begleiterscheinungen der Malaria und mutmaßlich für einen großen Anteil der Todesfälle bei nicht hospitalisierten Kindern verantwortlich.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die komplizierte Malaria durch die Infektion mit *P. falciparum* eine komplexe, lebensbedrohliche Erkrankung ist, die bei verspäteter Diagnose letal enden kann. Es ist erwiesen, dass eine wirkungsvolle Strategie die schnellstmögliche Diagnose und antiparasitäre Therapie darstellt, um eine Progression in ein kompliziertes Stadium zu verhindern [55, 58, 59].

Folglich ist der Stellenwert einer schnellen, zuverlässigen Diagnostik mit einhergehender Therapie entsprechend hoch anzusiedeln.

1.1.4. Epidemiologie und aktuelle Situation

Heutzutage wird die Malaria, wie eingangs beschrieben, als Tropenerkrankung klassifiziert, welches sich durch ihre Endemizität in den tropischen und subtropischen Regionen rund um den Globus belegen lässt. Dass jedoch etwa 40% der Weltbevölkerung in Risikogebieten leben – nach aktuellen Schätzungen etwa 3,2 Milliarden Menschen in über hundert Ländern- entzieht sich oft dem öffentlichem Bewusstsein [60]. Epidemiologisch gesehen ist sie laut des *World Malaria Report 2012* mit etwa jährlich 250-500 Millionen Erkrankungsfällen und etwa 660000 Todesopfern weiterhin eine der großen Geißeln der Menschheit [61]. Andere Quellen, wie die Gruppen um Snow und Murray schätzen, dass Malaria im Jahr 2010 global sogar 1,2 Millionen Todesopfer forderte [62].

Die größte Bürde dieser Erkrankungen haben weiterhin Kinder und Schwangere aus ökonomisch schwachen Gebieten zu tragen. Laut Schätzungen der WHO waren 2010 86% der an Malaria verstorbenen Kinder unter fünf Jahre alt und 91% aller Todesfälle traten in Afrika südlich der Sahara auf.

Auch die Anzahl der aus Malariaendemiegebieten durch Reisende und *Visiting Relatives and Friends* (VRFs) nach Europa und Nordamerika eingeschleppten Krankheitsfälle, hat durch die voranschreitende Globalisierung zugenommen, stellt aber weiterhin einen Bruchteil der Gesamtfälle dar, obwohl die Krankheit auch in dieser Gruppe ihre Todesopfer fordert [63, 64]. 2010 wurden in Deutschland dem Robert Koch Institut (RKI) 617 Fälle von Malaria gemeldet, von denen zwei tödlich verliefen [65]. Auch hier ist eine verspätete Diagnose mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.

Trotz vieler groß angelegter Kampagnen und Bemühungen die Malaria zu bekämpfen ist es bis dato mit den aktuell zur Verfügung stehenden Mittel nicht möglich die Krankheit erfolgreich und dauerhaft zurück zu drängen oder gar auszurotten [66]. Die aktuellen Daten des 1998 initiierten *Roll Back Malaria* Programm der WHO, welches 2010 endete, belegen zwar einen Rückgang der Inzidenz um insgesamt 17%, aber das ursprünglich ausgegebene Ziel der Halbierung hat man eindeutig verfehlt [67, 68]. In politischen und wissenschaftlichen Kreisen wurde schon häufiger die Frage aufgeworfen, ob mit den Methoden und zur Verfügung gestellten Mitteln dieser Erkrankung Einhalt geboten werden kann [69, 70].

Ein Strategiewechsel scheint angebracht, zumal durch den großen Kenntnissgewinn in der Grundlagenforschung, große Fortschritte im Verständniss der Erkrankung gewonnen und vielversprechende neue Ansätze zur Therapie und Prävention der Malaria entwickelt wurden [71].

Ausblickend für die Zukunft liegen große Hoffnungen auf der Entwicklung eines Impfstoffes und mit der gut belegten Wirksamkeit des RTS,S Vakzinekandidaten im Rahmen einer klinischen Studie konnte bereits ein Meilenstein auf diesem Gebiet erreicht werden [72].

Dennoch stellt die Malaria den Menschen trotz aller Fortschritte auch heutzutage noch vor eine immense Herausforderung. Daher ist es notwendig die im Moment zur Verfügung stehenden Mittel möglichst effizient einzusetzen.

1.2. Diagnostik der Malaria

1.2.1. Malariakontrolle

Malariakontrolle ist ein komplexer, dynamischer, globaler Prozess, der von vielen Einflussgrößen humanitärer, politischer, wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Natur getragen und beeinflusst wird. Die Hauptansatzpunkte und Strategien der Malariakontrolle sind jedoch seit Dekaden unverändert und bestehen aus der Vektorkontrolle, der Chemoprophylaxe, der Surveillance der Erkrankung, der Forschung, sowie der Diagnose und Therapie [73]. Dem gegenüber steht die immense Herausforderung der Finanzierung und Durchsetzung dieser Projekte. Im Jahr 2011 wurden laut WHO etwa 2,3 Milliarden US\$ aus internationalen und nationalen Fonds für die Malarikontrolle zur Verfügung gestellt, weniger als die Hälfte der geschätzten 5,1 Milliarden US\$ die zur Erreichung der globalen Ziele nötig wären [61].

Eine der Säulen ist, wie bereits angeführt, die Diagnostik, welche laut einem WHO Report von 1993 unablässlich für ein effektives Krankheitsmanagement ist [74]. Mit geschätzten 171 Millionen durchgeführten Untersuchungen ist die Mikroskopie vor dem Malariaschnelltest, dem *Rapid Diagnosis Test* (RDT) das am meisten verwendete diagnostische Instrument [61]. Im Folgenden werden weitere Argumente angeführt, welche die wichtige Rolle der Diagnostik im Allgemeinen als unverzichtbares Instrument in der Bekämpfung der Malaria unterstreichen:

- Die kompliziert verlaufende Malaria tropica stellt einen klinischen Notfall dar. Eine zeitnahe Diagnose im Frühstadium der Erkrankung, mit der sich anschließenden adäquaten Behandlung, führen zu einer Reduzierung krankheitsassoziiertes Morbidität und Mortalität und verhindern oftmals die Progression in ein kompliziertes vital bedrohliches Stadium [41, 59].
- Eine effektive, frühe Diagnostik ist auch aus ökonomischen Gesichtspunkten erstrebenswert, da in vielen Hochendemiegebieten aufgrund von sozio-ökonomischen und politisch-wirtschaftlichen Faktoren eine Knappheit an Ressourcen herrscht. In einem Review publizierten White et al., dass eine Episode einer schweren Malaria im Mittel 30,26 US\$ kostet. Im Vergleich dazu kostet eine Episode eines unkomplizierten Verlaufs 5,84 US\$ [75].
- Die rein klinische Diagnostik mit „blindem“ Therapiebeginn, dem sogenannten *presumptive treatment*, wie sie noch oft in ruralen Gebieten ohne labortechnische Möglichkeiten durchgeführt wird, ist in manchen Fällen unvermeidbar und indiziert, jedoch unzureichend [76, 77]. In Regionen mit niedriger Inzidenz sinkt der Aussagewert der klinischen Diagnose drastisch und es kommt im Rahmen von unreflektierter Applikation von *Antimalarial drugs* (AMDs) in subtherapeutischer Dosis zu einer Resistenzentwicklung von Parasiten [78, 79]. In Regionen mit niedriger Inzidenz ist daher der Nutzen eines zuverlässigen direkten Parasitennachweises umso größer [80]. Dahingegen zeigen Studien, dass die Implementierung von flächendeckender Verfügbarkeit von *Artemisinin Combination Treatment* (ACTs) mit den diagnostischen Methoden in Form von Mikroskopie und oder RDTs eine effektive Methode der Kostenreduzierung ist [81, 82].

Vom epidemiologischen Standpunkt aus gesehen ist eine flächendeckende zuverlässige Diagnostik ein unerlässliches Werkzeug zur Generierung von validen Daten. Aktuelle Zahlen aus dem WHO Report 2012 schätzen, dass nur etwa 10% der geschätzten weltweiten Malariafälle detektiert werden. In Ländern mit den höchsten Inzidenzen liegen die niedrigsten Detektionsraten vor die aktuellen Zahlen von 300-500 Millionen Krankheitsfällen pro Jahr und reflektieren die enorme Varianz der epidemiologischen

Daten [22, 61]. Diese Varianz von Malariaepisoden ist sicherlich nicht allein auf die fehlende Genauigkeit und Standardisierung der Diagnostik zurück zu führen, jedoch mitunter eine ihrer Ursachen. In den meisten endemischen Regionen existieren keine flächendeckenden, funktionierenden Meldesysteme und folglich werden viele Episoden nicht oder falsch gemeldet.

Letztendlich sind Fehldiagnosen febriler Tropenerkrankungen weiterhin sehr häufig und führen zu einer falschen Therapie mit einhergehenden Mehrkosten und Komplikationen. Des Weiteren werden differentialdiagnostische relevante Erkrankungen übersehen [77, 83].

Die Anforderungen an eine gute Malaria Diagnostik sind daher hoch: sie sollte aufgrund der potentiell letalen Verläufe möglichst sensitiv, das Ergebnis schnell verfügbar, quantitativ, technisch einfach durchführbar, erlernbar und möglichst kostengünstig sein [84]. Die diagnostische Methode die prinzipiell all diese Anforderungen erfüllt ist die Mikroskopie des gefärbten Dicken Tropfens.

1.2.2. Goldstandard Mikroskopie des Dicken Tropfen

Als Goldstandard der Malariadiagnostik hat sich bis heute die Lichtmikroskopie von gefärbten Blutaussstrichen durch einen erfahrenen Untersucher etabliert, da sie viele der oben genannten Eigenschaften vereint [85]. Der Goldstandard als Schlagwort aus der Geldwirtschaft impliziert im medizinischen Sinne, dass es sich um das aktuell beste Verfahren (bezüglich Diagnose, Therapie, Forschung, o.ä.) handelt, an dem sich alle anderen Methoden messen müssen (Jedoch ist weder festgelegt wer diesen Standard definiert, noch ist dieser zwingend an Evidenz gekoppelt).

The careful examination by an expert microscopist of a well prepared and well stained blood film remains currently the “gold standard” for detecting and identifying malaria parasites. (WHO Microscopy Learners Guide 2010)

Der Dicke Tropfen wurde erstmals 1903 als „*Thick blood film*“ von Ronald Ross vorgestellt. Die nach dem Hamburger Chemiker Gustav Giemsa (1867-1948) benannte Färbelösung ist bis heute annähernd in der gleichen Zusammensetzung die

Einleitung

Standardfärbung dieser Blutausstriche. Das Prinzip beruht auf einem Anreicherungsverfahren, bei dem die Erythrozyten durch den Wassergehalt der Färbelösung hämolysieren und somit die Parasiten auch unter mehreren Schichten mikroskopisch sichtbar werden. Im Vergleich zum dünnen Blutausschlag beträgt die Konzentration der Parasiten etwa das 6 – 10 fache. Im Dicken Tropfen sind die Ringformen der Trophozoiten von *P. falciparum* leicht an dem rosa gefärbten Zellkern und dem violetten ringförmigen Zytoplasma zu erkennen. Das Chromatin der Zellkerne der Leukozyten stellen sich rot-violett, das Plasma blau und die Erythrozyten und deren hämolysierte Bestandteile grau dar.

Die mikroskopische Beurteilung setzt Erfahrung voraus, erlaubt jedoch die Bestimmung der Parasitämie und der Art. Die Ausnahme bildet die Differentialdiagnose zwischen einer *P. malariae* und *P. knowlesi* Infektion und deren reiferen Blutstadien, die lichtmikroskopisch nur schwer möglich ist. Alle anderen Spezies sind aufgrund der Morphologie der verschiedenen erythrozytären Stadien und gewissen Färbereigenschaften, wie der *Schüffner-Tüpfelung* und der *Maurerschen Fleckung* bei hohen Parasitämien sicher voneinander differenzierbar. Für die Therapie hat es jedoch keine direkte Konsequenz, da ACTs bei allen Plasmodienarten, als auch bei Mischinfektionen eingesetzt werden können [86].

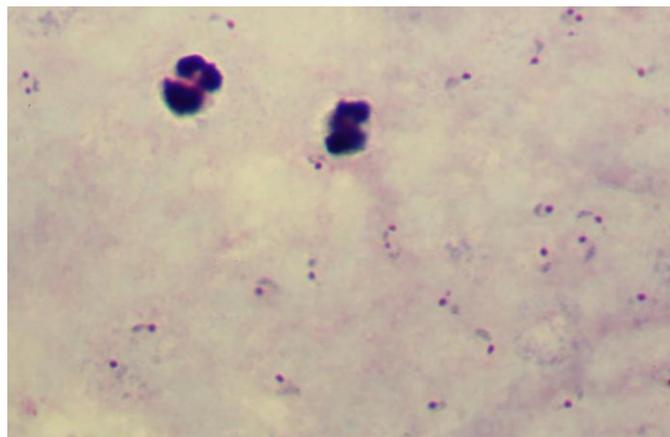


Abb.1: *P. falciparum* Parasiten im Dicken Tropfen

Die technischen und materiellen Anforderungen zur Herstellung eines Dicken Tropfen sind gering. Mit Durchschnittskosten von etwa 0,12- 0,4 US\$ pro Untersuchung ist sie im Vergleich zu allen anderen Methoden die kostengünstigste [87].

Allgemein gültige Daten zur Sensitivität und Spezifität dieses Standards sind schwierig zu erheben und bisher wenig in der Literatur beschrieben. Sie werden von vielen Faktoren beeinflusst, unter anderem von der Inzidenz, den lokalen Voraussetzungen, der Expertise und Methode, die eine generelle Kategorisierung der Leistungsfähigkeit kaum möglich machen. Arbeiten von Gatti, Moody, Iqbal, Hernandez und Palmer et al. zeigen eine Sensitivität der Mikroskopie des Dicken Tropfens von etwa 95% in Endemiegebieten durch erfahrene Untersucher. Die Spezifität hingegen ist in endemischen und nicht endemischen Gebieten in den meisten Arbeiten bei etwa 99% und somit insgesamt sehr hoch anzusiedeln [88–92].

Dass sich die Mikroskopie des Dicken Tropfens als bestes zur Verfügung stehendes Instrumente durchsetzen konnte, liegt vor allen an den folgenden Vorteilen:

- Quantitative und qualitative Aussage
- Direktnachweis des Parasiten
- Geringer technischer Aufwand
- Leicht erlernbar und durchführbar
- Schnelle Verfügbarkeit des Ergebnisses
- Kostengünstig

Demgegenüber stehen nicht unerhebliche Limitierungen und Nachteilen der Methode, die im Abschnitt *Limitierungen und Probleme der Mikroskopie* erläutert werden.

1.2.3. Alternative labortechnische Methoden

Ein Grund warum sich der Dicke Tropfen seit über einem Jahrhundert als Standard etablieren konnte, liegt zuweilen an den Limitierungen und beschränkten Einsatzmöglichkeiten alternativer Methoden im direkten Vergleich.

Neben der Mikroskopie kommt vor allem dem Malariaschnelltest oder *Rapid diagnostic test* (RDT) eine große Bedeutung zu. Er beruht auf einem Nachweis von plasmodiumspezifischen Antigenen, die mittels Farbumschlag, Fluoreszenz oder

radioaktiver Markierung sichtbar gemacht werden. Die meisten Schnelltests werden in Form von Kunststoffkassetten oder Teststreifensystemen mit den dazu gehörigen Puffern angeboten und zeichnen sich durch eine einfache Handhabung, gute Transportabilität und schnellem Vorliegen des Ergebnisses aus. Der Schnelltest zeigt in klinische Studien in endemischen und nicht endemischen Gebieten eine hohe Sensitivität [93–95]. Er stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zur Mikroskopie des Dicken Tropfens und in Settings ohne Möglichkeit des Parasitendirektnachweises eine kostengünstige Alternative dar [96]. Nachteile der RDTs sind unter anderem Kreuzreaktionen mit Autoantikörpern, welche aber eine untergeordnete Rolle spielen, sowie die schlechte Haltbarkeit unter feuchten, tropischen Bedingungen [97]. Viele RDTs bleiben noch mehrere Wochen nach einer ausgetragenen Malariaepidemie positiv, obwohl keine vitalen Parasiten mehr vorhanden sind und führen somit zu falsch positiven Ergebnissen. Des Weiteren ist eine Bestimmung der quantitativen Parasitämie nicht möglich.

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist ein molekulargenetisches Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von genetischem Material [98]. Sie ist zurzeit die Nachweismethode mit der höchsten Sensitivität und Spezifität. Jedoch hat sie sich aufgrund ihrer hohen Anforderungen im Bezug auf Equipment, Laborausstattung, Qualitätskontrolle und personellen wie logistischen Voraussetzungen, des relativ hohen Zeitaufwandes bis zum Ergebnis und aus Kostengründen nicht als Routineverfahren in endemischen Gebieten etablieren können [99]. Eine noch nicht abgeschlossene Standardisierung für die Malariadiagnose ist ein weiterer Nachteil dieser Methode.

Serologische Untersuchungen sind ebenfalls möglich, spielen aber in der akuten Diagnostik eine untergeordnete Rolle, da sie in der Diagnostik in der Regel keine therapeutische Konsequenz haben. Des Weiteren liegen auch hier die limitierenden Faktoren im Bereich der Wirtschaftlichkeit in Bezug auf Zeit, Equipment und Qualifizierung des Personals im Vergleich zu anderen Methoden. Bei forensischen Fragestellungen und in der Forschung sind sie jedoch ein wichtiges, zuweilen unentbehrliches Instrument.

Der Vollständigkeit halber seien noch automatische maschinelle Zählverfahren erwähnt, die sich zurzeit in Entwicklung befinden. Sie werden jedoch in absehbarer Zukunft noch nicht in Hochendemiegebieten einsetzbar sein [100].

1.2.4. Probleme und Limitierung der Mikroskopie des Dicken Tropfens

Die Mikroskopie des Dicken Tropfen ist die zurzeit beste zur Verfügung stehende Methode der Malariadiagnostik, jedoch abhängig von vielen Variablen und Faktoren, aus denen sich Limitierungen, Einschränkungen und Probleme bei der Anwendung der Methode ableiten lassen [101, 102]:

Bei niedrigen Parasitämien und in Regionen niedriger Inzidenz werden häufiger falsch negative Ergebnisse beobachtet und es kommt zu einer Abnahme der Sensitivität [103, 104]. Falsch positive Ergebnisse findet man häufig in Folge von Kontaminationen durch Sporen, Bakterien oder Pilze, sowie Artefakte durch Verschmutzung mit Mikropartikeln.

Die Durchführung der Mikroskopie des Dicken Tropfens ist bisher nicht standardisiert und folgt verschiedenen Leitlinien. Feste internationale Richtlinien sind bis dato nicht etabliert. So wird unter anderem die Sensitivität durch die variable Anzahl der zu untersuchenden Gesichtsfelder und somit der Fläche des Ausstriches, welche sich kongruent zum Blutvolumens verhält, beeinflusst [105].

Letzendlich ist die Qualität der Ergebnisse sehr stark von der Expertise und den Fähigkeiten eines Mikroskopisten abhängig und selbst in Händen eines ausgewiesenen Experten können Fehlinterpretation auftreten [106].

Des Weiteren sind mangelhafte technische Ausstattung, unzureichende Wartung der Materialien, minderwertige oder abgelaufenen Reagenzien Probleme, die sich in schlecht entwickelten Gesundheitssystemen mit fehlenden Qualitätsstandards oder schlecht angebundenen Regionen wiederfinden [87].

Zusammenfassend spielt der Mikroskopist eine nicht zu überschätzende Rolle für die Qualität der Diagnose mittels Dicken Tropfens. Um eine Verbesserung zu erreichen kann somit hier auf vielversprechende Weise angestzt werden.

1.3. *Limit of Blank (LoB)* und *Limit of Detection (LoD)* als Nachweisgrenzen

Mit der Bestimmung von etablierten Nachweisgrenzen, die in Folge erläutert werden, soll eine objektivere Beurteilung der Mikroskopie und vor allem der Fähigkeit des Mikroskopisten gelingen.

Im Bezug auf Nachweisgrenzen für den Dicken Tropfen in Form von Schwellenwerten oder *Thresholds* gibt es bisher nur Schätzungen und keine evidenzbasierten Daten. Statistisch evaluierte Nachweisgrenzen wie sie für viele diagnostische Methoden bereits existieren sucht man in der Literatur vergeblich.

Das *Limit of Detection (LoD)* und das *Limit of Blank (LoB)* sind Nachweisgrenzen, die bereits für eine Vielzahl von Labormethoden bestimmt wurden und im breitem Laboralltag zum Beispiel bei Hormonassays oder Drogenscreenings Anwendung finden. Die evaluierten Nachweisgrenzen sind in dieser Arbeit wie folgt definiert:

Limit of Blank – Höchster Wert, der bei der Messung einer negativen Probe beobachtet wird.

Limit of Detection – Die niedrigste Konzentration des zu analysierenden Agens in einer Probe, welche sicher nachweisbar ist.

Die Einheit der Nachweisgrenzen in dieser Arbeit sind *P. falciparum* Parasiten/Mikroliter (pf/ μ l). Das *LoD* entspricht folglich der Anzahl von *P. falciparum* pro Mikroliter, die sicher nachweisbar ist und somit die Diagnose einer Malaria stützt.

1.4. Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Die Idee und die daraus abgeleitete Hypothese ist der Versuch zu untersuchen, ob die Nachweisgrenzen in Form des *LoB* und des *LoD* auch für die Mikroskopie des Dicken Tropfens sinnvoll bestimmbar sind.

Stellvertretend hierfür soll die Kompetenz eines trainierten, erfahrenen Kollektivs von Mikroskopisten eines Forschungslabors in Gabun evaluiert werden.

Mit der Anwendung dieser Maßzahlen soll die Qualität der Mikroskopie des Dicken Tropfens bestimmt und objektivierbar gemacht werden. Bei Erfolg, kann die Methode der Bestimmung von *LoB* und *LoD* anderen Labors verfügbar gemacht werden, um ihnen zu ermöglichen, die diagnostische Fähigkeit der jeweiligen diagnostischen Einheit quantitativ zu beurteilen und bei Bedarf zu verbessern.

Bestehende Leitlinien, die zur Evaluierung von Nachweisgrenzen von Labormethoden konzipiert wurden sind der Ausgangspunkt für die statistische Auswertung der Arbeit. Die Entwicklung und Überprüfung einer Methode zur einfachen Qualitätssicherung der

Einleitung

Mikroskopie des Dicken Tropfens, in unserem Fall in einem zentralafrikanischen endemischen Malariagebiet, ist die zu bewältigende Herausforderung.

2. Methoden

2.1. Studienort

Die zentralafrikanische Region ist endemisch für die potentiell letal verlaufende Malaria tropica, die einen großen Teil der Konsultationen und Einweisungen ins Krankenhaus ausmacht. Als einer dieser Staaten befindet sich Gabun zwischen seinen direkten Nachbarländern Kamerun, Äquatorial Guinea und der Republik Kongo an der Küste Westafrikas am Golf von Guinea. Es herrscht ein tropisch, feucht warmes Klima mit Durchschnittstemperaturen von 26-28°, einem jährlichem Niederschlag von 2900 mm/m² und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 80-100% vor. Etwa 3,7% der 270.000 km² messenden Landesfläche sind von Wasser in Form von Seenlandschaften und Flüssen bedeckt, wobei jedoch der Großteil des Landes von tropischer Ur- und Sekundärwaldvegetation eingenommen werden [107, 108]. Somit herrschen ideale Lebensbedingungen für die Verbreitung der Malaria übertragenden Stechmücken der Gattung *Anopheles*.

Trotz der Bemühungen zur Verbesserung des Gesundheitswesens beträgt laut dem *Statistical Factsheet Gabon* der WHO von 2010 die Lebenserwartung nicht mehr als 60 Jahre. Die Mortalität von Kindern unter fünf Jahren lag 2008 bei 69 von 1000. Hierbei steht die Malaria als Todesursache an vorderster Stelle. Laut dieser Quelle wurden im Jahre 2008 in Gabun etwa 190.000 Malariafälle gemeldet, was eindrücklich die große Bürde und Endemizität dieser Erkrankung widerspiegelt. Neben der Malaria tropica auf die weit über 90% der Infektionen fallen, treten vereinzelt auch Fälle von *P. malariae* und *P. ovale* Infektionen auf [109].

Schon Albert Schweitzer erkannte die Bedrohung der Bevölkerung in der Region des Ogowe-Flusses durch die Malaria: „Hauptsächlich hatte ich es mit Malaria, Lepra, Schlafkrankheit und Dysenterie [...] zu tun.“ (Albert Schweitzer, Aus meinem Leben und Denken) [110].

Gabun kann somit, trotz vieler Fortschritte und positiven Entwicklungen im direkten Vergleich zu seinen Nachbarstaaten, durchaus als repräsentatives Hochendemiegebiet für die Infektion mit *P. falciparum* in Zentralafrika betrachtet werden.

Die *Unité de Recherches Médicales de Lambaréné* (URM) ist eine Forschungseinrichtung, die sich seit ihrer Gründung im Jahre 1981 mit der Erforschung

der Krankheitsursachen der ansässigen Bevölkerung widmet. Seit 1992 ist Prof. Dr. Peter Kreamer wissenschaftlicher Direktor der internationalen *Albert Schweitzer Foundation*. Ein Fokus der Forschungsaktivitäten liegt auf der Malariaforschung. Im Laufe der letzten Jahre hat sich das URM zu einem der führenden Forschungszentren des Kontinents entwickelt, welches sich neben der wissenschaftlichen Arbeit auch mit der Aus- und Weiterbildung von lokalen und internationalen Wissenschaftlern und Studenten widmet. Zahlreiche Publikationen vor allem im Rahmen von klinischen Studien wurden bis dato veröffentlicht [111].



Abb.2: Luftaufnahme des Areals des Hôpital Albert Schweitzer
(Mit freundlicher Genehmigung von Noemí García Tardón 2012)

Lambaréné ist mit etwa 26.000 Einwohnern die fünftgrößte Stadt Gabuns (Stand 2009), liegt am Ufer des Ogowe Flusses und ist die Hauptstadt der Provinz *Moyen Ogooué*. Die entomologische Inokulationsrate liegt bei etwa 50 infektiösen Stichen pro Person und Jahr, was dem Landesdurchschnitt entspricht [112]. Von jedem Patient, der sich an der URM mit klinischen Symptomen einer Malaria oder Fieber vorstellt, wird ein Dicker Tropfen angefertigt, was pro Jahr einer Summe von etwa 12.000 Dicken Tropfen entspricht und den weitaus größten Teil der Labordiagnostik ausmacht. Der große Stellenwert der Malariadiagnostik ist anhand dieser Zahlen unbestreitbar [113].

Das klinische Labor der URM unterliegt hohen Qualitätsstandards sowie regelmäßigen internen und externen Qualitätskontrollen. Darüber hinaus sollte durch das gut ausgebildete technische Personal, sowie das qualitativ hochwertige Equipment ein

hoher Standard der Malariadiagnostik, wie sie unter anderem von der WHO gefordert wird, gewährleistet sein. Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich im klinischen Labor der URM's in Lambaréné in Gabun möglichst optimale Voraussetzungen für die Durchführung dieser Arbeit finden.

2.2. CLSI/NCCLS Guideline EP17

Die Guideline *EP 17 Protocols for Detection of Limit of Detection and Limit of Quantitation* bildet die methodische und statistische Grundlage dieser Arbeit. In dieser Leitlinie finden sich Anweisungen zum Studiendesign und zur Statistik, sowie Pfade und Prozeduren zur korrekten Evaluierung des *Limit of Blanks* und des *Limits of Detection* und deren sachgerechte Anwendung und Interpretation. Das Dokument wurde in Kooperation der NCCLS und der *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) 2004 publiziert.

Das NCCLS, heute *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ist eine internationale, interdisziplinäre, gemeinnützige Organisation, die sich seit ihrer offiziellen Gründung 1977 auf die Etablierung, Harmonisierung und Weiterentwicklung von Methoden und Standards in der Labormedizin spezialisiert hat.

Die Prinzipien und Methoden der Guideline EP17 bildete die Basis für die Messung des *LoB* und *LoD* des Dicken Tropfens. Da das evaluierte Messinstrument eine Gruppe von Mikroskopisten ist, wurden die Methoden den Anforderungen angepasst und ein allgemeines Vorgehen für diesen speziellen Zweck entwickelt.

2.3. Studiendesign

Der allgemeine Ansatz nach Currie et al. zur Bestimmung des *LoB* und des *LoD* besteht darin eine Serie von negativen sowie niedrig positiven Proben herzustellen und wiederholt zu messen [114]. In unserem Fall entsprechen die Proben dem Dicken Tropfen und die Messgeräte auf Seite der Analyse dem Mikroskopist.

Es werden Serien mit negativen und niedrig positiven Dicken Tropfen hergestellt, randomisiert und verblindet und in sich wiederholenden Sequenzen von mehreren Mikroskopisten gelesen.

Die Resultate der negativen Proben werden für die Bestimmung des *LoB* verwendet. Mithilfe des bestimmten *LoB* kann nach wiederholter Messung der niedrig positiven Proben das *LoD* kalkuliert werden (siehe Statistik).

Mithilfe des Studiendesign sollen die empfohlenen Voraussetzungen, welche zur Erhebung valider Daten essentiell sind, geschaffen und gewährleistet werden. In unserem Fall sind sie auf der Seite der Analyse, des Mikroskopisten und auf der Seite des Agens, des Dicken Tropfen zu finden und entsprechend zu berücksichtigen.

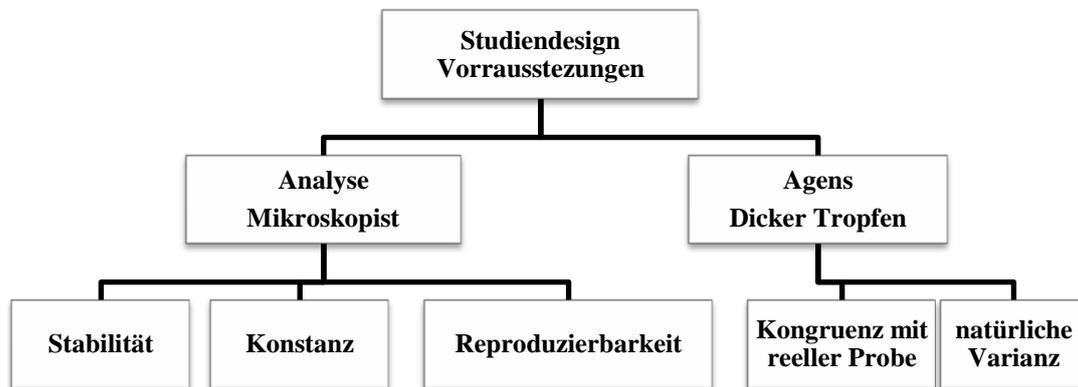


Abb.3: Voraussetzungen Studiendesign

Auf Seite der Analyse sind konstante und stabile Arbeitsbedingungen mit möglichst wenig schwankender Variabilität erforderlich.

Dahingegen sollte auf Seite des zu analysierenden Agens eine natürliche Variabilität der Proben abgebildet werden. Des Weiteren sollten sich die Studienproben möglichst ähnlich zu natürlich gewonnenen Proben verhalten.

Eine der Herausforderungen besteht darin, dass anstatt Maschinen, starren Apparaturen oder Messinstrumente ein wesentlich komplexeres, von vielen Faktoren abhängiges System, nämlich der Mensch in Form vom Mikroskopist steht. Aufgrund dieser Tatsachen ergeben sich weitaus höhere Anforderungen an das Studiendesign, die im Folgenden aufgeführt werden.

Die in der Leitlinie empfohlene Anzahl von mindestens zwei verschiedenen analysierenden Instrumenten wurde mit der Nominierung von sechs Mikroskopisten deutlich erhöht, um die zu erwartenden Varianzen zwischen den Messungen der verschiedenen Mikroskopisten auszugleichen.

Es wurden nur Mikroskopisten mit entsprechender Kompetenz und Erfahrung eingesetzt, die alltäglich im Rahmen von klinischen Studien Dicke Tropfen lesen.

Die Lektüre der Dicken Tropfen erfolgte im *Salle d'analyse* des klinischen Labors des URM am jeweiligen Routinearbeitsplatz des Mikroskopisten, mit dem ihm vertrauten Equipment um die geforderten möglichst natürlichen Routinearbeitsbedingungen zu simulieren.



Abb.4: Arbeitsplatz Mikroskopie Dicker Tropfen

Die Lektüre der Dicken Tropfen wurde während der regulären Arbeitszeit eingebettet in den Routinealltag durchgeführt. Der Zeitpunkt der Lektüre wurde dem jeweiligen Mikroskopisten im Rahmen des täglichen Arbeitsaufkommens freigestellt. Das Ziel dieser Arbeit wurde den Mikroskopisten nicht mitgeteilt.

Es wurde eine Randomisierung und Verblindung der Dicken Tropfen durchgeführt und sie unterscheiden sich optisch nicht von den Routineproben des Labors.

Auf Seite des zu analysierenden Agens soll die geforderte Varianz und Kongruenz mit natürlich gewonnen Proben durch die folgenden Punkten gewährleistet werden:

Die negativen und niedrig positiven Dicken Tropfen stammen jeweils von verschiedenen Probanden.

Die Herstellung und Färbung der Dicken Tropfen erfolgt in zwei Giemsalösungen des gleichen Herstellers an unterschiedlichen Zeitpunkten.

2.4. Statistik

2.4.1. Statistischer Ansatz zur Bestimmung des *LoD* und *LoB*

Zur Bestimmung des *LoB* und des *LoD* müssen nach Currie et al. negative und niedrig positiven Proben präpariert und von einem oder mehreren Instrumenten gemessen werden [114]. Die Anzahl der verwendeten Proben und Instrumente sollte die Mindestanzahl, die zur Evaluierung eines validen *LoB* und *LoD* benötigen werden aus Kosten, Zeit und Effizienzgründen nicht überschreiten.

Die Resultate der negativen Proben werden für die Bestimmung des Limit of Blank verwendet. Das *LoB* ist der höchste Wert, der bei der Messung einer tatsächlich negativen Probe beobachtet wird.

Erst ab Messergebnissen über diesem Schwellenwert kann eine Probe mit vorher festgelegter Wahrscheinlichkeit als sicher positiv bewertet werden.

Über wiederholte Messungen der niedrig positiven Proben kann mithilfe des bereits bestimmten *LoB* das *LoD* bestimmt werden.

Das *LoD* ist definiert als die niedrigste Konzentration des zu analysierenden Agens in einer Probe, welches sicher mit einer vorher festgelegten Wahrscheinlichkeit nachweisbar ist.

Es ergeben sich in der Regel folgende Verteilungskurven für negative und positive Proben:

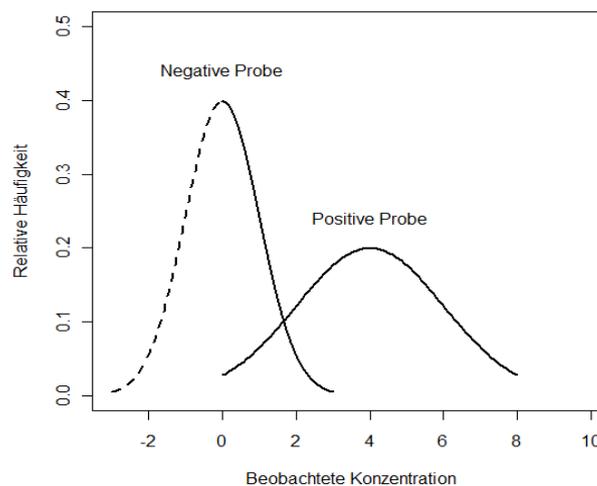


Abb.5: Verteilung von Messergebnissen neg. und pos. Probe

Bei negativen Proben nehmen wir eine symmetrische Verteilung der Ergebnisse um Null an, bei den positiven eine symmetrische Verteilung um die entsprechende (positive) Konzentration. Die Verteilung der Ergebnisse der negativen und niedrig positiven Proben beruht auf zufälligen Messfehlern.

Das Limit of Blank entspricht dem Messwert an einer vorher festgelegten Perzentile:

$$LoB = Pct_{B\ 100-\alpha}$$

Nach Empfehlungen der *International Organization for Standardisation* (ISO) wurden in Bezug auf das *LoB* und das *LoD* die Werte für $\alpha = \beta = 5\%$ festgelegt. Somit entspricht bei der Anwendung von $\alpha = \beta = 5$ nach der Formel $p = (100 - \alpha)$ die 95. Perzentile dem gesuchten *LoB*.

Unterhalb dieser Grenze, auf die 95% aller Messergebnisse von tatsächlich negativen Proben fallen, sind alle Werte nicht sicher als positiv detektierbar. Es besteht jedoch eine Wahrscheinlichkeit von 5%, dass ein negative Probe einen Messwert oberhalb dieser Grenze ergibt. Folglich wird eine tatsächlich negative Probe positiv gewertet. Dies wird α - oder Typ I Fehler genannt.

Das *LoD* hingegen entspricht derjenigen Konzentration bei der 95% der Messungen das evaluierte *LoB* überschreiten.

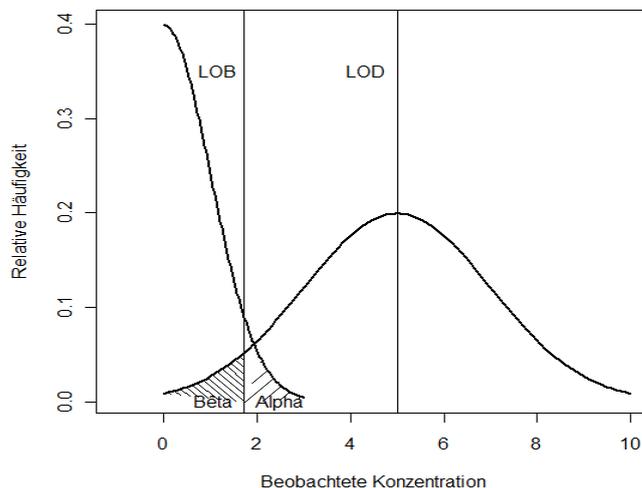


Abb.6: Relation LoD zu LoB

In 5 % der Messungen kann jedoch Ergebnis unterhalb dieser Grenze fallen und somit nicht mehr von den negativen Proben differenziert werden. Man spricht von einem β - oder Typ II Fehler, wenn eine positive Probe negativ gewertet wird.

2.4.2. Bestimmung des *LoB*

Das *LoB* wird über wiederholte Messungen von mehreren negativen Proben bestimmt. Es ist wichtig, dass das *LoB* zeitlich vor der Bestimmung des *LoD* erfolgt. Die Kenntnis des *LoB* für die erwartete Kalkulation des *LoD* ist zwingend erforderlich, da die Proben zur Bestimmung des *LoD* in der ein- bis vierfachen Konzentration des *LoB* präpariert werden müssen. Da in diesem Setting keine maschinelle Bestimmung des *LoB* erfolgt, sondern „menschliche“ Mikroskopisten das zu evaluierende Instrument darstellen, ist es wichtig, dass diesen das Studienziel unbekannt ist und bleibt. Des Weiteren muss gewährleistet werden, dass die Mikroskopisten zu Beginn der Bestimmung des *LoB* nicht wissen dürfen, welche Proben negativ sind, was durch eine Verblindung und Randomisierung mit positiven Proben sicher zu stellen ist (siehe 2.7)

Die Anzahl (N_B) sollte laut Richtlinie mindestens 60 Messungen für die negativen Proben betragen, aus denen anschließend ein valides Limit of Blank bestimmt werden kann. Entsprechend der Empfehlungen der *International Organization for Standardization* (ISO) wurde der Typ I und Typ II Fehler auf 5 festgesetzt: $\alpha = \beta = 5\%$.

$$LoB = Pct_B 100-\alpha$$

Die limitierende Perzentile Pct_B der Verteilung der Messwerte trennt die oberen $5\% = \alpha$ der Werte von den anderen 95% in der Verteilung und entspricht unserem gesuchtem *LoB*. Bei einem α von 5 fällt unser *LoB* folglich mit der 95. Perzentile der Messwerte zusammen.

Da bei der Lektüre des Dicken Tropfens keine negativen Messwerte unter 0 möglich sind und sich somit keine Normalverteilung der Messergebnisse gibt, muss ein nicht-parametrischer Ansatz zur Bestimmung des *LoB* heran gezogen werden.

Hierzu werden die Resultate N_B aufsteigend geordnet. Bei zum Beispiel 100 Messungen wäre die 95. Perzentile der Mittelwert der an 95 und 96 Position gelegenen Messergebnisse.

Falls an diesen Positionen kein ganzzahliger Wert vorliegt wird eine lineare Interpolierung zwischen den betroffenen Positionen angewandt

Letztendlich gilt:

$$LoB = \text{Ergebnis an Position} \left[N_B \left(\frac{p}{100} \right) + 0,5 \right] = P_{(1-\alpha)}$$

In dieser Arbeit wurden insgesamt 160 Messungen zur Kalkulation des *LoB* durchgeführt, folglich ist $N_B=160$. Die nicht-parametrische Berechnung des *LoBs* ergibt:

$$N_B \left(\frac{p}{100} \right) + 0,5 = 160 \left(\frac{95}{100} \right) + 0,5 = 152,5$$

Aufgrund des nicht integren Wertes von 152,5 wird eine lineare Interpolierung der Ergebnisse der Dicken Tropfen an Position 152 und 153 durchgeführt. In diesem Fall ist dies der Mittelwert. Dieser Wert entspricht der 95. Perzentile und gleichzeitig dem gesuchten *LoB*.

2.4.3. Determination of *LoD*

Die Berechnung des Limit of Detection wird über die Standardabweichung von wiederholten Messungen N_S von mehreren niedrig positiven Proben (s) durchgeführt. Die Proben sollte dabei in der ein bis vierfachen Konzentration des geschätzten *LoB* angefertigt werden. Hierbei ist es nicht vordergründig die exakten Konzentrationen der niedrig positiven Proben zu kennen, denn dass das Limit of Detection wird über die Standardabweichung in dem jeweiligen Konzentrationsbereich ermittelt.

Da zur Herstellung der niedrig positiven Proben in dem empfohlenen Konzentrationsbereich das *LoB* bekannt sein muss, erfolgen diese Schritte erst nach der Evaluierung des *LoB*. Es sollen insgesamt mindestens 60 Messungen der niedrig positiven Proben verschiedener Konzentrationen erfolgen.

Für das parametrisch bestimmte *LoD* gilt:

$$LoD = LoB + c_\beta SD_S$$

Das *LoD* liegt immer über dem bestimmten *LoB* und es setzt sich aus dem Produkt der Standardabweichung SD_S und einem Korrektionsfaktor c_β zusammen. Die Standardabweichung SD_S der niedrigen Konzentrationen wird aus einer gepoolten Standardabweichung berechnet. Es ist ein geschätzter, Bias-behafteter Wert der Standarddeviation der Population σ_S . Daher wird der Korrektionsfaktor c_β , der von der 95. Perzentile der Standard Gaußverteilung abgeleitet ist, vorangestellt:

$$c_\beta = 1.645 / (1 - 1 / (4 * f))$$

f ist der Grad der Freiheit von SD_S und wird über die Differenz der Messungen N_S und der Anzahl der verwendeten Proben K berechnet:

$$f = N_S - K.$$

In unsere Arbeit wurden 6 niedrig positive Dicke Tropfen ($f=6$) jeweils 30 mal gelesen. Insgesamt wurden somit 180 Lektüren für die Kalkulation des LoD bestimmt.

Dementsprechend gilt für c_β bei einem Freiheitsgrad von $f = N_S - K = 180 - 6 = 174$

$$c_\beta = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{(4*f)}} = \frac{1.645}{\left(1 - \frac{1}{4*174}\right)} = 1.65$$

Für SD_S ist die Kalkulation der gepoolten Standardabweichung erforderlich. Voraussetzung für die Bestimmung der gepoolten Standardabweichung ist eine Normalverteilung der Ergebnisse.

Bei der Lektüre der Dicken Tropfen wird eine gaußsche Verteilung der Resultate um die entsprechende Konzentration erwartet. Diese kann mit statistischen Test auf ihre Normalverteilung getestet werden. Falls keine gaußsche Normalverteilung der Ergebnisse vorliegt, kann durch Transformation eine Normalverteilung generiert werden. Das LoD wird dann in der transformierten Einheit kalkuliert. Nach Berechnung des LoD in der transformierten Einheit kann eine reverse Umwandlung in die ursprüngliche Einheit erfolgen. Wenn eine gaußsche Verteilung der Messwerte und eine konstante Standardabweichung um die niedrig positiven Konzentrationen vorliegen, ist die gepoolte Standardabweichung

$$SD_S^2 = \frac{(n-1) \sum_i^n SD_{Si}^2}{f}$$

Mit $n-1$ als Freiheitsgrad und SD_{Si} als Standardabweichung der jeweiligen Ausmessungsserien. SD_S ist die Quadratwurzel der gepoolten Standardabweichung und folglich gilt für die endgültige Kalkulation des LoD :

$$LoD = LoB + 1.65 * SD_S$$

2.5. Mikroskopie des Dicken Tropfens

2.5.1. WHO-Methode

Die Mikroskopie des Dicken Tropfens nach der WHO-Methode ist ein Zählverfahren zur Bestimmung der Menge von Malariaparasiten. Sie ist das am häufigsten verwendete Instrument der Malariadiagnostik.

Bei der Herstellung eines Dicken Tropfens werden zunächst etwa ein Tropfen Kapillarblut oder antikoaguliertes Venenblut (5-10 μ l) auf einen gläsernen Objektträger aufgetragen und mit einer Pipette oder einem zweiten Objektträger auf einer etwa 15mm durchmessenden runden Fläche verteilt. Dabei ist Verteilung des Blutes ideal, wenn man gerade noch durch die aufgetragene Blutschicht hindurch sehen kann. Um Kontaminationen zu vermeiden sollte die Herstellung des Dicken Tropfens in einem möglichst sauberen, staubfreien Umfeld erfolgen. Nach Lufttrocknung von etwa 20 Minuten oder fünf Minuten in einem Inkubator bei 40°C werden die Ausstriche für 20 Minuten in Giemsa Lösung (in der Regel 10-20 prozentig) gefärbt, anschließend vorsichtig mit Leitungswasser abgewaschen und nochmals luftgetrocknet.

Zur Bestimmung der Parasitämie werden Dicke Tropfen in der Regel bei 100-facher Vergrößerung unter einem Immersionsöl-Objektiv mikroskopiert. In jedem untersuchten Gesichtsfeld, auch als *high power field* (HPF) bezeichnet, wird die Anzahl der Parasiten sowie der Leukozyten mithilfe von mechanischen Zählgeräten bestimmt. Die Quantifizierung der Parasitämie erfolgt über die Relation der gezählten Parasiten zu den gezählten Leukozyten im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Leukozyten (N_{Ges} Leukozyten) des Patienten. Die Gesamtzahl der Leukozyten wird entweder hämatologisch bestimmt oder auf einen Durchschnittswert von 8000 Zellen/ μ l bezogen und die Parasitämie mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{N \text{ Parasiten} * N_{Ges} \text{ Leukozyten} / \mu\text{l}}{N \text{ Leukozyten}} = \text{Parasiten} / \mu\text{l}$$

Die Anzahl der zu zählenden Leukozyten hängt von der Anzahl der gefundenen Parasiten ab.

Tab.2: Anzahl zu zählende Leukozyten WHO Methode

| Parasiten/HPF | >100 | 50-100 | 10-50 | 0-10 |
|------------------------|------|--------|-------|------|
| Zu zählende Leukozyten | 50 | 100 | 200 | 500 |

In der Regel müssen bei niedrigen Parasitenzahlen relativ mehr Leukozyten gezählt werden um weiterhin ein exaktes Ergebnis zu erhalten. Ein Dicker Tropfen darf erst als negativ bewertet werden, wenn mindestens 500 Leukozyten und kein Parasit gezählt wurden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Gesamtleukozytenzahl einer großen natürlichen interindividuellen Varianz unterliegt und durch weitere Faktoren, wie unter anderem Begleiterkrankungen beeinflusst werden, und somit direkten Einfluss auf die Berechnung der Parasitämie haben. In vielen Fällen ist die Möglichkeit oder die Indikation einer hämatologischen Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl nicht gegeben und man muss mit dem vorgegebenen Durchschnittswert operieren.

2.5.2. Lambaréné Methode

Diese in Lambaréné entwickelte Methode ist eine Technik zur quantitativen Bestimmung der Parasitämie ohne die Zählung von Leukozyten. Geringerer Zeitaufwand, hohe Sensitivität und eine Genauigkeit der Parasitämiebestimmung wie bei der Methode des dünnen Blutausriches sind die Vorteile gegenüber dem konventionellen Dicken Tropfen [115]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verteilung eines vorgegebenen Volumens auf eine festgelegte Fläche. Es werden 10 μ l kapilläres oder venöses Blut möglichst gleichmäßig mithilfe einer Pipette auf einem Objektträger auf einer rechteckigen Fläche von 10x18mm verteilt. Hierbei wird eine Schablone mit der aufgezeichneten Fläche unter den Objektträger gelegt. Die weitere Verarbeitung und Färbung entspricht dem der WHO Methode.

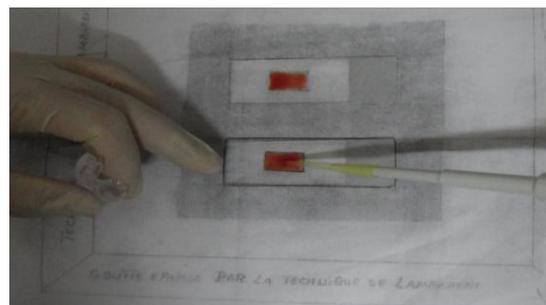


Abb.7: Herstellung Dicker Tropfen Lambaréné Methode

Bei der Mikroskopie der Lambaréné Methode werden die Anzahl der untersuchten Gesichtsfelder sowie die Anzahl der Parasiten mithilfe von mechanischen Zählgeräten bestimmt. Aufgrund der regelmäßigen Verteilung des bekannten Blutvolumens auf einer Fläche von 180mm^2 entspricht ein HPF, bei einer Standardvergrößerung von 1000 exakt $1/600\mu\text{l}$ Blut. Somit kann die Parasitämie über das Verhältnis von Parasiten pro Gesichtsfeld unter zur Hilfenahme des für das jeweilige Mikroskop spezifischen Mikroskopfaktors (MF) berechnet werden.

Der Mikroskopfaktor ist die Anzahl von Gesichtsfeldern, welche einen $1\mu\text{l}$ Blut abdecken. Er ist der Quotient aus der Fläche eines μl Blutes eines Blutausstriches nach Lambaréné Methode und der Fläche eines Gesichtsfeldes des verwendeten Mikroskopes.

$$MF = \frac{A_{TBS}}{A_{\text{Gesichtsfeld}}}$$

Die Fläche eines Gesichtsfeldes berechnet sich auf Grundlage der jeweiligen Spezifikationen des optischen Systems, die auf dem Okular zu finden sind, wobei der erste Wert der Vergrößerung des Okulars entspricht und der zweite Wert der Sehfeldzahl. Die Sehfeldzahl ist der Durchmesser eines Gesichtsfeldes multipliziert mit der Vergrößerung des jeweiligen Objektivs in mm. Beispielsweise ist bei einem Objektiv mit 100x Vergrößerung, einer Vergrößerung des Okulars von 10 und einer Sehfeldzahl von 20 der Durchmesser eines Gesichtsfeldes $0,2\text{mm}$.

Die Fläche eines kreisrunden Gesichtsfeldes ist $A = \pi r^2$, wobei r dem halben Durchmesser des Gesichtsfeldes entspricht.

Die Fläche eines $1\mu\text{l}$ Blutes eines Ausstriches nach Lambaréné Methode ist 18mm^2 da für einen Dicke Tropfen $10\mu\text{l}$ Blut auf einer Fläche von $1,8\text{cm}^2$ verteilt werden.

Für die Bestimmung des Mikroskopfaktors für ein Okular mit der Sehfeldzahl 20 und einer Vergrößerung von 10 mit einem 100er Objektiv gilt:

$$MF = \frac{A_{TBS}}{A_{\text{Gesichtsfeld}}} = \frac{18}{\pi r^2} = \frac{18}{0,31} = 580$$

Mit Hilfe des Mikroskopfaktors ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Parasitämie/ μl :

$$\frac{N \text{ Parasiten}}{N \text{ HPF}} * \text{Mikroskopfaktor} = \text{Parasiten}/\mu\text{l}$$

Die Anzahl der auszuzählenden HPFs richtet sich nach der Anzahl der Parasiten pro Gesichtsfeld und ist in der verwendeten Arbeitsanweisung wie folgt festgelegt:

Tab.3: Anzahl zu zählender HPFs Lambaréné Methode

| Parasiten/HPF | >100 | 50-100 | 10-50 | 0-10 |
|------------------|------|--------|-------|------|
| Zu zählende HPFS | 20 | 30 | 50 | 100 |

Um einen Ausstrich negativ zu bewerten, müssen mindestens 100 HPFs ohne Parasit ausgezählt werden. Je höher die Anzahl an Parasiten pro Gesichtsfeld ist, desto weniger HPFs werden für die Bestimmung der Parasitämie benötigt.

2.6. Herstellung der Dicken Tropfen

2.6.1. Herstellung negative dicke Tropfen

Zur Herstellung der negativen Dicken Tropfen wurde kapilläres EDTA Blut von fünf gesunden, nicht exponierten, freiwilligen Probanden verwendet. Es handelte sich um europäische Studenten und wissenschaftliche Mitarbeiter deren Ankunft in Lambaréné nicht länger als zwei Wochen zurücklag und somit die Expositionszeit für die Entwicklung einer manifesten Malariainfektion nicht ausreichend war.

Die Blutentnahme erfolgte in einem geschlossenen Untersuchungsraum. Aus der Fingerbeere wurden mithilfe einer Stechlanzette 400-500µl Blut in einem Ethylendiamintetraacetat (EDTA)- Röhren gesammelt, wobei 80-100µl zur Herstellung der Dicken Tropfen und 300-400µl zur DNA-Extraktion für die *nested Polymerase Chain Reaction* (PCR) verwendet wurden. Das Blut für die PCR wurde bis zur Durchführung bei -20 Grad gelagert.

Aus dem kapillären EDTA-Blut der fünf negativen Probanden wurden direkt im Anschluss jeweils vier Dicke Tropfen angefertigt. Insgesamt wurden jeweils 20 negative Dicke Tropfen nach Lambaréné und WHO- Methode präpariert.

Um Kontaminationen zu vermeiden wurde darauf geachtet, dass die Herstellung auf einer sauberen, staubfreien Arbeitsfläche in einem geschlossenen Raum erfolgte.

Anschließend wurden die Dicken Tropfen in flacher Position für 5 Minuten im Inkubator bei 40° Celsius luftgetrocknet und im Anschluss gefärbt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Dicke Tropfen in verschließbaren Plastikboxen oder Pappkladden gelagert. Jeder Dicke Tropfen wurde, mit einer Identifikationsnummer versehen, in einer Tabelle registriert. Die Identifikationsnummer enthält folgende vier Komponenten: Studienname (*LoD*); Methode (L=Lambaréné oder W=WHO); Probandennummer (P1-P5); Färbung des Dicken Tropfen (1-4)

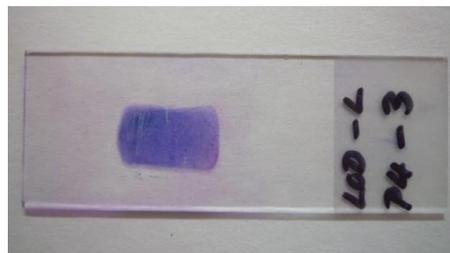


Abb.8: Beispiel *LoD*-L-P4-3: *LoD*, Lambaréné Methode, Proband Nummer 4, Färbung Nummer 3, unverblindet

Nach der Färbung wurden die Dicken Tropfen gelesen, um zu verifizieren, dass sie frei von Parasiten und Kontaminationen sind. Anschließend wurden sie mit positiven Dicken Tropfen aus dem Routinelabor randomisiert, verblindet und in Serien zusammengefasst (siehe Randomisierung und Verblindung).

2.6.2. Herstellung positive Dicke Tropfen

Die Entnahme der positiven Blutproben erfolgte nach der Bestimmung des *LoB*, da die Kenntnis des *LoB* zur Herstellung der niedrig positiven Dicken Tropfen zur Bestimmung des *LoD* notwendig ist. *P. falciparum* infiziertes Blut für die Herstellung der positiven Dicken Tropfen wurde von Erwachsenen, die sich mit klinischen Symptomen einer Malaria in der URM vorstellten, vor der Therapie entnommen. Dies erfolgte freiwillig, mit Einverständnis des Patienten nach einem Aufklärungsgespräch.

Ziel ist es mindestens vier niedrig positiven Dicken Tropfen in der ein bis vierfachen Konzentrationen des *LoB* herzustellen. Nach der Entnahme des *P. falciparum* positiven Blutes der insgesamt fünf Probanden wurde jeweils ein Dicker Tropfen nach der Lambaréné Methode hergestellt, gelesen und die initiale Ausgangsparasitämie bestimmt. Hierbei wurden mindestens 200 HPFs zur Bestimmung der Parasitämie

ausgelesen. Anschließend erfolgte die zügige Weiterverarbeitung und Herstellung der niedrig positiven Dicken Tropfen. Über eine Verdünnung des *P. falciparum* infizierten Blutes wurden die entsprechenden Konzentrationen erreicht.

Die geometrische Verdünnungsreihe des *P. falciparum* infizierten EDTA Blutes wurde mit 0- Rhesus positiven antikoagulierten EDTA Blut eines freiwilligen, gesunden Spenders durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10µl der *P. falciparum* positiven Proben mit 90µl 0-Rhesus positiven Blut in ein 1ml Eppendorf pipettiert um eine Verdünnungsverhältnis von 1:10 zu erhalten. Anschließend wurden 10µl der Verdünnung mit 90µl 0-Rhesus positiven Blut in ein weiteres Eppendorf aliquotiert, so dass sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:100 ergab. Je nach initialer Ausgangsparasitämie wurden weitere Verdünnungen bis zum Erreichen der gewünschten Konzentrationen durchgeführt (siehe Ergebnisse).

Aufgrund der zu erwartenden relativ größeren Standardabweichung bei der Lektüre der initialen Ausgangsparasitämies und der somit verbundenen Varianz in den Parsitämies nach der Verdünnung wurden anstatt der empfohlenen vier niedrig positiven Konzentrationen insgesamt 10 niedrig positive Proben hergestellt. Aus diesen 10 Verdünnungsreihen wurden jeweils vier Dicke Tropfen nach Lambaréné und WHO Methode angefertigt, so dass pro Methode 40 Dicke Tropfen in 10 verschiedenen niedrig positiven Konzentrationen vorlagen. Die Beschriftung erfolgte dabei nach demselben Prinzip wie bei den negativen Dicken Tropfen, wobei neben Ziffern ein L für Lambaréné und ein W für WHO Methode steht. Nach der Färbung wurden alle 40 niedrig positiven Dicken Tropfen gelesen und die Parasitämie bestimmt. Im Anschluss wurden pro Methode jeweils sechs niedrig positive Dicke Tropfen in unterschiedlichen Konzentrationen selektiert, die zur Bestimmung des *LoD* verwendet wurden.

2.6.3. Färbung der Dicken Tropfen

Die verwendete Giemsalösung wurde aus 80ml Tritisolpuffer (Firma Merck), pH 8,2 und 20 ml Giemsalösung (Firma Merck) angesetzt. Nach vollständiger Filtration durch einen Papierfilter wurde die nun gebrauchsfertige Lösung in ein Färbebehältnis überführt. Vor der ersten Benutzung wurde ein positiver Dicker Tropfen aus dem Laborbestand als Qualitätskontrolle durchgeführt und von einem erfahrenen

Mikroskopist kontrolliert. Ist die Färbung des Dicken Tropfens mangelhaft wurde eine neue Färbelösung angesetzt und das Prozedere wiederholt, bis die geforderte Qualität gegeben ist.

Nach der Positionierung im Färbebehältnis wurden die Objektträger 20 Minuten gefärbt. Im Anschluss wurden die Dicken Tropfen vorsichtig mit Leitungswasser abgewaschen und in aufrechter Position im Inkubator bei 40° Celsius für etwa fünf Minuten luftgetrocknet.

Um die geforderte Varianz und Natürlichkeit der Dicken Tropfen zu reflektieren wurden zwei verschiedene Giemsa Lösungen des gleichen Herstellers angesetzt, um etwaige Unterschiede in der Präparation darzustellen. Des Weiteren gab es zwei verschiedene Färbezeitpunkte, jeweils in frischer oder in drei Stunden alter Lösung. Somit ergab sich folgendes Färbeschema:

Tab.4: Färbeschema Giemsalösung

| Färbezeitpunkt [h] | 0 | 3 |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Giemsa Lösung 1 | <i>LoD-L/W-P1-P11-1</i> | <i>LoD-L/W-P1-P11-2</i> |
| Giemsa Lösung 2 | <i>LoD-L/W-P1-P11-3</i> | <i>LoD-L/W-P1-P11-4</i> |

Jeder Dicke Tropfen mit der Endziffer 1 und 3 wurde in frischer Giemsalösung gefärbt, wohingegen alle Dicken Tropfen mit der Endziffer 2 und 4 in 3 Stunden alter Giemsalösung gefärbt wurden.

2.7. Randomisierung und Verblindung

Für die Bestimmung des *LoB* wurden jeweils 20 negativen Dicken Tropfen nach Lambaréné und WHO Methode mit jeweils 20 positiven Dicken Tropfen aus dem Routinelabors randomisiert und verblindet. Die negativen Dicken Tropfen der Lambaréné Methode stammen von den Probanden 1 bis 5. Die positiven Dicken Tropfen wurden aus dem Bestand des Labors nach Rücksprache mit dem entsprechenden Verantwortlichen entnommen.

Um eine Abnutzung und Abwaschung von Zellbestandteilen durch die wiederholte Mikroskopie mit Immersionsöl zu vermeiden und um gleiche Bedingungen bei der

Lektüre zu gewähren, wurden die ausgewählten Dicken Tropfen vor der Lektüre mit Deckgläschen versiegelt.

Für die Evaluierung des *LoB* wurden zwei Sequenzen mit jeweils 20 Dicken Tropfen präpariert, wobei die Randomisierung der Dicken Tropfen durch zufällige Zuordnung mittels Münzwurf durch eine unbeteiligte dritte Person erfolgte. Im Anschluss erfolgte die Verblindung mit nicht transparenten Aufklebern, die über die Beschriftungsfläche des Objektträgers geklebt wurden. Die verblindeten Dicken Tropfen wurden in aufsteigender Reihenfolge mit einer Identifikationsnummer versehen und in einer Tabelle registriert. Die Identifikationsnummer besteht aus 4 Komponenten:

Studienname: *LoD* ; Methode L= Lambaréné oder W= WHO ; Sequenznummer: 1-8 ;
Rangnummer: 1-20

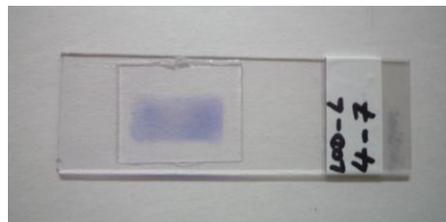


Abb.9: Beispiel *LoD*-L-4-7: Studie *LoD*, Lambaréné Methode, vierte Sequenz, Dicker Tropfen Nummer 7, verblindet.

Die niedrig positiven Dicken Tropfen für die Evaluierung des *LoDs* stammen aus dem Bestand der Dicken Tropfen der Probanden 11-15. Nach der Bestimmung des *LoB* wurden sechs niedrig positive Dicken Tropfen selektiert, die den geforderten Kriterien der Guideline entsprachen.

Es wurde darauf geachtet, dass die Dicken Tropfen von allen fünf Probanden stammen, verschiedene Konzentrationen aufweisen und die gesamte Palette des Färbeschemas präsentiert ist. Zu diesen sechs selektierten positiven Dicken Tropfen wurden zwei negative Dicke Tropfen der Probanden 1-5 hinzugefügt, die additiv in die Kalkulation des *LoB* verwendet wurden. Insgesamt bestand eine Sequenz aus acht Dicken Tropfen. Randomisierung und Verblindung erfolgten nach dem gleichem Prinzip wie für die Bestimmung des *LoBs*.

2.8. Lektüre der Dicken Tropfen

Bei der Durchführung der Lektüre zur Evaluierung des *LoB* wurden den Mikroskopisten zwei Sequenzen mit jeweils 20 Dicken Tropfen ausgehändigt. Auf dem beigefügten Ergebnisblatt wurde neben dem Datum und der Uhrzeit der jeweiligen Lektüre auch die Anzahl der gezählten HPFs und pf/ μ l für die Lambaréné Methode angegeben. Für die WHO-Methode fand sich jeweils eine Spalte für die gezählten Leukozyten und die Anzahl der pf/ μ l. Jedes Ergebnisblatt wurde vom jeweiligen Mikroskopist nach Komplettierung der gesamten Sequenz unterschrieben.

Für die Bestimmung des *LoD* erhielten die Mikroskopisten nacheinander insgesamt fünf Sequenzen mit jeweils acht Dicken Tropfen. Diese bestanden aus sechs niedrig positiven Dicken Tropfen der Probanden Nummer 11-15 sowie zwei negativen Dicke Tropfen aus dem Bestand der Evaluierung des *LoBs*. Das hinzu gefügte Ergebnisblatt entspricht dem Design für die Evaluierung des *LoB*. Nach dem alle Mikroskopisten eine Sequenz komplettiert hatten, wurden die Slides erneut randomisiert und verblindet. Insgesamt wurden auf diese Weise fünf verschiedene Sequenzen hergestellt und gelesen.

Insgesamt wurde jeder der sechs niedrig positiven Dicken Tropfen fünf Mal von den sechs Mikroskopistenn gelesen wurde. Somit ergibt sich eine Summe von 30 Lektüren pro Konzentration und eine Gesamtzahl 160 Lektüren.

Die Lektüre der zwei negativen Dicken Tropfen ging in die Kalkulation des *LoB* ein.

2.9. Verifizierung mittels nested PCR

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den verwendeten positiven Proben, um eine *P. falciparum* Infektion, sowie bei den negativen Proben um *Plasmodium*-freie Probanden handelt wurde eine *nested* PCR zur Überprüfung durchgeführt. Die *nested* PCR ist eine Modifikation des PCR Verfahrens und arbeitet in zwei Schritten mit jeweils zwei verschiedenen Primer Paaren. Mit dem ersten Primer Paar wird eine DNA-Sequenz in mehreren Zyklen amplifiziert, die anschließend als Matrize für das zweite Primerpaar dient, die wiederum einen kleineren Ausschnitt aus der ersten DNA Sequenz amplifiziert. Somit wird eine deutlich höhere Sensitivität erreicht. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) aus 200 μ l EDTA-Blut. Im

Methoden

Anschluss wurde die *nested* PCR mit folgenden Primern nach dem Protokoll von Singh durchgeführt [116]:

Erstes Primer Paar: Plasmodien spezifische Primer:

rPLU1: 5' TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3'

rPLU5: 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'

Zweites Primer Paar: *P. falciparum* spezifische Primer

rFAL 1 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT

rFAL 2 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC

Im ersten Schritt der *nested* PCR wurde folgende Reagenzien in entsprechender Konzentration zu einem Gesamtvolumen von 20µl pipettiert und anschließend im Thermozykler in 35 Zyklen bei unten angeführten Temperaturen repliziert.

Tab.5: 1. Pipettierschema PCR 1

| Reagenzien | Endkonzentration |
|--------------------------|------------------|
| rPLU1 | 0,25µM |
| rPLU5 | 0,25µM |
| dNTPs | 125µM |
| MgCl ₂ | 500µM |
| Buffer-Lösung | 1x |
| Taq Polymerase | 0,02 units/µL |
| Template (Parasiten DNA) | 5µL |

Tab.6: Temperatur und Zyklen nested PCR

| | |
|------------|-------|
| 95°C 5 min | |
| 58°C 2 min | } x35 |
| 72°C 2 min | |
| 94°C 1 min | |
| 58°C 2 min | |
| 72°C 5 min | |

Im zweiten Schritt erfolgt die erneute Replikation mit den *P. falciparum* spezifischen Primern aus dem Template, dem Produkt der ersten Replikation, nach dem selben Prinzip.

Tab.7: 2. Pipettierschema PCR 2

| Reagenzien | Endkonzentration |
|--|------------------|
| rFAL1 | 0,25µM |
| rFAL2 | 0,25µM |
| dNTPs | 125µM |
| MgCl ₂ | 500µM |
| Buffer-Lösung | 1x |
| Taq Polymerase | 0,02 units/µL |
| Template (Produkt des erten Schrittes) | 1µL |

Die Auswertung der amplifizierten DNA- Sequenzen wurde mittels Agarose-Gel Elektrophorese durchgeführt.

2.10. Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2007 und dem Statistik Programm R (Version Rv2.6.1, www.r-project.org).

Methoden

Standardabweichungen, Mittelwert und Transformation der Daten wurden mithilfe von Excel durchgeführt. Weitere Analysen, wie Normalverteilung und Erstellung von Grafiken erfolgten mit R.

3. Material

3.1. Equipement

Mikroskop Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan

Mikroskop Olympus CH 30, Tokyo, Japan

Inkubator mit 40°C Innentemperatur, nicht bekannt

Sarstedt 1 ml EDTA Röhrchen, Sarstedt

Stechlanzetten Unistik 3 Extra, Owen Mumford, Woodstock, England

Pipette CP10, 10µl, Clinipet+, HTL Lab solutions, Warschau, Polen

Objekträger, R. Langenbrinck 76x26mm, Emmendingen

Deckgläser 22x22mm, Chance Proper Ltd., West Mids, England

Papiervorlage mit aufgezeichneter 10x18mm großer Fläche

Thermal cycler Biorad, Berkeley/Kalifornien, USA

3.2. Reagenzien

Präparation/Färbung Dicker Tropfen

Giemsa R-Lösung Firma Merck®, Darmstadt

Titrisol® Puffer pH 7.2, Merck®, Darmstadt

Immersionsöl Olympus®

Einschlussmittel Eukitt®, Firma O. Kindler GmbH, Freiburg

70% Ethanol

Nested PCR

QIAmp DNA Blood Mini Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland

PCR Buffer, Qiagen

25mM MgCl₂, Qiagen

Taq DNA polymerase 5units/µL, Qiagen

Gelelektrophorese

2% Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf

TBE Puffer:

89mM Tris Base, Sigma, St. Louis, USA

89mM Borsäure, Sigma

2mM EDTA, Sigma

3.3. Mikroskopisten

Alle sechs eingesetzten Mikroskopisten verfügen über die entsprechende berufliche Qualifikation und Ausbildung als Labortechniker und mindestens zwei Jahre Erfahrung in der Mikroskopie des Dicken Tropfens.

Alle haben die initialen laborinternen Anforderungen und Qualitätskontrollen zur Akkreditierung der Lektüre von Studien- und Routineuntersuchungen von Dicken Tropfen erfüllt. Des Weiteren durchlaufen vier von den sechs Mikroskopisten in regelmäßigen Abständen externe Qualitätskontrollen im Rahmen einer multinationalen Studie.

4. Ergebnisse

4.1. LoB

Es wurden insgesamt 160 Messungen der negativen Dicken Tropfen nach Lambaréné und WHO Methode durchgeführt. Davon wurden 100 Messungen in den ersten zwei Sequenzen erhoben und ein vorläufiges *LoB* bestimmt, um die niedrig positiven Dicken Tropfen für die Bestimmung des *LoD* in der geforderten ein bis vierfachen Konzentration präparieren zu können.

Zur Berechnung des *LoB* gilt folgende Formel:

$LoB = Pct_{B\ 100-\alpha}$, wobei α auf den Wert 5 festgesetzt ist (siehe Methoden 2.3.1).

Es wurde ein nicht-parametrischer Ansatz zur Bestimmung des *LoBs* gewählt, da bei den Werten nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Nach der Lektüre wurden die Ergebnisse der negativen Dicken Tropfen entsprechend ihres Wertes der Parasitämie pro Mikroliter aufsteigend geordnet. Das gesuchte *LoB*, welches der 95. Perzentile entspricht ist der interpolierte Wert an folgender Position:

$$LoB = \text{Ergebnis an Position} \left[N_B \left(\frac{p}{100} \right) + 0.5 \right] = P_{(1-\alpha)}$$

Das vorläufige *LoB* bestimmt aus 100 Messungen $N_B=100$ (gefordert sind mindestens 60 Messungen laut der angewandten Guideline EP17) bei einem vorher fest gestzten p von 0,05 entspricht also dem Mittelwert der an Position 95 und 96 gelesenen Resultate. In der folgenden Tabelle ist ein Ausschnitt ab Position 91 abgebildet, da alle anderen darunter liegenden Positionen dem Wert 0 entsprechen

Tab.8: Rangfolge Lektüre *LoB* n=100 Messungen

| Rangfolge | Resultat pf/ μ l | |
|------------|----------------------|-----|
| | Lambaréné | WHO |
| 100 | 40 | 0 |
| 99 | 0 | 0 |
| 98 | 0 | 0 |
| 97 | 0 | 0 |

Ergebnisse

| | | |
|-----------|----------|----------|
| 96 | 0 | <u>0</u> |
| 95 | 0 | <u>0</u> |
| 94 | 0 | 0 |
| 93 | 0 | 0 |
| 92 | 0 | 0 |
| 91 | 0 | 0 |
| ... | ... | ... |

Das *LoB* nach 100 Messungen lag für die Mikroskopie nach Lambaréné und WHO Methode bei 0pf/µl. Ein einzelner Dicker Tropfen der Lambaréné Methode wurde mit 40pf/µl falsch positiv gelesen.

Im Zuge der Erhebung des *LoD* wurden nochmals 60 Messungen von negativen Dicken Tropfen bestimmt und zur endgültigen Kalkulation des *LoBs* herangezogen.

Bei einem p von 0,05 und insgesamt 160 Messungen entspricht die 95. Perzentile dem Mittelwert der 152. Und 153. Messung

In der folgenden Tabelle ist ein Ausschnitt ab Position 153 abgebildet, da alle anderen darunter liegenden Ränge dem Wert 0 entsprechen:

Tab.9: Rangfolge Lektüre LoB n=160 Messungen

| Rangfolge | Resultat pf/µl | |
|------------|----------------|----------|
| | Lambaréné | WHO |
| 160 | 40 | 70 |
| 159 | 18 | 44 |
| 158 | 16 | 0 |
| 157 | 10 | 0 |
| 156 | 0 | 0 |
| 155 | 0 | 0 |
| 154 | 0 | 0 |
| 153 | 0 | 0 |

Ergebnisse

| | | |
|------------|----------|----------|
| <i>152</i> | <i>0</i> | <i>0</i> |
| 151 | 0 | 0 |
| 150 | 0 | 0 |

Von 160 Messungen der negativen Dicken Tropfen wurden vier für die Lambaréné und zwei für die WHO Methode falsch positiv gelesen. Bei der vorher festgelegten Wahrscheinlichkeit für den α - Fehler von 5 liegen alle falsch positiven Werte jenseits der 95. Perzentile. An den Positionen 152 und 153 ist das Ergebnis 0 und ergibt sich somit für das *LoB* der Lambaréné Methoden als auch für die WHO-Methode nach 160 Messungen ein *LoB* von 0pf/ μ l:

$$LoB_{Lambaréné} = Pct_{B\ 100-\alpha} = \text{Ergebnis as Position} \left[160 \left(\frac{0,05}{100} \right) + 0.5 \right] = 0$$

$$LoB_{WHO} = Pct_{B\ 100-\alpha} = \text{Ergebnis an Position} \left[160 \left(\frac{0,05}{100} \right) + 0.5 \right] = 0$$

4.2. *LoD*

4.2.1. Vorbereitung und Herstellung niedrig positiver Dicker Tropfen

Nach Empfehlung der Leitlinie *EP17* sollen nach Bestimmung des *LoB* niedrig positive Proben in einem Bereich der ein- bis vierfachen Konzentration des vorher bestimmten *LoB* hergestellt werden und wiederholt analysiert werden. Da das *LoB* für die Lambaréné als auch für die WHO Methode bei 0 liegt wurden mehrere Serien von niedrig positiven Dicken Tropfen im Konzentrationsbereich von 10-100 pf/ μ l hergestellt. Nach der Blutentnahme der mit fünf mit *P. falciparum* infizierten Probanden wurde ein Dicker Tropfen angefertigt und die initiale Parasitämie bestimmt.

Tab.10: Initiale Parasitämie 200 HPFs in [pf/ μ l]

| Proband | P-11 | P-12 | P-13 | P-14 | P-15 |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Initiale Parasitämie | 4200pf/ μ l | 7000pf/ μ l | 49704pf/ μ l | 3715pf/ μ l | 4788pf/ μ l |

Ergebnisse

Anhand dieser Parasitämie wurde die geometrische Verdünnungsreihe bis zu den gewünschten Konzentrationen durchgeführt. Im direkten Anschluss wurden Serien mit jeweils vier Dicken Tropfen nach der Lambaréné und WHO Methode hergestellt und nach der Färbung die Parasitämie [200HPFs] bestimmt.

Tab.11: Herstellung Verdünnungsreihen niedrig positive Dicke Tropfen

| Proband | Serie | Verdünnung | Erwartete Parasitämie | gelesene Parasitämie | |
|---------|------------|------------|-----------------------|----------------------|-----------|
| | | | | Lambaréné | WHO |
| P11 | LOD-L/W-11 | 1:100 | 42 pf/μl | 76 pf/μl | 96 pf/μl |
| | LOD-L/W-12 | 1:200 | 21 pf/μl | 25 pf/μl | 43 pf/μl |
| | LOD-L/W-13 | 1:400 | 10-11 pf/μl | 0 pf/μl | 20 pf/μl |
| P12 | LOD-L/W-14 | 1:200 | 35 pf/μl | 124 pf/μl | 154 pf/μl |
| | LOD-L/W-15 | 1:400 | 17-18 pf/μl | 60 pf/μl | 60 pf/μl |
| P13 | LOD-L/W-16 | 1:1000 | 50 pf/μl | 65 pf/μl | 55 pf/μl |
| | LOD-L/W-17 | 1:2000 | 25 pf/μl | 42 pf/μl | 26 pf/μl |
| P14 | LOD-L/W-18 | 1:100 | 37 pf/μl | 9 pf/μl | 66 pf/μl |
| | LOD-L/W-19 | 1:200 | 18-19 pf/μl | 19 pf/μl | 62 pf/μl |
| P15 | LOD-L/W-20 | 1:100 | 48 pf/μl | 51 pf/μl | 50 pf/μl |
| | LOD-L/W-21 | 1:50 | 98 pf/μl | 105 pf/μl | 107 pf/μl |

Anschließend wurden aus diesem Pool sechs niedrig positive Dicke Tropfen selektiert. Es wurde darauf geachtet, dass das ganze Färbeschema und eine möglichst breite Verteilung der Konzentrationen in dem Bereich von 10-100 pf/μl abgebildet waren. Folgende sechs niedrig positiven Dicken Tropfen wurden zur Lektüre zur Bestimmung des *LoD* ausgewählt:

Ergebnisse

Lambaréné Methode:

Tab.12: Auswahl niedrig positive Dicke Tropfen Lambaréné-Methode

| Serien No. | <i>LOD-L-21</i> | <i>LOD-L-16</i> | <i>LOD-L-20</i> | <i>LOD-L-17</i> | <i>LOD-L-18</i> | <i>LOD-L-12</i> |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Konzentration | 105 pf/μl | 65 pf/μl | 51 pf/μl | 42 pf/μl | 25 pf/μl | 9 pf/μl |

WHO Methode:

Tab.13: Auswahl niedrig positive Dicke Tropfen WHO-Methode

| Serien No. | <i>LOD-W-21</i> | <i>LOD-W-18</i> | <i>LOD-W-19</i> | <i>LOD-W-20</i> | <i>LOD-W-17</i> | <i>LOD-W-13</i> |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Konzentration | 107 pf/μl | 66 pf/μl | 62 pf/μl | 50 pf/μl | 42 pf/μl | 20 pf/μl |

Die Bestimmung der initialen Konzentrationen der Dicken Tropfen erfolgte mittels Mikroskopie, folglich unterliegen die verwendeten Werte ebenso der Standardabweichung und Ungenauigkeit der zu untersuchenden Methode. Da das *LoD* aber über die Standardabweichung bestimmt wurde, spielt die Kenntniss der exakten Konzentration keine dominante Rolle.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden zu den sechs niedrig positiven Dicken Tropfen zwei negative Dicke Tropfen hinzugefügt, die additiv in die Evaluation des *LoB* einfließen. Eine Sequenz zur Lektüre bestand somit aus acht Dicken Tropfen.

4.2.2. *LoD* Lambaréné Methode

Das *LoD* wurde durch wiederholte Lektüren der sechs niedrig positiven Slides durch die Mikroskopisten erhoben. Anhand der ermittelten gepoolten Standardabweichungen für die niedrig positiven Dicken Tropfen kann das *LoD* folgendermaßen errechnet werden:

$$LoD = LoB + c_{\beta}SD_S$$

Jeder niedrig positive Dicke Tropfen wurde jeweils 30 (n=30) Lektüren unterzogen. Die folgende Tabelle zeigt die gemessenen Parasitämien:

Ergebnisse

Tab.14: Parasitämie Lektüre Lambaréné Methode (n=30); [pf/μl]

| N | <i>LOD-L21</i> | <i>LOD-L16</i> | <i>LOD-L20</i> | <i>LOD-L17</i> | <i>LOD-L18</i> | <i>LOD-L-12</i> |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| 1 | 85 | 0 | 57 | 28 | 42 | 22 |
| 2 | 239 | 171 | 68 | 102 | 0 | 0 |
| 3 | 205 | 79 | 57 | 68 | 28 | 22 |
| 4 | 79 | 119 | 40 | 68 | 0 | 0 |
| 5 | 222 | 66 | 79 | 34 | 22 | 11 |
| 6 | 143 | 103 | 103 | 126 | 69 | 0 |
| 7 | 257 | 200 | 86 | 132 | 0 | 0 |
| 8 | 126 | 66 | 52 | 103 | 40 | 29 |
| 9 | 120 | 57 | 103 | 86 | 0 | 0 |
| 10 | 143 | 92 | 75 | 57 | 46 | 12 |
| 11 | 28 | 105 | 63 | 35 | 0 | 0 |
| 12 | 63 | 0 | 42 | 0 | 63 | 0 |
| 13 | 98 | 63 | 42 | 14 | 14 | 0 |
| 14 | 77 | 94 | 28 | 7 | 21 | 0 |
| 15 | 42 | 42 | 48 | 21 | 28 | 0 |
| 16 | 65 | 80 | 51 | 32 | 28 | 0 |
| 17 | 76 | 60 | 98 | 35 | 21 | 0 |
| 18 | 154 | 273 | 147 | 42 | 76 | 35 |
| 19 | 91 | 154 | 91 | 46 | 49 | 21 |
| 20 | 108 | 62 | 51 | 25 | 34 | 0 |
| 21 | 95 | 46 | 42 | 41 | 21 | 14 |
| 22 | 32 | 28 | 34 | 11 | 23 | 0 |
| 23 | 70 | 35 | 42 | 14 | 21 | 0 |
| 24 | 69 | 21 | 91 | 35 | 27 | 7 |
| 25 | 61 | 14 | 48 | 21 | 14 | 7 |
| 26 | 42 | 80 | 43 | 34 | 21 | 11 |
| 27 | 119 | 44 | 64 | 11 | 22 | 23 |
| 28 | 89 | 56 | 40 | 39 | 6 | 11 |
| 29 | 104 | 60 | 51 | 48 | 17 | 0 |
| 30 | 63 | 45 | 50 | 26 | 22 | 23 |

Aus diesen Werten wurden anschließend die Standardabweichung (SD), Mittelwert (MW) und Median für die einzelnen Konzentrationen bestimmt.

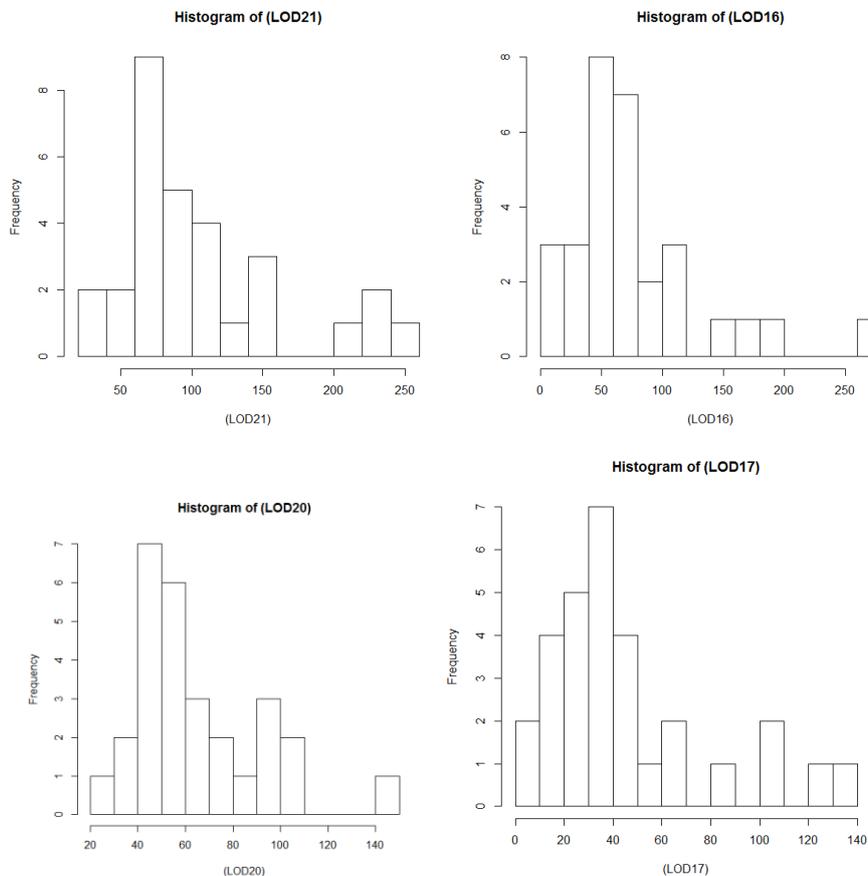
Ergebnisse

Tab.15: Mittelwert, Median, Standardabweichung [pf/μl]; Lambaréné

| Slide ID/Konz | LOD-L21/ 105 pf/μl | LOD-L16/ 65 pf/μl | LOD-L20/ 51 pf/μl | LOD-L17/ 42 pf/μl | LOD-L18/ 25 pf/μl | LOD-L-12/ 9 pf/μl |
|---------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| MW | 104,97 | 72,32 | 63,41 | 42,41 | 28,09 | 9,62 |
| Median | 93 | 60 | 56 | 34 | 22,5 | 4 |
| SD | 55,15 | 56,26 | 25,25 | 32,48 | 19,18 | 10,35 |

In der Tabelle kann man erkennen, dass die erhobenen Mittelwerte und Standardabweichungen mit den vor der Lektüre bestimmten Parasitämien in etwa übereinstimmen.

Die folgenden graphischen Analysen der Messergebnisse zeigen für alle niedrig positive Dicken Tropfen eine linkssteile, rechtsschiefe Verteilung, die die Normalverteilungsannahme unwahrscheinlich machen.



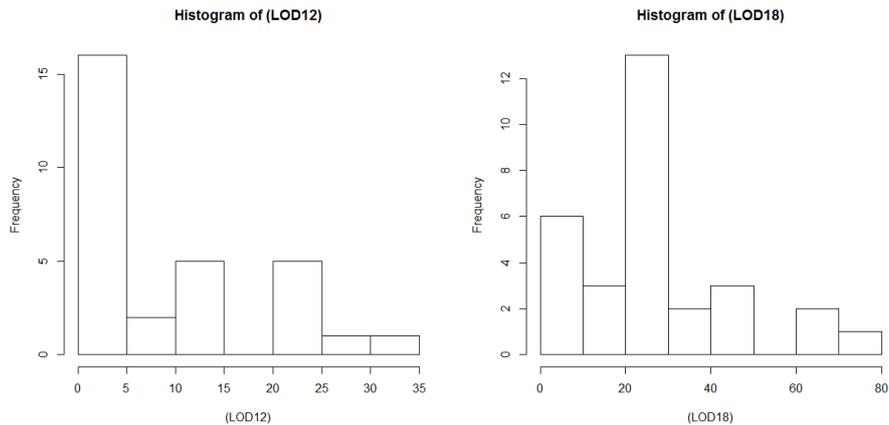


Abb.10: Histogramm Lambaréné Methode

Da wir poissonverteilte und nicht normalverteilte Datensätze vorliegen haben, greifen wir auf das Instrument der Transformation zurück (siehe 2.4.3), um eine Normalverteilung der Datensätze zu erreichen, da die Kalkulation der gepoolten Standardabweichung bei normalverteilten Datensätzen immens vereinfacht wird.

Im Folgendem wurde hierfür die Wurzeltransformation angewandt, die besonders geeignet für die Transformation von annähernd poissonverteilten Daten in eine Normalverteilung ist [117].

$$Y_i = \sqrt[2]{X_i}$$

Mit Y_i als transformierte Messungen und X_i als ursprüngliche Messungen ergaben sich folgende graphische Analysen im Histogramm.

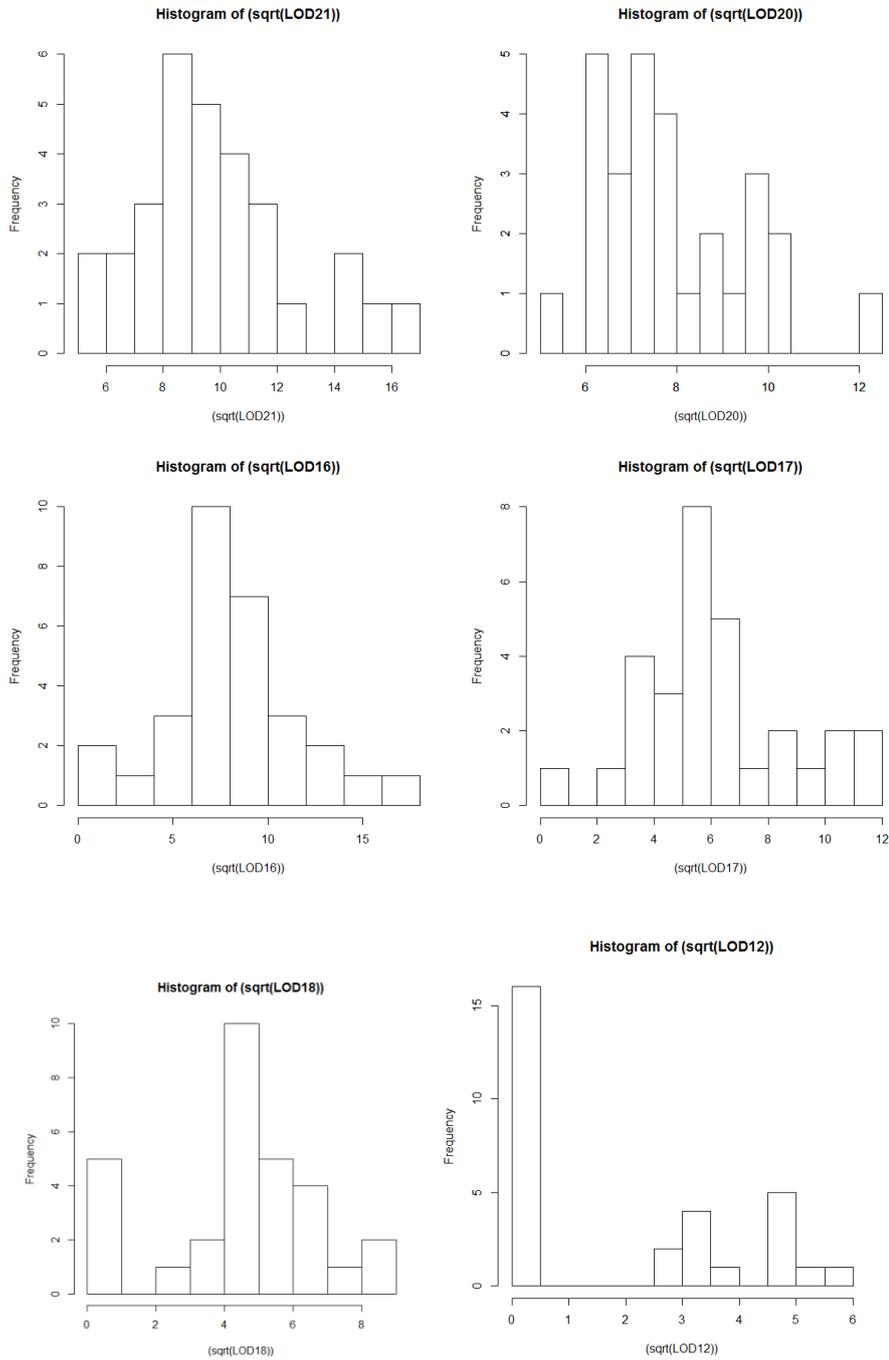


Abb.11: Histogramm transformiert Lambaréné Methode

Die graphische Darstellung der transformierten Datensätze zeigt, dass man nun in vier von sechs Datensätzen eine Normalverteilung annehmen kann.

Ergebnisse

Im Anschluss wurden die Standardabweichung, Mittelwert (MW) und der Median für die transformierten Datensätze bestimmt.

Tab.16: Standardabweichung, Mittelwert, Median nach Wurzeltransformation; Lambaréné

| | <i>LOD-L-21</i> | <i>LOD-L16</i> | <i>LOD-L-20</i> | <i>LOD-L-17</i> | <i>LOD-18</i> | <i>LOD-L- 12</i> |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|------------------|
| MW | 9,68 | 7,93 | 7,58 | 6,07 | 4,41 | 1,92 |
| Median | 9,49 | 7,90 | 7,18 | 5,92 | 4,64 | 0,96 |
| SD | 2,75 | 3,52 | 1,57 | 2,59 | 2,45 | 2,19 |

Anschließend wurde die gepoolte Standardabweichung aus den sechs Datensätzen bestimmt und anschließend das transformierte *LoD* (LoD_{trans}) berechnet.

Für die gepoolte Standardabweichung gilt:

$$SD_S^2 = \frac{(n-1) \sum_i^n SD_{si}^2}{f}$$

$$SD_S^2 = (30 - 1) * (2,75^2 + 3,52^2 + 1,57^2 + 2,59^2 + 2,45^2 + 2,19^2) / (180 - 6)$$

$$SD_S^2 = 6,66$$

$$\sqrt{SD_S^2} = 2,58$$

Für c_β gilt bei einem Grad von Freiheit von $f = N_S - K = 180 - 6 = 174$

$$c_\beta = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{(4*f)}} = \frac{1.645}{\left(1 - \frac{1}{4*174}\right)} = 1.647$$

Somit ergab sich folgende Kalkulation für das *LoD*:

$$LoD = LoB + c_\beta SD_S$$

Anschließend muss die Transformation in die ursprüngliche Einheit erfolgen. Die angewandte Formel lautet wie folgt [118]:

$$SD_u = 2 \cdot \sqrt{X} * SD_S$$

X ist der Mittelwert der Daten in der ursprünglichen Einheit (parasites/ μ l), SD entspricht der Standardabweichung der transformierten Einheit.

Ergebnisse

$$LoD = c_{\beta}SD_u$$

$$LOD = 1.647 * 2 * \sqrt{54} * 2.58 = 62 \text{ parasites}/\mu L$$

Das *LoD* für die Mikroskopie von *P. falciparum* Parasiten im Dicken Tropfen nach Lambaréné Methode liegt somit bei 62 pf/ μ l.

4.2.3. *LoD* WHO Methode

Das Prinzip der Erhebung des *LoD* für die WHO Methode entspricht dem für die Erhebung des *LoDs* für die Lambaréné Methode. Sechs niedrig positive Dicke Tropfen wurden in fünf Sequenzen von sechs Mikroskopisten wiederholt gelesen und pro Dicker Tropfen jeweils n=30 Lektüren durchgeführt.

Tab.17: Lektüre *LoD* WHO-Methode

| N | <i>LOD</i> -W-21 | <i>LOD</i> -W-18 | <i>LOD</i> -W-19 | <i>LOD</i> -W-20 | <i>LOD</i> -W-17-4 | <i>LOD</i> -W-17-1 |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 142 | 77 | 127 | 62 | 0 | 0 |
| 2 | 124 | 0 | 84 | 69 | 130 | 0 |
| 3 | 144 | 48 | 144 | 203 | 0 | 0 |
| 4 | 143 | 48 | 236 | 111 | 0 | 186 |
| 5 | 90 | 138 | 154 | 69 | 97 | 0 |
| 6 | 112 | 32 | 176 | 112 | 0 | 0 |
| 7 | 172 | 0 | 112 | 79 | 60 | 0 |
| 8 | 157 | 80 | 176 | 95 | 0 | 0 |
| 9 | 110 | 80 | 192 | 96 | 0 | 144 |
| 10 | 95 | 143 | 175 | 78 | 95 | 0 |
| 11 | 140 | 79 | 32 | 15 | 32 | 16 |
| 12 | 93 | 32 | 16 | 48 | 0 | 0 |
| 13 | 188 | 32 | 16 | 47 | 48 | 79 |
| 14 | 95 | 64 | 63 | 0 | 80 | 63 |

Ergebnisse

| | | | | | | |
|----|-----|----|-----|----|----|----|
| 15 | 110 | 48 | 142 | 32 | 0 | 16 |
| 16 | 148 | 0 | 84 | 92 | 0 | 30 |
| 17 | 93 | 0 | 63 | 79 | 47 | 0 |
| 18 | 70 | 0 | 136 | 0 | 32 | 27 |
| 19 | 137 | 30 | 45 | 30 | 0 | 0 |
| 20 | 94 | 78 | 111 | 46 | 63 | 0 |
| 21 | 111 | 45 | 65 | 87 | 40 | 9 |
| 22 | 84 | 67 | 109 | 24 | 23 | 0 |
| 23 | 123 | 89 | 73 | 63 | 29 | 31 |
| 24 | 78 | 54 | 59 | 51 | 62 | 13 |
| 25 | 138 | 76 | 76 | 72 | 40 | 56 |
| 26 | 94 | 0 | 64 | 16 | 16 | 31 |
| 27 | 26 | 0 | 63 | 78 | 16 | 32 |
| 28 | 142 | 0 | 140 | 48 | 64 | 16 |
| 29 | 80 | 0 | 47 | 45 | 0 | 16 |
| 30 | 155 | 0 | 77 | 93 | 80 | 31 |

Anschließend wurden Standardabweichung, Mittelwert und Median kalkuliert.

Tab.18: Mittelwert (MW), Median, Standardabweichung (ST) [pf/μl]; WHO

| | <i>LOD-W-21</i> | <i>LOD-W-18</i> | <i>LOD-W-19</i> | <i>LOD-W-20</i> | <i>LOD-W-17-4</i> | <i>LOD-W-17-1</i> |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| | 107 pf/μl | 66 pf/μl | 62 pf/μl | 50 pf/μl | 42 pf/μl | 26 pf/μl |
| MW | 116,27 | 45 | 101,90 | 64,73 | 35,50 | 26,97 |
| Median | 111,5 | 46,5 | 84 | 66 | 30,5 | 14,5 |
| SD | 34,59 | 40,65 | 55,66 | 40,26 | 35,95 | 43,03 |

Ergebnisse

Mittels Histogramm wurde die Verteilung der Daten dargestellt.

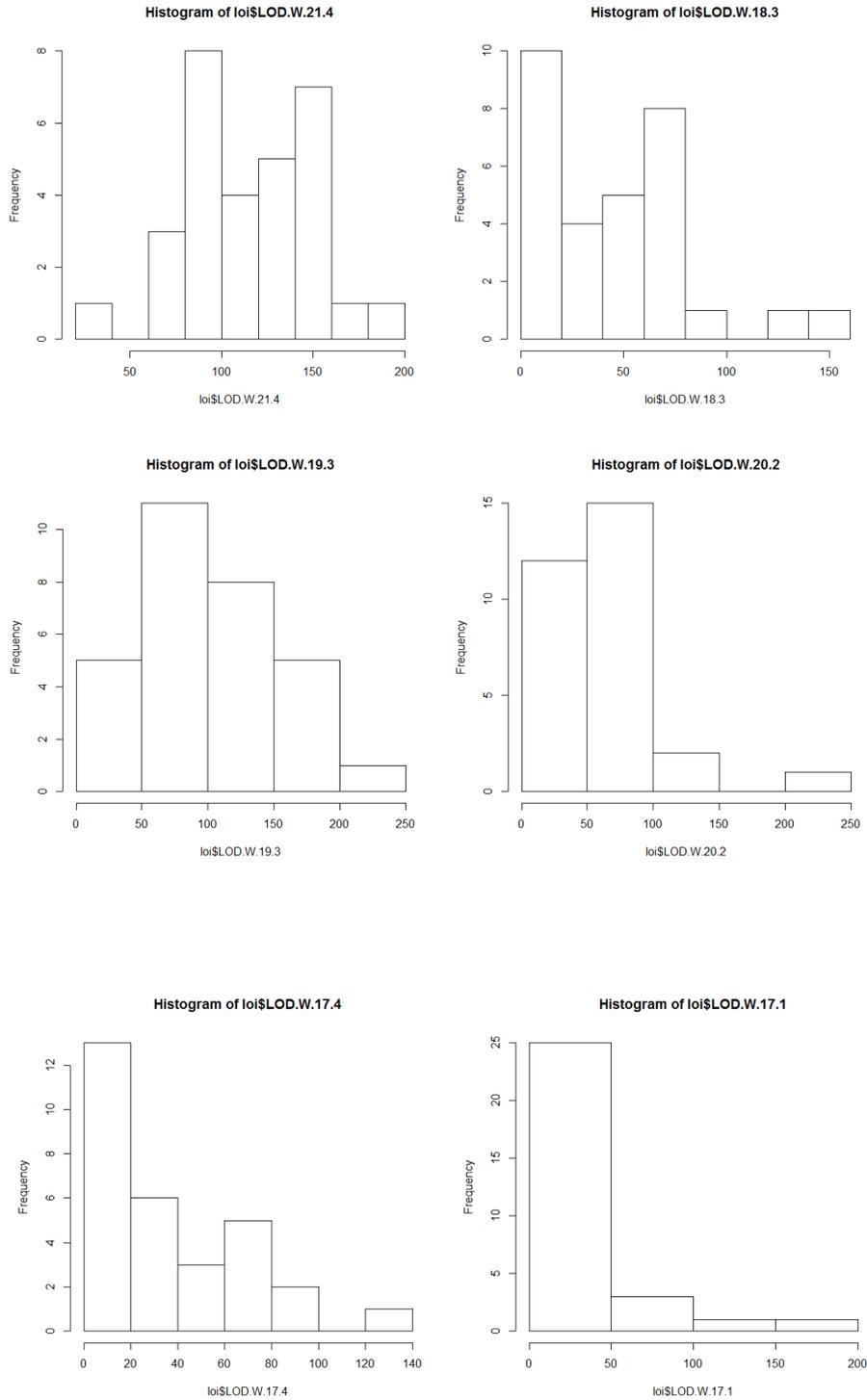


Abb.12: Histogramm WHO Methode

Ergebnisse

Auch hier zeigt sich keine Normalverteilung der Daten sondern eine annähernde Poissonverteilung der Ergebnisse, so dass zur Generierung von normalverteilten Daten erneut die Wurzeltransformation angewandt wurde.

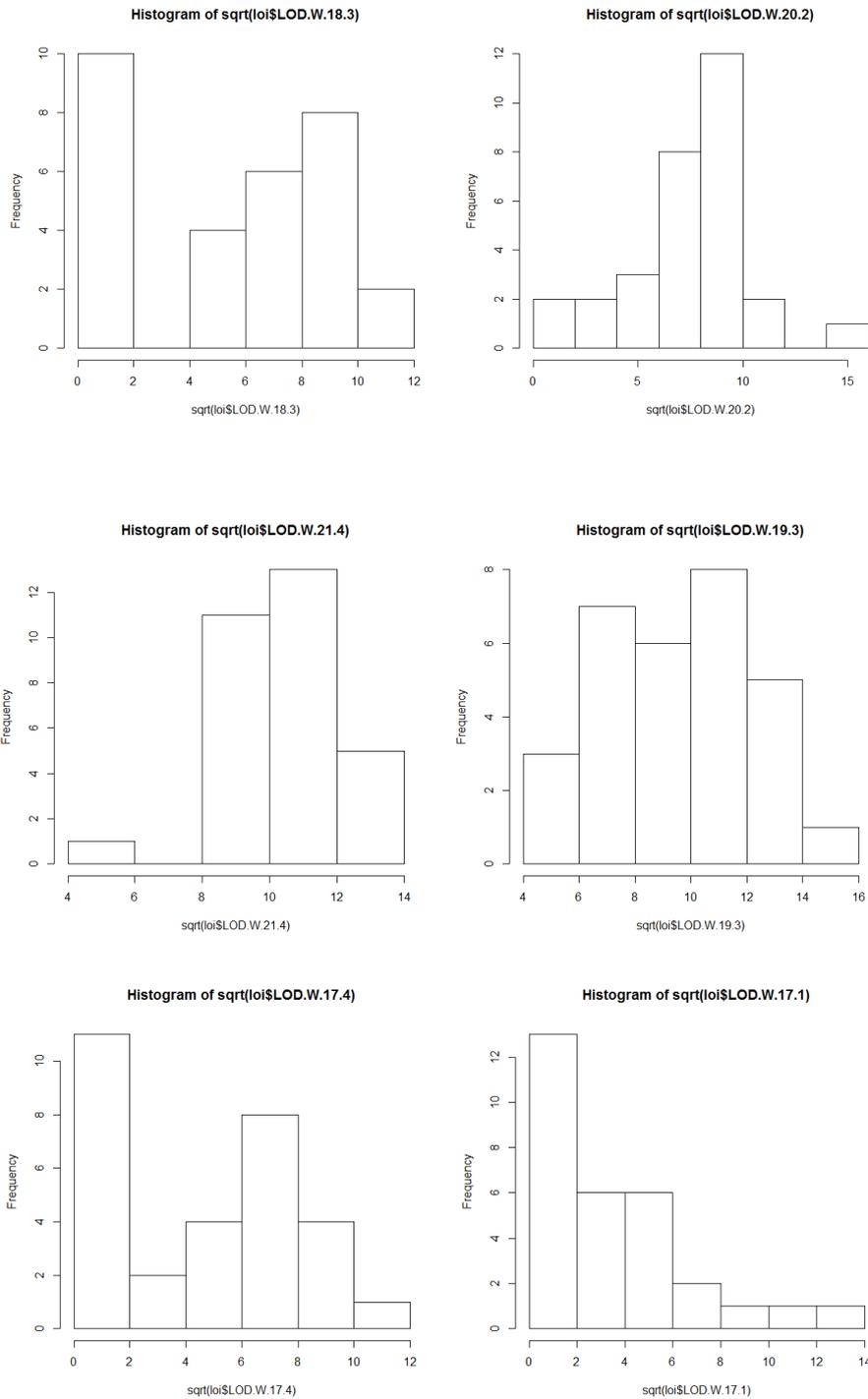


Abb.13: Histogramm WHO Wurzeltransformation

Ergebnisse

Graphisch kann in drei Datensätzen von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Anschließend wurde aus den transformierten Datensätzen die Standardabweichung berechnet und die gepoolte Standardabweichung bestimmt.

Tab.19: Wurzeltransformation Standardabweichung, Mittelwert (MW), Median; WHO

| | <i>LOD-W-21</i> | <i>LOD-W-18</i> | <i>LOD-W-19</i> | <i>LOD-W-20</i> | <i>LOD-W-17-4</i> | <i>LOD-W-17-1</i> |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| MW | 10,65 | 5,66 | 9,69 | 7,57 | 4,91 | 3,95 |
| Median | 10,56 | 6,82 | 9,17 | 8,12 | 5,52 | 3,80 |
| SD | 1,73 | 3,67 | 2,87 | 2,77 | 3,43 | 3,43 |

Für die gepoolte Standardabweichung gilt:

$$SD_S^2 = \frac{(n-1) \sum_i SD_{Si}^2}{f}$$

$$SD_S^2 = (30-1) * (1,73^2 + 2,87^2 + 2,77^2 + 3,67^2 + 3,43^2 + 3,43^2) / (180-6)$$

$$SD_S^2 = 9.32$$

$$\sqrt{SD_S^2} = 3.05$$

Für c_β gilt bei einem Grad von Freiheit von $f = N_S - K = 180 - 6 = 176$

$$c_\beta = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{(4*f)}} = \frac{1.645}{\left(1 - \frac{1}{4*176}\right)} = 1.647$$

Daraus resultiert für das *LoD*:

$$LoD = LoB + c_\beta SD_S$$

Die reverse transformierte Standardabweichung entspricht $SD_u = c_\beta * 2 * \sqrt{\bar{X}} * SD_S$

Daraus errechnet sich das *LoD* wie folgt:

$$LoD = c_\beta * SD_S = 1.657 * 2 * \sqrt{76,7} * 3.05$$

$$LoD = 88$$

Das *LoD* für die WHO Methode liegt somit bei 88 pf/µl.

4.3. Verifizierung mittels nested PCR

Zur Verifizierung, dass es sich bei den verwendeten Blutproben um eine Infektion mit *P. falciparum* handelt, sowie im Umkehrschluss die negativen Blutproben tatsächlich frei von Parasiten sind, wurde eine nested PCR durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle negativen Proben der Probanden *LOD-P1* - *LOD-P5* frei von *P. falciparum* DNA und alle Proben der Probanden *LOD-P11* - *LOD-P15*, die für die Herstellung der niedrig positiven Dicken Tropfen verwendet wurden, positiv für *P. falciparum* waren.

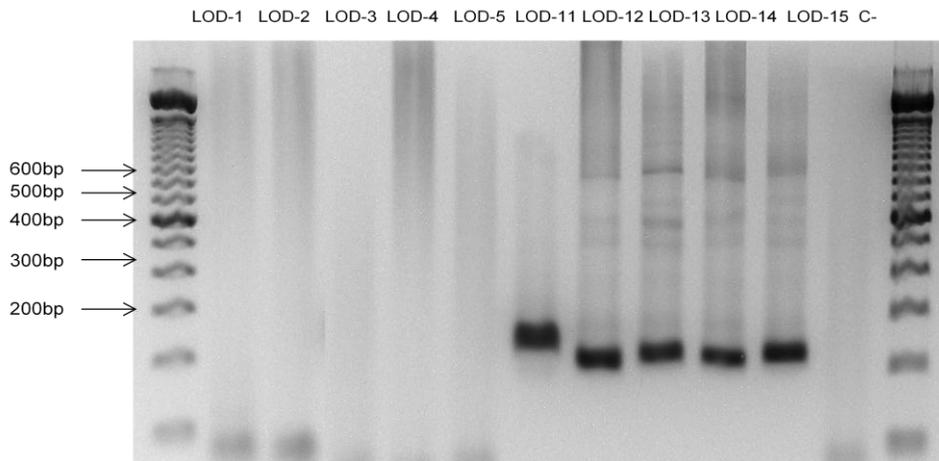


Abb.14: nested PCR negative LOD-1-5 und positive LOD-11-15, C =Negativ Kontrolle

5. Diskussion

5.1. Stellenwert der Mikroskopie des Dicken Tropfen

Die Lichtmikroskopie des Dicken Tropfens ist das meistverwendete Instrument in der Diagnostik der Malaria. Obwohl alternative Methoden vorhanden sind, hat sich der Dicke Tropfen weiterhin als Goldstandard behauptet. Er zeichnet sich trotz einiger Einschränkungen durch relevante Vorteile gegenüber seinen Alternativen aus. Neben dem geringen technischen Aufwand, der leichten Erlernbarkeit, die somit auch eine Durchführung in schlecht ausgebauten, ländlichen Gebieten in z.B. Zentralafrika möglich machen, sind die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse sowie die niedrigen Kosten die Hauptargumente für den Erfolg dieser Labormethode.

Da eine zuverlässige Diagnostik unabdingbar für die Bekämpfung der Malaria ist, ist es bemerkenswert, dass es ausgesprochen wenig Daten zu Nachweisgrenzen in Form von Detektionsgrenzen und Schwellenwerte dieser Standardmethode gibt. Hingegen gibt es einige Arbeiten bezüglich der Sensitivität und Spezifität der Mikroskopie des Dicken Tropfens und Vergleiche mit anderen labortechnischen Methoden [96, 102, 119, 120].

5.2. Einordnung der Studienresultate

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem gewählten methodischen und statistischen Ansatz eine Bestimmung der Nachweisgrenzen in Form des *LoB* und *LoD* für die Mikroskopie des Dicken Tropfen möglich ist.

Das *LoB* liegt für beide untersuchten Methoden der Mikroskopie bei 0 Parasiten pro Mikroliter. Das bedeutet, dass ein erfahrener Mikroskopist in einem Malariaendemiegebiet unter guten Laborbedingungen einen negativen Dicken Tropfen mit großer Sicherheit korrekt und zuverlässig ($\geq 95\%$) nicht positiv deklariert.

Für die Nachweisgrenze in Form des *LoD* für *P. falciparum* Parasiten im Dicken Tropfens in diesem Setting wurde ein Wert von 88pf/ μ l für die für WHO- und 62pf/ μ l für die Lambaréné Methode bei 500 auszuzählenden Leukozyten bzw. 100 HPFs bestimmt.

Wie zu erwarten war, zeigen sich keine Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden der Mikroskopie.

Weiterhin unterstreichen die Ergebnisse das große Potential der Mikroskopie des Dicken Tropfens unter den genannten Voraussetzungen, die jedoch vorbehaltlich eine hohe Qualität von der Probengewinnung, über die Verarbeitung und Färbung bis hin zur Lektüre der Dicken Tropfen erfordern.

5.3. Vergleich mit aktueller Datenlage

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Spezifität des Dicken Tropfens stark variiert, aber unter optimalen Voraussetzungen bei über 99% liegt [96, 121].

Das in dieser Arbeit evaluierte *LoB* von 0pf/µl ist in der hohen Spezifität begründet.

Für das *LoD* gibt es kaum vergleichbare Referenzwerte und bisher keine Arbeiten, die sich explizit mit der Erhebung dieser Nachweisgrenzen befassen. Man findet jedoch in der aktuellen Literatur einige Schätzungen und Schwellenwerte.

Laut WHO liegt die Nachweisgrenze bei 5-10 *P. falciparum* Parasiten pro Mikroliter (pf/µl) unter optimalen Laborbedingungen und etwa 100 pf/µl unter Feldbedingungen für einen erfahrenen Mikroskopisten [87].

Eine Arbeit von *Moody et al.* aus dem Jahre 2002 beruft sich auf die Zahl von 20-50pf/µl als *LoD* für die Mikroskopie durch einen erfahrenen Techniker [122]. Die in der Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Malaria“ der deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin (DTG) beschriebene Nachweisgrenze liegt ebenfalls bei 50pf/µl. Über die Methode der Evaluation dieserer Nachweisgrenzen findet man jedoch keine näheren Informationen.

Die aufgeführten Quellen gehen von einer möglichs optimalen Malariadiagnostik aus, so dass zu einem gewissen Grad eine Vergleichbarkeit mit den erhobenen Daten möglich scheint. Mit einem *LoD* von etwa 88 pf/µl verhalten sich die evaluierten Nachweisgrenzen kongruent zu den in der Literatur genannten Zahlen.

5.4. Einschränkungen der Arbeit

Die vorgefunden Ergebnisse sind für das Labor in Lamabréne bzw. für das Kollektiv der Mikroskopisten des Forschungslabors gültig und in Folge ist eine Verallgemeinerung und Übertragung der Ergebnisse schwer bis nicht möglich. Die Arbeit wurde unter

annähernd optimalen Bedingungen durchgeführt und die Qualität der Malariadiagnostik muss als überdurchschnittlich angesehen werden. Diese anspruchsvollen Voraussetzungen können in vielen schlechter ausgestatteten Laboren und Gesundheitsposten nicht eingehalten werden.

Jedoch ist zu erwähnen, dass die Verallgemeinerung der Daten nicht das Ziel dieser Arbeit war (siehe 1.4) und die Bestimmung allgemeingültiger Nachweisgrenzen aufgrund oben genannter Argumente schwer möglich ist und bis dato „nur“ auf Schätzungen beruhen. Vielmehr soll dieses Verfahren den unterschiedlichen Laboren ein einfaches Instrument an die Hand gegeben werden, die eine Einschätzung ihrer eigenen diagnostischen Kompetenz ermöglicht.

Die hier bestimmten Nachweisgrenzen unterliegen vielen Einflüssen, die das *LoB* und das *LoD* direkt beeinflussen und die für jedes Labor unterschiedlich berücksichtigt werden müssen. Beispiele hierfür sind die Anzahl der Mikroskopisten, sowie die Anzahl der zu analysierenden Proben und Lektüren. Des Weiteren ist das *LoD* direkt abhängig von der Zahl der ausgezählten HPFs. Die Empfehlungen der Anzahl der auszuzählenden HPFs reichen weit aus einander und werden zwischen 100 und 500 HPFs je nach Anforderungen und lokalen Gegebenheiten angegeben [123]. Bis heute wurde noch kein Standardwert festgelegt.

Diese wichtigen variablen Eckpfeiler, wie die Anzahl der zu zählenden HPFs, der Mikroskopisten und Lektüren wurden bei der Konzeption dieser Studie nach Rücksprache mit meinem Betreuer Prof. Dr. Benjamin Mordmüller festgelegt.

Methodisch hätte im Nachhinein die Anzahl der Lektüren für die niedrig positiven Proben erhöht werden können um eindeutigere, bestenfalls normalverteilte Datensätze zu erhalten. Da die Daten die Normalverteilungsannahme nicht erfüllten, war es notwendig mit transformierten Datensätzen zu arbeiten um eine etablierte und gut validierte parametrische Methodologie anwenden zu können. Anschließend musste eine inverse Transformation des bestimmten *LoD* und *LoB* in die Ursprungseinheit erfolgen. Ein Vergleich von Verteilungsfreien mit parametrischen Verfahren wäre durchaus interessant gewesen und ein Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten dieser Art.

Des Weiteren wäre mit einer höheren Anzahl von Lektüren auch die Bestimmung des jeweiligen *LoB* und *LoD* für den einzelnen Mikroskopisten möglich gewesen. Dagegen spricht die damit verbundene hohe Arbeitslast, die der Diagnose „echter“ Fälle verloren geht. Eine Möglichkeit, die Bestimmung der diagnostischen Fähigkeiten kontinuierlich zu überprüfen, wäre eine vollkommene Integration in den Laboralltag, inklusive der Verwendung externer Qualitätskontrollen und anderer Methoden wie z.B. der PCR. Um dies mit vertretbarem Aufwand zu erreichen wäre jedoch ein komplexes Laborinformationsmanagementsystem (LIMS) unabdingbar gewesen, welches zeitlich während meines Aufenthaltes nicht zu realisieren war. Wenn jedoch Daten aus mehreren Laboren vorliegen, wäre durch die Etablierung eines einheitlichen LIMS ein Vergleich der verschiedenen Labore möglich und sicherlich ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Studien.

Letzendlich konnte festgestellt werden, dass die in der Guideline EP17 vorgeschlagene Methodologie in der Praxis gut zu funktionieren zu scheint. Je nach Anwendung und Bedarf sollte sie doch kritisch hinterfragt und abgewandelt werden um der jeweiligen Situation gerecht zu werden. So ist zum Beispiel die exakte Quantifizierung der Parasitämie für den klinischen Alltag nicht bedeutsam, während sie für Studien essentiell sein kann, zum Beispiel, wenn eine Malariaepisode erst als solche gezählt wird, wenn eine bestimmte Parasitämie erreicht wurde. Der nächste Schritt wäre diese erarbeitete Methodologie in anderen Laboren mit unterschiedlichen Voraussetzungen und Gegebenheiten zu überprüfen und gegebenenfalls im Rahmen von LIMS gestützten Assessments im Verlauf zu verbessern.

5.5. Schlussfolgerung

Globale Malariadiagnostik auf höchstem Niveau durchzuführen ist eine große Herausforderung, die sich durch die unterschiedlichen Voraussetzungen und Bedingungen der Diagnostik je nach Labor, Region, Ausbildung und ökonomischer Situation zu stark unterscheiden. Ob man in einem ländlichen, weit abgelegenen oder gut ausgebautem Gesundheitssystem arbeitet, sich in einem endemischen oder nicht-endemischen Gebiet befindet, spielt ebenso eine große Rolle wie die Erfahrung und Ausbildung der Mikroskopisten sowie die Qualität der Reagenzien und Instrumente.

Dementsprechend unterscheidet sich die Güte der Mikroskopie des Dicken Tropfen und einhergehend Parameter wie Sensitivität, Spezifität und Nachweisgrenzen.

In der modernen Labormedizin ist es seit Langem im Rahmen von Standardisierung und Qualitätssicherung üblich Nachweisgrenzen verschiedener diagnostischen Methoden zu evaluieren. In der Konsequenz kann mit dem jeweiligen diagnostischen Instrument effektiver umgegangen und die Messungen besser interpretiert werden. Das Wissen um das Potential, aber vor allem um die Grenzen und Schwächen ist ein wesentlicher Bestandteil davon.

Mit dem hier gezeigten methodischen und statistischen Ansatz ist eine einfache Evaluierung des *LoB* und des *LoD* für die Mikroskopie des Dicken Tropfens gelungen. Im Rahmen von Assessments und Qualitätskontrolle könnte mit dieser einfachen Methode das für das jeweilige Setting gültige *LoD* und *LoB* bestimmt werden und die diagnostischen Fähigkeiten überprüft werden. Im Vergleich zu anderen Masszahlen wie z.B. der Spezifität und Sensitivität sind das *LoB* und *LoD* mit der Einheit pf/ μ l in der klinischen Praxis fassbarer und ermöglichen es dem Kliniker vor Ort das Ergebnis eines Dicken Tropfens sofort korrekt interpretieren zu können. Das Wissen um die Qualität und Einschränkungen „seines“ Labores kann dem Kliniker vor allem bei asymptomatischen Verläufen sowie bei Kontrolluntersuchungen, bei Fragen der Parasiteneliminierung, im Rahmen von epidemiologischen Surveillancestudien aber auch im Bereich der Forschung nützlich sein. Das *LoB* und das *LoD* geben somit als Nachweisgrenzen zusätzliche Informationen über das Potential und die Einschränkungen der Mikroskopie des Dicken Tropfens. Zukünftig können somit gezielter Entscheidungen anhand der Ergebnisse des Dicken Tropfens gefällt werden und somit zu einer Verbesserung der Kontrolle der Malaria führen.

6. Zusammenfassung

Die durch die Infektion mit *Plasmodium falciparum* bedingte Malaria ist die wichtigste parasitäre Infektionskrankheit, die vor allem in den Tropen eine hohe Morbidität und Mortalität fordert. In vielen Krankenhäusern und Gesundheitsposten in den Tropen mit mangelnder Infrastruktur erfolgt die Entscheidung zur Therapie mit Chemotherapeutika unabhängig vom Ergebnis der Diagnostik (*presumptive treatment*), was in Folge mit einem schlechten Management febriler Erkrankungen, unnötigen Nebenwirkungen der Malariatherapie sowie Verschwendung von Ressourcen einhergeht. Da die Entscheidung des Therapiebeginns idealerweise auf Grundlage der Diagnostik getroffen werden sollte, sind die Anforderungen an einen effektiven, zeitnahen Parasitennachweis sehr hoch. Mit der Mikroskopie des Dicken Tropfens steht ein Instrument, welches diese Anforderungen prinzipiell erfüllt zur Verfügung. Jedoch wurde dieses bisher kaum auf seine diagnostische Präzision, Güte und Nachweisgrenzen hin untersucht. In dieser Arbeit wurde eine einfache Methode zur Bestimmung von Nachweisgrenzen in Form des *Limit of Blank (LoB)* und des *Limit of Detection (LoD)* von *Plasmodium falciparum* in der Mikroskopie des Dicken Tropfens nach WHO und Lambaréné Methode untersucht. Dabei waren die Nachweisgrenzen wie folgt definiert: *Limit of Blank* – Höchster Wert, der bei der Messung einer negativen Probe beobachtet wird. *Limit of Detection* – Die niedrigste Konzentration des zu analysierenden Agens in einer Probe, welche sicher nachweisbar ist. Diese Masszahlen erlauben eine Beurteilung der diagnostischen Qualität der Mikroskopie des Dicken Tropfens, sowie einen Vergleich zwischen beiden Methoden. Des Weiteren kann mithilfe des *LoB* und des *LoD* die korrekte Unterscheidung von positiven und negativen Proben erfolgen.

Als statistische und methodische Grundlage wurde die Guideline *EP 17 Protocols for Detection of Limit of Detection and Limit of Quantitation* zur Evaluierung von Nachweisgrenzen für die Methoden der Mikroskopie des Dicken Tropfens nach Lambaréné und WHO Methode adaptiert. Studienort war das klinische Forschungslabor der *Unité de Recherches Médicales (URM)* in Lambaréné, Gabun. Serien von negativen und niedrig positiven Dicken Tropfen wurden nach der Lambaréné und WHO Methode hergestellt, randomisiert, verblindet und anschließend von sechs Mikroskopisten

mehrfach gelesen. Aus der Standardabweichung und dem Median der Ergebnisse der Lektüre wurde das jeweilige *LoB* und im Anschluss das *LoD* für beide Methoden bestimmt. Das *LoB* liegt für die Lambaréné und WHO Methode bei jeweils 0 Parasiten/ μ l. Das *LoD* liegt für die Lambaréné Methode bei 62 Parasiten/ μ l und für die WHO Methode bei 88 Parasiten/ μ l.

Es konnte gezeigt werden, dass mit der hier angewendeten Methode eine einfache Bestimmung der Nachweisgrenzen in Form des *LoB* und *LoD* für die Mikroskopie des Dicken Tropfens möglich ist. Die Ergebnisse sind spezifisch für das Forschungslabor in Lambaréné und dürfen somit nicht verallgemeinert und generalisiert werden. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen beiden Methoden der Mikroskopie. Das *LoB* von 0 Parasiten/ μ l entspricht der bekannten hohen Spezifität des Dicken Tropfens. Das *LoD* von 62 respektive 88 Parasiten/ μ l für Lambaréné und WHO Methode sind mit den aktuellen Schätzungen der WHO, der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft und anderen Quellen aus der Literatur vergleichbar. Mit dieser Methode kann die Güte der Malariadiagnostik in unterschiedlichen Laboren und Krankenhäusern mit relativ wenig Aufwand bestimmt werden. Dem Kliniker vor Ort geben diese Nachweisgrenzen im Vergleich zu anderen Masszahlen eine bessere rationale Grundlage das Ergebnis eines jeden Dicken Tropfens sofort korrekt einzuordnen und entsprechende therapeutische Konsequenzen daraus abzuleiten. In Zukunft könnte die hier erstmals erarbeitete Methode zur Bestimmung des *LoB* und *LoD* in anderen Laboren mit anderen Voraussetzungen durchgeführt und verbessert werden. Im Rahmen von größeren und multizentrischen Studien könnte diese Methode weiter evaluiert werden und durch die breitere Anwendung zur Stärkung der Diagnostik und damit zur Kontrolle der Malaria beitragen.

V Literaturverzeichnis

1. Andriopoulos P, Economopoulou A, Spanakos G, Assimakopoulos G: A local outbreak of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Laconia, Greece--a re-emerging infection in the southern borders of Europe? *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2013, 17:e125–128.
2. Danis K, Baka A, Lenglet A, Van Bortel W, Terzaki I, Tseroni M, Detsis M, Papanikolaou E, Balaska A, Gewehr S, Dougas G, Sideroglou T, Economopoulou A, Vakalis N, Tsiodras S, Bonovas S, Kremastinou J: Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2011, 16.
3. Jouanna J: *Greek Medicine from Hippocrates to Galen: Selected Papers*. Leiden ; Boston: Brill; 2012. [Studies in Ancient Medicine, v. 40]
4. Pappas G, Kiriakos IJ, Falagas ME: Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2008, 12:347–350.
5. Hippocrates: *The Genuine Works of Hippocrates*. Sydenham Society; 1949.
6. Ebers G, Stern L: *Papyrus Ebers : das Hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift*. Leipzig: Engelmann; 1875.
7. Nerlich AG, Schraut B, Dittrich S, Jelinek T, Zink AR: *Plasmodium falciparum* in ancient Egypt. *Emerg Infect Dis* 2008, 14:1317–1319.
8. Ziskind B: [Malaria: a plague of ancient Egypt]. *Rev Prat* 2009, 59:586–589.
9. Timmann C, Meyer CG: King Tutankhamun's family and demise. *JAMA J Am Med Assoc* 2010, 303:2473; author reply 2473–2475.
10. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, Ahmed A, Elleithy H, Ball M, Gaballah F, Wasef S, Fateen M, Amer H, Gostner P, Selim A, Zink A, Pusch CM: Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA J Am Med Assoc* 2010, 303:638–647.
11. Charlwood D: Did Herodotus describe the first airborne use of mosquito repellents? *Trends Parasitol* 2003, 19:555–556.
12. Feix J, Herodot: *Historien*. 7th edition. Volume 2. Düsseldorf: Artemis & Winkler; 2006.
13. Hassl AR: [The significance of malaria in the Western Roman Empire: A text passage in the Digesta]. *Wien Klin Wochenschr* 2008, 120(19-20 Suppl 4):11–14.
14. Abbott A: Earliest malaria DNA found in Roman baby graveyard. *Nature* 2001, 412:847.

15. Cirillo VJ: War Epidemics: An Historical Geography of Infectious Diseases in Military Conflict and Civil Strife, 1850-2000 (review). *J Hist Med Allied Sci* 2006, 61:90–92.
16. Oppl F: *Gestalten Des Mittelalters Und Der Renaissance*. Darmstadt: Wiss. Buchgesellschaft; 1995.
17. Sallares R, Bouwman A, Anderung C: The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med Hist* 2004, 48:311–328.
18. Kyle RA, Shampe MA: Discoverers of quinine. *JAMA J Am Med Assoc* 1974, 229:462.
19. Laveran A: *Nature Parasitaire Des Accidents de L'impaludisme : Description D'un Nouveau Parasite Trouvé Dans Le Sang Des Malades Atteints de Fièvre Palustre*. Paris: J.-B. Baillière; 1881.
20. Ross R: *Malarial Fever; Its Cause, Prevention and Treatment; Containing Full Details for the Use of Travellers, Sportsmen, Soldiers, and Residents in Malarious Places*. 9th edition. Liverpool: For the University Press of Liverpool, by Longmans, Green and Co.; 1902.
21. Marchifava E, Celli A: *On the Alterations in the Red Globules in Malaria Infection, and on the Origin of Melanæmia*. London: New Sydenham Society; 1888.
22. Wessen AF: Human ecology and malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1972, 21:658–662.
23. Gachelin G, Opinel A: Malaria epidemics in Europe after the First World War: the early stages of an international approach to the control of the disease. *História Ciênc Saúde--Manguinhos* 2011, 18:431–469.
24. Hormann H: *Malaria in Deutschland 1945 Bis 1947*. G. Thieme; 1949.
25. Weyer F: *Die Malaria-Überträger, Eine Zusammenstellung Der Wichtigen Anopheles-Arten Mit Angaben Über Verbreitung, Brutgewohnheiten, Lebensweise Und Praktische Bedeutung*. Leipzig: G. Thieme; 1939.
26. Tomiche FJ: *Malaria Eradication: Illusion and Rectify*. Geneva: World Health Organization; 1975.
27. Jackson J: Cognition and the global Malaria Eradication Programme. *Parassitologia* 1998, 40:193–216.
28. Sachs J, Malaney P: The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002, 415:680–685.
29. Fosu AK, Mwabu G: *Malaria and Poverty in Africa*. Nairobi, Kenya: University of Nairobi Press; 2007.

30. Bruun AF: The Systema Naturae of the 20th century. *Science* 1950, 112:342–343.
31. Levine ND: Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J Protozool* 1988, 35:518–520.
32. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ: A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol* 2008, 47:261–273.
33. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004, 363:1017–1024.
34. Kantele A, Jokiranta S: [*Plasmodium knowlesi*--the fifth species causing human malaria]. *Duodecim Lääketieteellinen Aikakauskirja* 2010, 126:427–434.
35. Meis JF, Verhave JP, Jap PH, Sinden RE, Meuwissen JH: Malaria parasites--discovery of the early liver form. *Nature* 1983, 302:424–426.
36. Pradel G, Frevert U: Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 2001, 33:1154–1165.
37. Sinnis P: The malaria sporozoite's journey into the liver. *Infect Agents Dis* 1996, 5:182–189.
38. Rathore D, Sacci JB, de la Vega P, McCutchan TF: Binding and invasion of liver cells by *Plasmodium falciparum* sporozoites. Essential involvement of the amino terminus of circumsporozoite protein. *J Biol Chem* 2002, 277:7092–7098.
39. Singh AP, Buscaglia CA, Wang Q, Levay A, Nussenzweig DR, Walker JR, Winzeler EA, Fujii H, Fontoura BMA, Nussenzweig V: *Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell* 2007, 131:492–504.
40. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok J-M, Menard R, Heussler VT: Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006, 313:1287–1290.
41. Löscher T, Burchard GD: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: Das Referenzwerk für Tropen- und Reisemedizin - mit Curriculum Reisemedizin*. Stuttgart: Thieme; 2008.
42. Manson P: *Manson's Tropical Diseases;: A Manual of the Diseases of Warm Climates*. 8th edition. London: W. Wood and Co; 1925.
43. Rosenthal PJ, Meshnick SR: Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1996, 83:131–139.

44. Fitch CD, Kanjanangulpan P: The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. *J Biol Chem* 1987, 262:15552–15555.
45. Schumann RR: Malarial fever: hemozoin is involved but Toll-free. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:1743–1744.
46. Dal-Bianco MP, Köster KB, Kombila UD, Kun JFJ, Grobusch MP, Ngoma GM, Matsiegui PB, Supan C, Salazar CLO, Missinou MA, Issifou S, Lell B, Kreamsner P: High prevalence of asymptomatic Plasmodium falciparum infection in Gabonese adults. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 77:939–942.
47. Lell B, Brandts CH, Graninger W, Kreamsner PG: The circadian rhythm of body temperature is preserved during malarial fever. *Wien Klin Wochenschr* 2000, 112:1014–1015.
48. Lubitz JM: Pathology of the ruptured spleen in acute vivax malaria. *Blood* 1949, 4:1168–1176.
49. Shee JC: Spontaneous rupture of the spleen. *Lancet* 1972, 2:604.
50. Rajahram GS, Barber BE, William T, Menon J, Anstey NM, Yeo TW: Deaths due to Plasmodium knowlesi malaria in Sabah, Malaysia: association with reporting as Plasmodium malariae and delayed parenteral artesunate. *Malar J* 2012, 11:284.
51. Grobusch MP, Kreamsner PG: Uncomplicated malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, 295:83–104.
52. Cook GC, Zumla A, Manson P: *Manson's Tropical Diseases*. [Edinburgh]: Saunders; 2009.
53. Meyer CG: *Tropenmedizin: Infektionskrankheiten*. Landsberg: Ecomed; 2007.
54. Dzeing-Ella A, Nze Obiang PC, Tchoua R, Planche T, Mboza B, Mbounja M, Muller-Roemer U, Jarvis J, Kendjo E, Ngou-Milama E, Kreamsner PG, Krishna S, Kombila M: Severe falciparum malaria in Gabonese children: clinical and laboratory features. *Malar J* 2005, 4:1.
55. Molyneux ME: Impact of malaria on the brain and its prevention. *Lancet* 2000, 355:671–672.
56. Warrell DA: Cerebral malaria. *Schweiz Med Wochenschr* 1992, 122:879–886.
57. Helbok R, Kendjo E, Issifou S, Lackner P, Newton CR, Kombila M, Agbenyega T, Bojang K, Dietz K, Schmutzhard E, Kreamsner PG: The Lambaréné Organ Dysfunction Score (LODS) is a simple clinical predictor of fatal malaria in African children. *J Infect Dis* 2009, 200:1834–1841.
58. Mturi N, Musumba CO, Wamola BM, Ogutu BR, Newton CRJC: Cerebral malaria: optimising management. *CNS Drugs* 2003, 17:153–165.

59. Whitty CJM, Leslie T, Chandler CIR, Staedke SG: Management of malaria and other severe infections in rural Africa and Asia. *BMJ* 2010, 340:c1527.
60. Snow RW, Amratia P, Kabaria CW, Noor AM, Marsh K: The changing limits and incidence of malaria in Africa: 1939-2009. *Adv Parasitol* 2012, 78:169–262.
61. World Health Organization. Global Malaria Programme: *World malaria report 2012*. Geneva: World Health Organization; 2012.
62. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD: Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2012, 379:413–431.
63. Smith AD, Bradley DJ, Smith V, Blaze M, Behrens RH, Chiodini PL, Whitty CJM: Imported malaria and high risk groups: observational study using UK surveillance data 1987-2006. *BMJ* 2008, 337:a120.
64. Pavli A, Maltezou HC: Malaria and travellers visiting friends and relatives. *Travel Med Infect Dis* 2010, 8:161–168.
65. Robert Koch Institut: Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland. *Epidemiol Bull* 2010, 38.
66. Ziegler K: [New strategy in the fight against malaria]. *Z Für Gesamte Inn Med Ihre Grenzgeb* 1978, 33:436–439.
67. Myrvang B, Godal T: [WHO's malaria program Roll Back Malaria]. *Tidsskr Den Nor Lægeforen Tidsskr Prakt Med Ny Række* 2000, 120:1661–1664.
68. Binka F: [The goals and tasks of the Roll Back Malaria WHO Cabinet Project]. *Med Parazitol (Mosk)* 2000:8–11.
69. Narasimhan V, Attaran A: Roll back malaria? The scarcity of international aid for malaria control. *Malar J* 2003, 2:8.
70. Balter M: Malaria. Can WHO roll back malaria? *Science* 2000, 290:430.
71. Kaiser A, Maier W: [New strategies in therapy to roll back malaria]. *Dtsch Med Wochenschr* 1946 2002, 127:1595–1600.
72. Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, Methogo BGNO, Doucka Y, Flamen A, Mordmüller B, Issifou S, Kremsner PG, Sacarlal J, Aide P, Lanaspá M, Aponte JJ, Nhamuave A, Quelhas D, Bassat Q, Mandjate S, Macete E, Alonso P, Abdulla S, Salim N, Juma O, Shomari M, Shubis K, Machera F, Hamad AS, Minja R, et al.: First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011, 365:1863–1875.

73. Korte R, Rehle T, Merkle A: Strategies to maintain health in the Third World. *Trop Med Parasitol Off Organ Dtsch Tropenmedizinische Ges Dtsch Ges Für Tech Zusammenarbeit GTZ* 1991, 42:428–432.
74. WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 1993-2000: *Implementation of the Global Malaria Control Strategy*. Geneva: World Health Organization; 1993. [WHO Technical Report Series, vol. 839]
75. White MT, Conteh L, Cibulskis R, Ghani AC: Costs and cost-effectiveness of malaria control interventions--a systematic review. *Malar J* 2011, 10:337.
76. Chandler CIR, Mwangi R, Mbakilwa H, Olomi R, Whitty CJM, Reyburn H: Malaria overdiagnosis: is patient pressure the problem? *Health Policy Plan* 2008, 23:170–178.
77. Koram KA, Molyneux ME: When is “malaria” malaria? The different burdens of malaria infection, malaria disease, and malaria-like illnesses. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 77(6 Suppl):1–5.
78. Mordmüller B, Kremsner PG: Malarial parasites vs. antimalarials: never-ending rumble in the jungle. *Curr Mol Med* 2006, 6:247–251.
79. D’Acremont V, Lengeler C, Mshinda H, Mtasiwa D, Tanner M, Genton B: Time to move from presumptive malaria treatment to laboratory-confirmed diagnosis and treatment in African children with fever. *PLoS Med* 2009, 6:e252.
80. Reyburn H, Ruanda J, Mwerinde O, Drakeley C: The contribution of microscopy to targeting antimalarial treatment in a low transmission area of Tanzania. *Malar J* 2006, 5:4.
81. Morel CM, Lauer JA, Evans DB: Cost effectiveness analysis of strategies to combat malaria in developing countries. *BMJ* 2005, 331:1299.
82. Batwala V, Magnussen P, Hansen KS, Nuwaha F: Cost-effectiveness of malaria microscopy and rapid diagnostic tests versus presumptive diagnosis: implications for malaria control in Uganda. *Malar J* 2011, 10:372.
83. Leslie T, Mikhail A, Mayan I, Anwar M, Bakhtash S, Nader M, Chandler C, Whitty CJM, Rowland M: Overdiagnosis and mistreatment of malaria among febrile patients at primary healthcare level in Afghanistan: observational study. *BMJ* 2012, 345:e4389.
84. Long EG: Requirements for diagnosis of malaria at different levels of the laboratory network in Africa. *Am J Clin Pathol* 2009, 131:858–860.
85. Jonkman A, Chibwe RA, Khoromana CO, Liabunya UL, Chaponda ME, Kandiero GE, Molyneux ME, Taylor TE: Cost-saving through microscopy-based versus presumptive diagnosis of malaria in adult outpatients in Malawi. *Bull World Health Organ* 1995, 73:223–227.

86. Mombo-Ngoma G, Kleine C, Basra A, Würbel H, Diop DA, Capan M, Adegnika AA, Kurth F, Mordmüller B, Joanny F, Kreamsner PG, Ramharter M, B elard S: Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon. *Malar J* 2012, 11:120.
87. World Health Organisation: *Malaria Microscopy Quality Assurance Manual: Version 1*. Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific; 2009.
88. Gatti S, Bernuzzi AM, Bisoffi Z, Raglio A, Gulletta M, Scaglia M, Lombardy Region's Study Group on International Health (SIRL): Multicentre study, in patients with imported malaria, on the sensitivity and specificity of a dipstick test (ICT Malaria P.f./P.v.) compared with expert microscopy. *Ann Trop Med Parasitol* 2002, 96:15–18.
89. Iqbal J, Hira PR, Sher A, Al-Enezi AA: Diagnosis of imported malaria by Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) and histidine-rich protein 2 (PfHRP-2)-based immunocapture assays. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 64:20–23.
90. Hernandez E, De Pina JJ, Fabre R, Garrabe E, Raphenon G, Cavallo JD: [Evaluation of the OptiMal test in the diagnosis of imported malarial outbreak]. *M edecine Trop Rev Corps Sant  Colon* 2001, 61:153–157.
91. Palmer CJ, Bonilla JA, Bruckner DA, Barnett ED, Miller NS, Haseeb MA, Masci JR, Stauffer WM: Multicenter study to evaluate the OptiMAL test for rapid diagnosis of malaria in U.S. hospitals. *J Clin Microbiol* 2003, 41:5178–5182.
92. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P: Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br J Haematol* 2000, 109:891–894.
93. Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN: The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for Plasmodium falciparum infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, 87:646–648.
94. Dietze R, Perkins M, Boulos M, Luz F, Reller B, Corey GR: The diagnosis of Plasmodium falciparum infection using a new antigen detection system. *Am J Trop Med Hyg* 1995, 52:45–49.
95. Proux S, Hkirijareon L, Ngamngonkiri C, McConnell S, Nosten F: Paracheck-Pf: a new, inexpensive and reliable rapid test for P. falciparum malaria. *Trop Med Int Health TM IH* 2001, 6:99–101.
96. Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso MLH, Newton CRJC: The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect Dis* 2006, 6:582–588.

97. Iqbal J, Khalid N, Hira PR: Performance of rapid malaria Pf antigen test for the diagnosis of malaria and false-reactivity with autoantibodies. *Adv Exp Med Biol* 2003, 531:135–148.
98. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnol Read Mass* 1992, 24:17–27.
99. Hänscheid T, Grobusch MP: How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol* 2002, 18:395–398.
100. Tek FB, Dempster AG, Kale I: Computer vision for microscopy diagnosis of malaria. *Malar J* 2009, 8:153.
101. Payne D: Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ* 1988, 66:621–626.
102. Makler MT, Palmer CJ, Ager AL: A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998, 92:419–433.
103. Hänscheid T: Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol* 1999, 21:235–245.
104. Warhurst DC, Williams JE: ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol* 1996, 49:533–538.
105. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC: Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *Am J Trop Med Hyg* 1997, 56:44–48.
106. Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N, Kumpitak C, Miller RS, Soyseng V, Thimasarn K, Sattabongkot J: Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67:141–144.
107. Central Intelligence Agency: *CIA World Factbook*. Washington D.C.: Central Intelligence Agency; 1999.
108. Group OB: *The Report: Gabon 2010*. Oxford Business Group; .
109. *Gabon Pharmaceuticals & Healthcare Report : Includes 10-Year Forecasts to 2017*. London: Business Monitor International; 2011.
110. Schweitzer A: *Aus meinem Leben und Denken*. Frankfurt am Main: Fischer Taschenbuch; 1995.
111. Ramharter M, Adegnika AA, Agnandji ST, Matsiegui PB, Grobusch MP, Winkler S, Graninger W, Krishna S, Yazdanbakhsh M, Mordmüller B, Lell B,

- Missinou MA, Mavoungou E, Issifou S, Kreamsner PG: History and perspectives of medical research at the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné, Gabon. *Wien Klin Wochenschr* 2007, 119(19-20 Suppl 3):8–12.
112. Sylla EH, Lell B, Kun JF, Kreamsner PG: Plasmodium falciparum transmission intensity and infection rates in children in Gabon. *Parasitol Res* 2001, 87:530–533.
113. Lell B, Missinou MA, Issifou S, Matsiegui P-B, Olola CHO, Taylor TE, Kreamsner PG: Assessment of a simplified method for counting leukocytic malaria pigment. *Am J Trop Med Hyg* 2005, 73:588–592.
114. Curie LA: Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl Chem* 1995, 67:1699–1723.
115. Planche T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher JF, Ngou-Milama E, Kreamsner PG: Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65:599–602.
116. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA: A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:687–692.
117. Wiehart J: Proofs of the distribution law of the second order moment statistics. *Biometrika* 1948, 35(Pts 1-2):55–57.
118. Jorgensen E, Pedersen AR: How to obtain those nasty standard errors from transformed data _ and why they should not be used. *Aarhus Univ Det Jordbrugsvidenskabelige Fak* 1998, 7.
119. Avila SL, Ferreira AW: Malaria diagnosis: a review. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al* 1996, 29:431–443.
120. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S: Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol* 2009, 47:93.
121. Montoya AE, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, Restrepo M: [Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis]. *Bioméd Rev Inst Nac Salud* 2008, 28:252–261.
122. Moody A: Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:66–78.
123. Hänscheid T, Valadas E: Malaria diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61:179.

VI Danksagung

Zunächst gilt mein großer Dank Herrn Prof. Peter Gottfried Kremsner und dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu realisieren und jene unbezahlbaren Erfahrungen in Lambaréné zu sammeln. So war es mir möglich nach meinem frisch erworbenen Diplom in Tropenmedizin das erlangte Wissen vor Ort zu vertiefen, anzuwenden und im Rahmen der *SMAC-Artesunate* Studie als Medical Investigator sehr viel Neues zu erlernen. Das Entdecken einer nach dem Abitur verloren geglaubten Sprache und meiner besseren französischen Hälfte trug sein Übriges zum Gelingen dieses unvergesslichen Jahres in Gabun bei.

Dr. Benjamin Mordmüller danke ich herzlichst für die allzeit einwandfreie, humorvolle und insgesamt exzellente Betreuung und den Freiraum zur Gestaltung dieser Arbeit.

Herr Thomas Engleitner danke ich herzlich für die Unterstützung bei der statistischen Aufbereitung und Auswertung dieser Arbeit

Auch den Direktoren de l'Unité de Recherches Médicales, Dr. Ayola Akim Adegnika, Dr. Bertrand Lell und Dr. Saadou Issifou möchte ich herzlich für ihre Unterstützung danken, die mir allzeit ihre Expertise, aber auch mal ein dringend benötigtes Fahrzeug, Equipment oder Räumlichkeiten zur Verfügung stellten.

Dr. Bertrand Lell danke ich des Weiteren für die Bereitstellung der in dieser Arbeit angewendeten Leitlinie.

Ein besonderer Dank gilt den Mikroskopisten aus Lambaréné, dem Herzstück dieser Arbeit, für ihre freiwilliges Engagement und Teilnahme an dieser Arbeit.

VII Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|--------------|----------------------------|
| Name | Sascha Johannes Zo-Ri Löhr |
| Geburtsdatum | 26. März 1982 |
| Geburtsort | Daun, Vulkaneifelkreis |
| Nationalität | Deutsch |

Beruflicher Werdegang

| | |
|---------------------|---|
| Seit Dez 2012 | Assistenzarzt Abteilung Viszeral- und Unfallchirurgie, DRK Krankenhaus Alzey |
| Sep 2012 – Feb 2013 | Studienarzt am Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen |
| Sep 2011- Sep 2012 | Studienarzt an der Unité de Recherche Médicale de l'Hôpital Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun |
| Feb 2009 – Apr 2011 | Assistenzarzt in der Abteilung für Kinderchirurgie Mutterhaus der Borromäerinnen Trier Ausbildung Common Trunk Basischirurgie |
| Jan 2009 | Erhalt der Approbation |

Ausbildung und Qualifikationen

| | |
|--------------------|--|
| Aug 2011- Sep 2011 | Notarzkurs, Freiburg im Breisgau Notarzt-Praktikum, Berufsfeuerwehr Trier |
| Apr 2011- Jul 2011 | Diplomkurs für Tropenmedizin, Bernhard Nocht Institut, Hamburg |
| Okt 2002- Dez 2008 | Studium der Humanmedizin, Gutenberg Universität Mainz |
| Dez 2008 | Staatsexamen Medizin |

VIII Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solches mit entsprechenden Verweisen gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit angewandte Leitlinie wurde mir von Herrn Dr. Bertrand Lell zur Verfügung gestellt und erläutert. Bei der statistischen Auswertung wurde ich von Herrn Thomas Engleitner und Frau Fanny Joanny beraten und unterstützt. Herr Dr. Benjamin Mordmüller, als mein Betreuer übernahm die Korrekturen der vorläufigen Versionen, war Ansprechpartner für die Durchführung, Planung und Verbesserung dieser Arbeit. Des Weiteren unterstützte mich Frau Fanny Joanny bei der Durchführung der *nested* PCR, sowie der graphischen Auswertung mit dem Programm *R*. Alle Grafiken sowie Photographien wurden von mir erstellt und aufgenommen, mit Ausnahme der Luftaufnahme des Areals des *Hôpital Albert Schweitzer*, die mir von Noemi Garcia Tardon zur Verfügung gestellt wurde. Ein großer Teil der Ergebnisse dieser Arbeit sind im *Malaria Journal* publiziert (Joanny F, Löhr SJ, Engleitner T, Lell B, Mordmüller B. Limit of blank and limit of detection of *Plasmodium falciparum* thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa. *Malar J.* 2014 Jun 14;13(1):234). Ich bin ein Autor der publizierten Arbeit.

Ich versichere, dass ich die Dissertation nur in diesem Promotionsverfahren eingereicht habe.