

***In vivo* Kinetik des *Plasmodium falciparum*  
*histidine-rich protein 2* bei Patienten  
mit unkomplizierter Malaria tropica**

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

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

**vorgelegt von**

**Saskia Breil, geb. Landmann**

**2016**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. B. Mordmüller

2. Berichterstatter:

Juniorprofessor Dr. S. Wagner

*„Bedürfnis nach Erkennen!*

*Suche zu ergründen alles, was um dich herum ist,  
gehe bis an die äußersten Grenzen des menschlichen Wissens,  
und immer stößt du zuletzt auf etwas Unergründliches  
- und dies Unergründliche heißt: Leben!“*

Albert Schweitzer

---

# Inhaltsverzeichnis

---

## Vorbemerkung zum Sprachgebrauch

In dieser Arbeit verwende ich vorwiegend das generische Maskulinum und schließe damit gleichermaßen weibliche und männliche Personen ein. Wenn beispielsweise von Patienten die Rede ist, sind damit auch Patientinnen gemeint, es sei denn das Geschlecht wird explizit hervorgehoben. Auf „-Innen“ oder „/-innen“ verzichte ich, um den Text leichter lesbar zu halten. Die Leserinnen bitte ich um Verständnis für diese Vereinfachung im Text.

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Malaria allgemein .....	6
1.2 Erreger und Übertragung der Malaria.....	7
1.2.1 Lebenszyklus.....	9
1.3 Malaria tropica .....	10
1.3.1 Pathogenese .....	11
1.3.2 Klinisches Bild .....	13
1.3.3 Diagnostik und Therapie .....	16
1.4 HRP2 .....	22
1.5 Ziel der Studie .....	24
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Studienort und Studienzeit .....	26
2.1.1 Studienort.....	26
2.1.2 Studienzeit.....	28
2.2 Malaria in Lambaréné.....	29
2.3 Studiendesign.....	29
2.3.1 Ethik und Studienprotokoll.....	29
2.3.2 Studienpopulation.....	30
2.3.3 Screening und Einschluss in die Studie .....	31
2.3.4 Einschluss und <i>Follow-up</i> Besuche, Probengewinnung.....	33
2.3.5 Studienmedikation Coarsucam®.....	36
2.4 Laboranalysen .....	38

---

2.4.1	Lichtmikroskopie.....	38
2.4.2	Malaria-Schnelltests.....	39
2.4.3	ELISA.....	41
2.5	Datenmanagement und statistische Auswertung.....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Patientencharakteristika bei Einschluss in die Studie.....	44
3.1.1	Studienpopulation, demographische Merkmale.....	44
3.1.2	Befunde und Testergebnisse an Tag 0.....	44
3.2	Studienverlauf.....	48
3.3	Testergebnisse in der Beobachtungsphase.....	50
3.3.1	Mikroskopie.....	50
3.3.2	Schnelltests.....	53
3.3.3	ELISA.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
4.1	Einschluss in die Studie.....	60
4.1.1	Studienpopulation, demographische Merkmale.....	61
4.1.2	Befunde und Testergebnisse an Tag 0.....	61
4.2	Verlauf.....	67
4.2.1	Mikroskopie.....	67
4.2.2	Schnelltests.....	68
4.2.3	ELISA.....	71
4.3	Schlussfolgerung.....	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>95</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>96</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Es wurden Standardabkürzungen und international gebräuchliche SI-Einheiten verwendet.

%	Prozent
Abb.	Abbildung
ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i> (Artemisinin-Kombinationstherapie)
aPfEIR	<i>annual entomological inoculation rate for P. falciparum</i> (jährliche entomologische Inokulationsrate für <i>P. falciparum</i> )
AQ	Amodiaquin
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> (akutes Atemnotsyndrom)
AS	Artesunat
AU	<i>arbitrary unit</i> (arbiträre Einheit)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (bovines Serumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CERIL	<i>Comité d’Ethique Régional Indépendant de Lambaréné</i> , (Regionales Unabhängiges Ethikkomitee von Lambaréné)
CI	Konfidenzintervall
CK-XX	Patienten-Identifikationsnummer XX (fortlaufende Nummern)
d	Tag
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DT	dicker Tropfen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIR	<i>entomological inoculation rate</i> (entomologische Inokulationsrate)

---

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
et al.	<i>et alii</i> (Lateinisch, übersetzt: und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (Lateinisch, übersetzt: und so weiter)
g	Gramm
GCP	<i>Good Clinical Practice</i> (gute klinische Praxis)
ggf.	gegebenenfalls
Hb	Hämoglobin
Hg	chemisches Zeichen für Quecksilber
HRP2	<i>histidine-rich protein 2</i>
IL-1	Interleukin 1
i. v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IQR	<i>interquartile range</i> (Interquartilsabstand)
k	Kilo
kDa	Kilo Dalton (atomare Masseneinheit)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
km	Kilometer
km <sup>2</sup>	Quadratkilometer
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i> (Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation)
LDH	Laktatdehydrogenase
LOD	<i>limit of detection</i> (klinische Erkennungsgrenze)
m	Meter
M	Molar
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Maßangabe für Drücke)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

---

nm	Nanometer
o. g.	oben genannt
<i>P.</i>	Plasmodium
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>P.f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>P. falciparum</i> -Erythrozyten-Membranprotein 1
PfHRP2	<i>Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2</i>
pH	dimensionsloses Maß für den sauren oder basischen Charakter einer Lösung
pLDH	Parasiten-spezifische Laktatdehydrogenase
RDT	<i>rapid diagnostic test</i> (Schnelltest)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rtPCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i> (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SE	<i>standard error</i> (Standardfehler)
sog.	sogenannt
spp.	<i>species</i> (Plural), mehrere Arten einer Gattung
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
u. a.	unter anderem
URM	<i>Unité des recherches médicales</i> (medizinisches Forschungslabor in Lambaréné)
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem
VFR	<i>visiting friends and relatives</i> (Auswanderer, die zu einem Besuch in ihr Heimatland zurückkehren)
vs.	<i>versus</i> (Lateinisch, übersetzt: gegen(übriggestellt))
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
z. B.	zum Beispiel

---

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Malaria allgemein

Malaria ist eine von Vektoren übertragene Krankheit, die jährlich ca. 600.000 Menschenleben fordert.<sup>1</sup> Die Verbreitung beschränkt sich hauptsächlich auf tropische und subtropische Gebiete; die Hauptkrankheitslast wird von Ländern Afrikas südlich der Sahara getragen, in denen mehr als 80% der weltweiten Fälle zu verzeichnen sind.<sup>1,2</sup> Malaria wird hervorgerufen durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium*, die von Stechmücken auf den Menschen übertragen werden. 9 - 30 Tage nach dem Stich einer infizierten Mücke beginnen die ersten Symptome. Diese sind anfangs unspezifisch und ähneln einem grippalen Infekt: Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen und gastrointestinale Beschwerden wie Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen oder Durchfall. Bei der durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufenen schwersten Form, der Malaria tropica, können unbehandelt jedoch schnell Komplikationen auftreten und die Malaria kann zu einer lebensbedrohlichen Krankheit fortschreiten, die zu schwerer Anämie, multiplen Organversagen, Koma und schließlich zum Tode führt.<sup>3</sup> Besonders Kinder entwickeln schnell Komplikationen; etwa 80% der Todesopfer sind Kinder unter 5 Jahren.<sup>1</sup> Malaria ist eine behandelbare Krankheit. Wird sie rasch diagnostiziert und behandelt, können selbst schon aufgetretene Komplikationen gut beherrscht werden und die Prognose ist gut. Das Fieber und die meisten Symptome verschwinden dann normalerweise innerhalb von drei Tagen.<sup>3</sup> Malaria kann mittels Mikroskopie von gefärbten Blutaussstrichen oder mittels immunochromatographischer Schnelltests diagnostiziert werden. Es stehen noch andere diagnostische Verfahren zur Verfügung, die jedoch aufgrund hohen technischen oder zeitlichen Aufwandes oder hoher Kosten im klinischen Routinealltag bisher keine Bedeutung haben.<sup>4</sup> Im Laufe ihres Entwicklungszyklus in den menschlichen Erythrozyten heften sich reife asexuelle Stadien von *Plasmodium falciparum* an das Gefäßendothel von Organen. Diese sogenannte Sequestrierung führt dazu, dass die Parasiten für eine Weile aus dem peripher zirkulierenden Blut „verschwinden“ und dort

nicht mehr nachgewiesen werden können.<sup>5,6</sup> Die sequestrierten Parasiten werden aber hauptverantwortlich gemacht für schwere Komplikationen der Malaria.<sup>7,8</sup> Es besteht die Annahme, dass mithilfe der Messung von spezifischen Biomarkern, die unabhängig von ihrer Lokalisation im Wirtsorganismus von den Parasiten synthetisiert werden, die Gesamt-Parasitenlast geschätzt werden kann.<sup>9</sup> Hierzu wurden verschiedene Berechnungsmodelle entwickelt.<sup>9-11</sup> Könnte die Gesamt-Parasitenlast eines Patienten vor Therapiebeginn zuverlässig geschätzt werden, wäre das von großer Bedeutung für die Einschätzung der Schwere einer Malariaerkrankung und ihrer Prognose, und es ließe sich von Beginn an eine adäquatere Therapie für den individuellen Patienten ableiten.<sup>9</sup>

Die vorliegende Arbeit untersucht einen möglichen Biomarker, das *Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2* (HRP2), insbesondere im Hinblick auf die *in vivo* Kinetik und seine Bedeutung für solche Berechnungsmodelle sowie für HRP2-detektierende Malaria-Schnelltests.

## 1.2 Erreger und Übertragung der Malaria

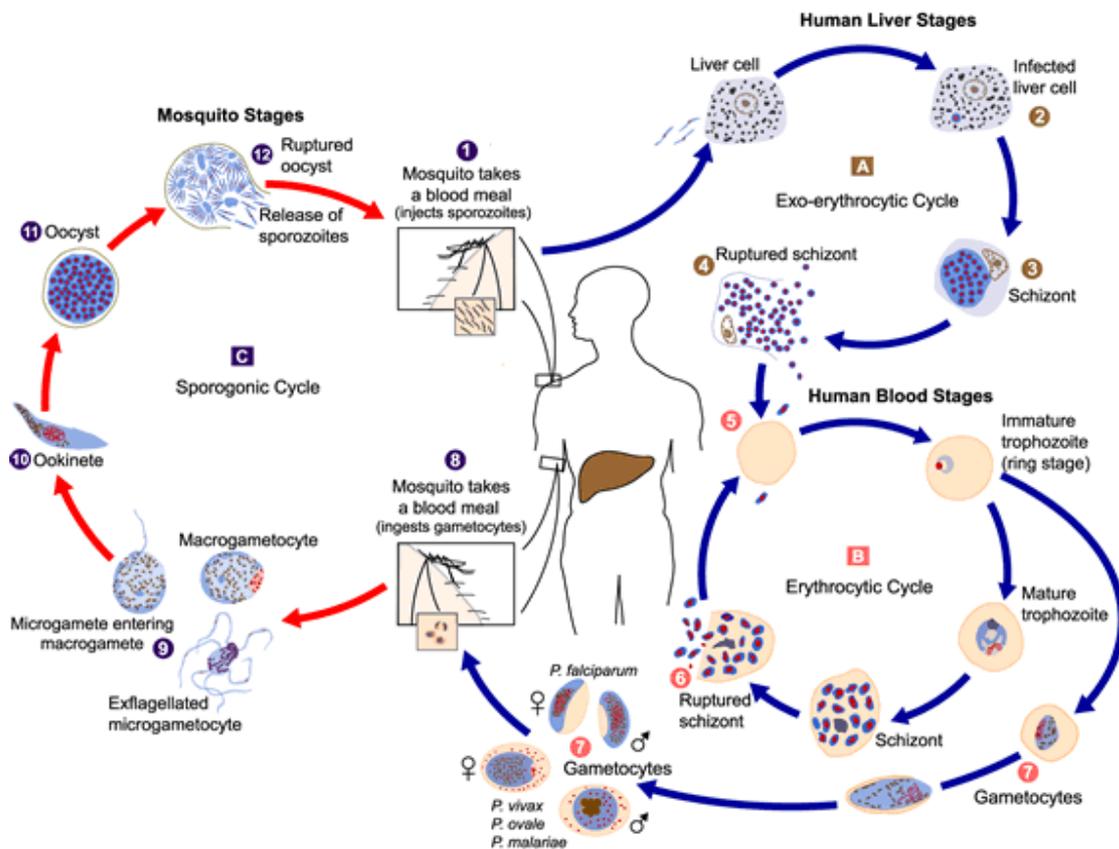
Plasmodien sind einzellige Parasiten, die zum Stamm der *Apicomplexa*, zur Ordnung der *Haemosporidia*, gehören. Es gibt über 200 beschriebene Arten und es werden weiterhin neue Arten beschrieben.<sup>12</sup> Plasmodien parasitieren bei einer Vielzahl von landlebenden Wirbeltieren. Fünf der Plasmodien-Arten gelten als humanpathogen und rufen beim Menschen die Krankheit Malaria hervor: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi*, wobei die vier erstgenannten die Hauptverursacher sind.<sup>13-15</sup> Die klinisch bedeutsamste Art ist *P. falciparum*.<sup>3,13</sup> Weitere Plasmodien-Arten können beim Menschen Malaria hervorrufen, jedoch ist bei der Übertragung ein Zwischenschritt über den natürlichen Zwischenwirt (z. B. Primaten) nötig oder die Übertragung konnte nur experimentell gezeigt werden.<sup>16</sup>

Der *Plasmodium*-Parasit durchläuft während seines Lebens verschiedene Entwicklungsstadien. Dieser sogenannte Lebenszyklus findet in zwei verschiedenen Wirten statt. Dabei dient der Mensch als Zwischenwirt und Stechmücken

der Gattung *Anopheles* als Endwirt. Im Menschen findet die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) statt, in der Mücke die sexuelle Vermehrung (Sporogonie).<sup>17,18</sup> Die Übertragung des Parasiten auf den Menschen geschieht durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke. Diese ist nach Befruchtung durch ein Männchen auf eine Blutmahlzeit bei einem Menschen oder Tier angewiesen, um das Reifen der Eier zu gewährleisten.

Es gibt etwa 430 verschiedene *Anopheles*-Arten weltweit, von denen aber nur 30 - 40 Malaria auf den Menschen übertragen. In Afrika sind die für die Malaria-Übertragung bedeutsamsten Arten *Anopheles gambiae* und *Anopheles funestus*. Diese beiden Arten sind stark anthropophil, d. h., dass sie für ihre Blutmahlzeit fast ausschließlich Menschen auswählen und nur sehr selten Tiere. So übertragen infizierte Mücken mit einer hohen Wahrscheinlichkeit den *Plasmodium*-Parasit auf einen anderen Menschen. Alle *Anopheles*-Arten, die Malaria übertragen, sind nachtaktiv. Das Schlafen unter einem Insektizid-imprägnierten Moskitonetz stellt eine der effektivsten Schutzmaßnahmen gegen *Anopheles*-Stiche und somit gegen Malaria dar.<sup>19,20</sup>

## 1.2.1 Lebenszyklus

**Abb. 1: Plasmodium-Lebenszyklus**

<http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>; public Domain, eingesehen am 10.03.2015

Die im folgenden Text in Klammern genannten Ziffern und Buchstaben beziehen sich auf obige Abbildung.

Wird ein Mensch von einer mit *Plasmodium* infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke gestochen, so gelangen während der Blutmahlzeit Sporozoiten mit dem Speichel der Mücke in die Blutbahn des Menschen (1). Diese werden mit dem Blut zur Leber transportiert und penetrieren die Hepatozyten (2). Dort reifen sie zu Leberschizonten heran (3). Durch die hier stattfindende Teilung (exoerythrozytäre Schizogonie) (A) entstehen bis zu 30.000 Merozoiten, die schließlich durch Auflösung der Leberschizonten in die Blutbahn freigesetzt werden (4). Die Merozoiten dringen in Erythrozyten ein und reifen zu Trophozoiten heran (5). Diese erscheinen als Ringform mit deutlich sichtbarem, randständigem Kern. Die Trophozoiten wiederum reifen zu Schizonten heran. Bei der hier stattfindenden Teilung (erythrozytäre Schizogonie) (B) entstehen in jedem

Erythrozyten bis zu 36 Merozoiten, die aufgrund ihrer Größe und Anzahl schließlich zur Ruptur des Erythrozyten führen (6). Die freigesetzten Merozoiten befallen weitere Erythrozyten und das Stadium der erythrozytären Schizogonie wiederholt sich. Solch ein Zyklus der erythrozytären Schizogonie dauert ca. 48 Stunden (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*) bzw. 72 Stunden (*P. malariae*). Nach kurzer Initialphase erfolgt eine Synchronisation der Schizogoniezyklen, außer bei *P. falciparum*. Das Fieber tritt jeweils kurz nach Ruptur der Erythrozyten auf und zeigt demnach auch einen entsprechenden Zeitverlauf mit Fieberwellen alle 48 bzw. 72 Stunden. Einige Merozoiten entwickeln sich zu den Geschlechtsformen (Gametozyten) weiter, die frei im Blut zirkulieren (7). Weibliche Gametozyten werden Makrogametozyten genannt, die männlichen Mikrogametozyten. Wird ein Mensch, in dessen Blut Gametozyten zirkulieren, von einer *Anopheles*-Mücke gestochen, so gelangen beide Gametozytenformen mit der Blutmahlzeit in den Verdauungstrakt der Mücke (8). Hier findet die sexuelle Vermehrung (Sporogonie) statt (C). Die Gametozyten wandeln sich in Gameten. Jeder Mikrogamet entwickelt 8 Exflagellaten, die je in einen Makrogameten eindringen und mit diesem zur Zygote verschmelzen (9). Diese wird zum beweglichen Ookineten (10), der die Wand des Verdauungstraktes durchdringt und sich zur Oozyste weiterentwickelt (11). Durch multiple Teilungen entstehen tausende von Sporozoiten, die bei Ruptur der Oozyste in die Körperhöhle der Mücke freigesetzt werden und zu den Speicheldrüsen wandern (12). Von dort gelangen sie bei einer folgenden Blutmahlzeit in die Blutbahn eines weiteren Menschen und der Lebenszyklus beginnt von neuem. <sup>17,18</sup>

### 1.3 Malaria tropica

Die von *P. falciparum* verursachte Form der Malaria wird Malaria tropica genannt. Aufgrund der oft fehlenden Synchronisation der Schizogoniezyklen (siehe 1.2.1) weist das Fieber keine Periodik auf. *P. falciparum* hat besondere Pathomechanismen, die zum oft schwerwiegenderen Krankheitsverlauf führen als andere Malariaformen.

### 1.3.1 Pathogenese

In von Plasmodien befallenen Erythrozyten sammeln sich Stoffwechselprodukte und Toxine an, die mit Ruptur der Erythrozyten in die Blutbahn gelangen. Dort werden daraufhin Zytokine freigesetzt, die für den Fieberanstieg verantwortlich sind. Werden durch den Befall und die Ruptur in hoher Zahl Erythrozyten zerstört, kommt es durch die Hämolyse zur Anämie. Auch nicht-infizierte Erythrozyten werden durch Komplement-vermittelte Lyse und Phagozytose zerstört. Bei *P. falciparum* wird zusätzlich die Erythropoese unterdrückt, was eine Anämie noch verstärkt.<sup>3,21</sup>

*P. falciparum* ist in der Lage, Erythrozyten jeden Alters zu befallen und kann somit zu Hyperparasitämien führen. *P. vivax* z. B. befällt hingegen nur Retikulozyten.<sup>7</sup> Es liegt auf der Hand, dass eine große Parasitenanzahl im Körper schwerwiegendere Auswirkungen hat als eine geringe Parasitenanzahl. Da asexuelle Plasmodien-Stadien Glukose nur durch anaerobe Glykolyse verstoffwechseln können, führt die Malaria tropica durch Hyperparasitämien häufig zu Hypoglykämie und metabolischer Azidose (v. a. Laktatazidose).<sup>21</sup> Es wird vermutet, dass die Azidose durch eine Gewebehypoxie aufgrund verschlechterter Perfusion (siehe unten) noch verstärkt wird.<sup>22,23</sup>

Die Gesamtanzahl der Parasiten im Körper wird Parasitenlast genannt. Eine hohe Parasitenlast führt in der Regel zu schwereren Krankheitsverläufen und einer schlechteren Prognose. Bei Malariainfektionen, die durch *P. vivax*, *P. ovale* oder *P. malariae* verursacht sind, findet der gesamte asexuelle Entwicklungszyklus des Parasiten im peripheren Blut statt. So kann durch Auszählen der Parasitendichte in Blutausstrichen (siehe 1.3.3) die Parasitenlast geschätzt und eine Aussage über die Prognose gemacht werden.<sup>21</sup>

Bei *P. falciparum* jedoch „verschwinden“ reife Entwicklungsstadien aus dem peripheren Blutkreislauf durch das Phänomen der Sequestrierung<sup>5,6</sup>: Während der Reifung von asexuellen *P. falciparum*-Parasiten zu reifen Trophozoiten und Schizonten bildet der befallene Erythrozyt auf seiner Oberfläche kleine Ausbuchtungen, sogenannte *knobs* aus. Diese binden an Rezeptoren des Endothels von Kapillaren und postkapillären Venolen und es findet eine Haftung des befallenen Erythrozyten an der Gefäßwand statt, die Sequestrierung.<sup>24,25</sup> Grund für

die Ausbildung der *knobs* ist u. a. das *P. falciparum*-Erythrozyten-Membranprotein 1 (PfEMP1), welches vom Parasiten synthetisiert und durch das Erythrozytenzytosol zur Zellmembran transportiert wird, um dort eingebaut zu werden.<sup>26,27</sup> Es wird angenommen, dass die Sequestrierung zum einen zur mechanischen Obstruktion des Gefäßes und somit zu geringerer Perfusion, Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und behindertem Abtransport von Stoffwechselabfallprodukten führt.<sup>7,28,29</sup> Zum anderen ist sie wahrscheinlich verantwortlich für die Aktivierung der Endothelzellen, welche wiederum die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen bewirkt.<sup>8,30,31</sup> Es besteht Übereinstimmung darüber, dass die Sequestrierung im Gewebe von wichtigen Organen wie Gehirn, Lunge, Nieren und Plazenta bei der Entstehung der meisten schweren Komplikationen der Malaria tropica eine wichtige Rolle spielt.<sup>7,8,23,29,32,33</sup>

Infizierte Erythrozyten haften nicht nur am Gefäßendothel, sondern können auch nicht-infizierte Erythrozyten an sich binden (Rosettenbildung), untereinander haften (Autoagglutination) oder unter Einbeziehung von Thrombozyten miteinander Klumpen bilden.<sup>28,34–36</sup> Des Weiteren ist die Fähigkeit, sich zu verformen, bei infizierten Erythrozyten herabgesetzt.<sup>28,37,38</sup> Dies kann auch zu einer Obstruktion der Kapillaren führen, da diese einen Durchmesser von 3 - 7µm besitzen, während Erythrozyten einen Durchmesser von ca. 7,5µm haben.<sup>23</sup>

Junge Entwicklungsstadien des Parasiten, v. a. Ring-Formen, zirkulieren weiterhin im peripheren Blut, da sie noch keine *knobs* ausgebildet haben und somit nicht sequestrieren. Zirkulieren Erythrozyten mit *knobs* im peripheren Blut, werden sie schnell in der Milz eliminiert.<sup>39</sup> Reifere Entwicklungsstadien können so im peripheren Blut kaum mehr nachgewiesen werden.<sup>7</sup> Werden dennoch reifere Entwicklungsstadien in Blutaussstrichen sichtbar, so repräsentieren sie anscheinend eine hohe Anzahl an sequestrierten Parasiten. Schon Field erkannte sie 1949 als Zeichen von schwererer Krankheit, was in späteren Studien bestätigt wurde.<sup>40–42</sup>

Aufgrund des Phänomens der Sequestrierung gibt es eine große Diskrepanz zwischen der Parasitendichte in peripheren Blutaussstrichen und der „echten“

Parasitenlast, da ein Großteil der Parasitenlast „versteckt“ ist. Somit lässt sich anhand der Parasitendichte nur beschränkt eine Aussage über die Prognose treffen.<sup>22</sup> Einige Patienten sind trotz hoher peripherer Parasitendichte nur wenig krank, während andere bei geringer peripherer Parasitendichte im Koma liegen.<sup>43</sup>

### 1.3.2 Klinisches Bild

Das charakteristischste Symptom von Malaria allgemein ist Fieber, das typischerweise bei *P. vivax* und *P. ovale* Infektionen alle 48 Stunden und bei *P. malariae* Infektionen alle 72 Stunden auftritt, jedoch bei Malaria tropica oft keine Periodik zeigt. Während der rapiden Anstiegsphase des Fiebers leidet der Patient häufig unter Schüttelfrost. Die Inkubationszeit, vom infektiösen Mückenstich bis zum Beginn des Fiebers, beträgt bei der Malaria tropica zwischen neun und 30 Tagen, in der Regel ca. zwei Wochen.<sup>3</sup> Im Prodromalstadium bis zu zwei Tage vor dem Beginn des Fiebers kann der Patient Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen, Durchfall, sowie Kopf-, Glieder- und Rückenschmerzen verspüren. Diese unspezifischen Symptome können auch am Anfang der Krankheit über mehrere Tage bestehen und bergen die Gefahr, dass Ärzte, die mit Malaria nicht vertraut sind, diese als grippalen Infekt, Influenza oder Gastroenteritis fehldiagnostizieren. Erwachsene Patienten aus endemischen Malariagebieten entwickeln nur selten Komplikationen, da sie sich regelmäßig mit Malaria infizieren und somit eine Teilimmunität entwickeln. Schwangere Frauen stellen davon jedoch eine Ausnahme dar, besonders in der ersten Schwangerschaft.<sup>21,44</sup> Bei teilimmunen Patienten verläuft eine Malariainfektion häufig asymptomatisch: viele Erwachsene in Endemiegebieten haben ständig eine geringe Parasitämie, die nicht zu Krankheitssymptomen führt. Selbst bei Erkrankung überstehen sie diese meist unbehandelt und die Symptome klingen nach einigen Tagen bis Wochen wieder ab. Allerdings können verbliebene Parasiten jederzeit wieder Krankheitssymptome hervorrufen, man spricht dann von einer Rekrudescenz. Diese ist nicht zu verwechseln mit einem Rezidiv, welches nur bei *P. vivax* und *P. ovale* Infektionen vorkommt und durch

in der Leber verbliebene Parasitenstadien (Hypnozoiten) hervorgerufen wird.<sup>3,44</sup>

Wird eine *Malaria tropica* nicht behandelt, so können rasch Komplikationen auftreten. Dies betrifft insbesondere ausländische Reisende in Malariagebiete und Kinder unter 5 Jahren, die noch keine Teilimmunität erworben haben. Ebenso können Menschen, die eine Teilimmunität besaßen, diese nach einiger Zeit ohne Malariainfektion wieder verlieren. Auswanderer aus Malariagebieten, die nach mehreren Jahren für einen Besuch in ihr Heimatland zurückkehren (sog. VFRs = *visiting friends and relatives*), zeigen bei einer erneuten Malariainfektion nicht selten sehr schwere Verläufe, obwohl sie früher durch eine Teilimmunität vor Komplikationen weitgehend geschützt waren.<sup>2,3,45,46</sup>

Mögliche Komplikationen, die durch eine schwere *Malaria tropica* hervorgerufen werden, sind schwere Anämie, zerebrale Malaria, metabolische Komplikationen, Nierenversagen, Lungenversagen und im weiteren Multiorganversagen.

Eine schwere Anämie mit einem Abfall des Hämoglobins (Hb) unter 5g/dl wird zum einen hervorgerufen durch die massive Zerstörung der Erythrozyten bei Schizontruptur bei hoher Parasitämie. Zum anderen wird durch freigesetzte Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 die Erythropoese im Knochenmark unterdrückt. Des Weiteren werden auch nicht-befallene Erythrozyten in der Milz zerstört.<sup>8</sup> Bei massiver Hämolyse kommt es zur Hämoglobinurie, insbesondere bei gleichzeitig bestehender Niereninsuffizienz, weshalb die Malaria früher auch „Schwarzwasserfieber“ genannt wurde. Die Anämie ist meist normochrom und normozytär, kann jedoch bei häufig gleichzeitig vorliegender schlechter Ernährungslage und Minderversorgung mit Eisen bzw. erhöhtem Eisenverbrauch (z. B. durch schnell aufeinanderfolgende Schwangerschaften oder Wurmerkrankungen) auch hypochrom und mikrozytär sein.<sup>21</sup> Malariabedingte Anämie ist die häufigste Todesursache von unter 2-Jährigen in Endemiegebieten.<sup>44</sup>

Der Begriff „zerebrale Malaria“ ist die klinische Beschreibung eines Syndroms, das durch herabgesetztes Bewusstsein bis hin zum Koma, zerebrale Krampfanfälle und/oder Hirnstammzeichen charakterisiert ist, wobei das Ausmaß der Ausfälle sehr variabel sein kann. Die Bewusstseinsstrübung kann langsam oder auch plötzlich einsetzen. Zerebrale Krampfanfälle, generalisiert oder fokal,

treten v. a. bei Kindern häufig auf. Fokale Krampfanfälle können sehr subtil sein und sich lediglich in Hypersalivation, Nystagmus oder irregulärer Atmung äußern. Hirnstammzeichen wie pathologische Pupillenreaktionen, pathologisches Atemmuster, veränderter Muskeltonus und -reflexe, Dezerebrationsstarre oder Dekortikationsstarre können auf erhöhten Hirndruck hinweisen. Häufig zeigen sich retinale Blutungen. Als Hauptursache für eine zerebrale Malaria wird die mikrovaskuläre Obstruktion im Gehirn durch Sequestrierung angenommen, wobei eine hohe Parasitenlast ein Prädiktor für eine schlechte Prognose ist (siehe 1.3.1). Allerdings scheint eher ein Zusammenspiel aus mikrovaskulärer Obstruktion, Hypoglykämie, Azidose und proinflammatorischen Zytokinen ursächlich für die neurologischen Symptome zu sein. Bei einer Liquorpunktion findet sich ein klarer Liquor mit leichter Lymphozytose (selten über 10 Zellen/ $\mu$ l) und gering erhöhtem Eiweiß und LDH bei normalem Blut/Liquor-Glukose-Verhältnis. Unbehandelt führt die zerebrale Malaria fast immer zum Tod. Auch behandelt beträgt die Letalität 20% bei Erwachsenen und 15% bei Kindern. In den meisten Fällen sind die neurologischen Defizite reversibel; es wurden vereinzelt persistierende Ataxie, Sprachstörungen, Psychosen, Polyneuropathien und Epilepsien beobachtet.<sup>3,21,29,44</sup>

Hypoglykämien sind eine häufige Komplikation bei Kleinkindern und Schwangeren. Gründe für eine Hypoglykämie sind neben hohem Glukoseverbrauch durch die Parasiten eine verringerte Nahrungszufuhr, Erschöpfung des Glykogenabbaus in der Leber und Inhibition der Glukoneogenese durch TNF- $\alpha$  und IL-1. Bei Behandlung mit Chinin wird die Hypoglykämie durch eine direkte Stimulierung der Insulinausschüttung noch verstärkt.<sup>21</sup> Die Symptome können leicht übersehen werden und äußern sich in verstärktem Schwitzen, Unruhe, Tachykardie, Tachypnoe und Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems (wie Bewusstseinsveränderungen oder zerebrale Krampfanfälle). Letztere können leicht einer zerebralen Malaria zugeschrieben werden, sind aber nach parenteraler Glukosegabe schnell reversibel. Schwere Malaria tropica geht häufig mit einer metabolischen Azidose einher. Diese entsteht unter anderem durch den Parasitenmetabolismus, verminderte Gewebepfusion und eine gestörte Leberfunktion. In den meisten Fällen ist dies hauptsächlich, aber nicht aus-

schließlich, eine Laktatazidose. Die metabolische Azidose führt oft zu einem schweren Atemnotsyndrom und ist vermutlich der stärkste Prädiktor für einen letalen Ausgang.<sup>47,48</sup>

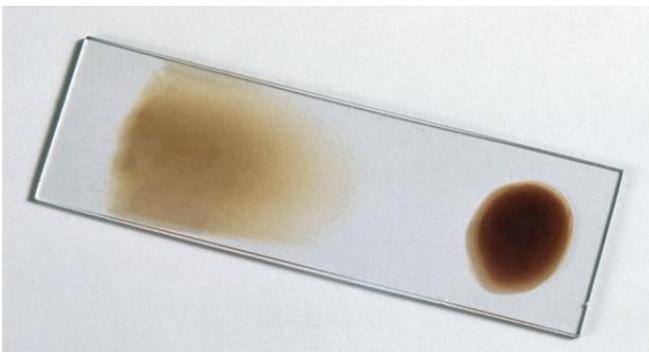
Akutes Nierenversagen als Komplikation einer schweren Malaria betrifft häufiger Erwachsene als Kinder. Klinisches Leitsymptom ist eine Oligurie, wobei die Urinausscheidung auch normal oder erhöht sein kann. Ursächlich sind eine massive Hämolyse, mikrovaskuläre Obstruktion in der Nierenrinde durch Sequestrierung und Hypotension. Es zeigt sich eine Erhöhung des Serum-Kreatinins; bei massiver Hämolyse imponiert eine Hämoglobinurie durch die dunkle Farbe des Urins (siehe oben). Elektrolytverschiebungen wie Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie und Hypokalzämie sowie die Entwicklung einer metabolischen Azidose sind mögliche Folgen des Nierenversagens. Nach Genesung ist nicht mit einer bleibenden Nierenschädigung zu rechnen.

Ein durch schwere Malaria tropica verursachtes akutes Lungenversagen gleicht klinisch dem akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS = *acute respiratory distress syndrome*), welches z. B. durch Pneumonie, Sepsis oder Trauma verursacht wird. Oft liegt ihm ein nicht-kardiogenes Lungenödem zugrunde. Schwangere sind besonders gefährdet, ein akutes Lungenversagen zu entwickeln. Es äußert sich in Husten, Tachypnoe, Dyspnoe und Hypoxie und kann eine mechanische Beatmung erforderlich machen.<sup>3,21,44</sup>

### 1.3.3 Diagnostik und Therapie

Da die Malaria kein eindeutiges klinisches Bild aufzeigt, müssen zur Diagnose Laborverfahren eingesetzt werden. Den Goldstandard der Diagnostik stellen auch heute noch mit Giemsa gefärbte dicke und dünne Blutaussstriche dar, die mittels Lichtmikroskopie beurteilt werden. Die Giemsa-Färbung wird aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin als Stabilisator hergestellt. Die Zellkerne erscheinen leuchtend rot, das Zytoplasma bläulich.<sup>49,50</sup> Zur Erstdiagnostik eignet sich besonders der dicke Tropfen, bei dem viele Schichten von Erythrozyten übereinander zu liegen kommen und somit auch eine

geringe Parasitenzahl im Blut rasch erkannt werden kann.<sup>2</sup> Die Anzahl der gezählten Parasiten pro Mikroskopier-Blickfeld wird ins Verhältnis zur Anzahl der gezählten Leukozyten pro Blickfeld gesetzt. Um die Parasitenanzahl pro Mikroliter Blut ( $P.f./\mu l$ ), die sog. Parasitämie, zu errechnen, ist die hämatologische Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut erforderlich. Eine vereinfachte Methode stellt die Lambaréné-Methode nach Planche dar, bei der keine hämatologische Blutuntersuchung nötig ist. Hierbei wird eine festgesetzte Menge Blut auf einer genau definierten Fläche auf dem Objektträger ausgestrichen. Es werden dann die Parasiten pro Blickfeld gezählt und die Parasitämie kann mithilfe eines Multiplikationsfaktors sofort berechnet werden.<sup>51</sup>

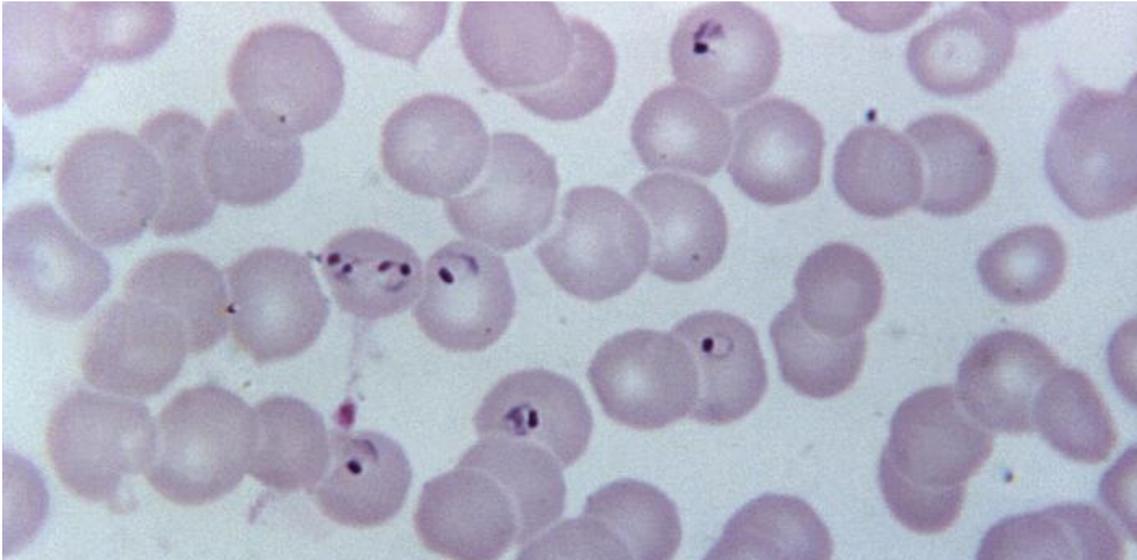


**Abb. 2: Objektträger mit Blutausstrich für die Malariadiagnostik**

Links dünner Ausstrich, rechts dicker Tropfen; ungefärbt.

Public Health Image Library, ID#:5896; public Domain, eingesehen am 10.03.2015

Zur genaueren Speziesdifferenzierung ist ein dünner Blutausstrich besser geeignet, da er in der Regel weniger Artefakte enthält. Auch können sehr hohe Parasitendichten im dünnen Blutausstrich genauer ausgezählt werden. Die Bestimmung der Parasitendichte ist bedeutend für die Prognose und das therapeutische Vorgehen, da sie ein Anhaltspunkt für die Parasitenlast, also für die Gesamtanzahl der Parasiten im Körper ist (siehe auch 1.3.1). Hohe Parasitenlasten gehen oft mit schwereren Krankheitsverläufen einher. Des Weiteren ist die Parasitendichte im Verlauf ein Parameter für die Wirksamkeit der Therapie.<sup>2</sup>



**Abb. 3: Dünner Blutausschicht mit *Plasmodium falciparum***

Lichtmikroskopische Ansicht, 1000-fache Vergrößerung; Giemsa-Färbung.

Public Health Image Library, ID#:5939; public Domain, besucht am 10.03.2015

Die Malariadiagnostik mittels Lichtmikroskopie von Blutausschichten ist preiswert und wenig aufwändig. Die fehlerfreie Anfertigung und zuverlässige Beurteilung von Blutausschichten erfordert jedoch viel Erfahrung und sollte nur durch regelmäßig geschultes und trainiertes Personal durchgeführt werden. Außerdem müssen in einem Labor funktionierende Mikroskope, ggf. mit zuverlässiger Stromversorgung, vorhanden sein und benötigte Reagenzien wie Färbelösung und Puffer täglich neu angesetzt werden. Dafür ist ein gewisses Maß an Infrastruktur nötig, welches in weiten Teilen der Länder, die hauptsächlich von Malaria betroffen sind, nicht vorhanden ist.<sup>4</sup> Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von peripherem Blut besteht ein weiterer Nachteil darin, dass es bei Malaria tropica durch das Phänomen der Sequestrierung eine hohe Diskrepanz der so ermittelten „peripheren“ Parasitendichte zur wirklichen Parasitenlast geben kann (siehe 1.3.1).<sup>2</sup>

Aufgrund der Unerreichbarkeit eines Labors, welches Malaria diagnostizieren kann, oder der dort nicht zuverlässigen Diagnostik ist „Malaria“ oft notgedrungen eine klinische Diagnose. Bei gleichzeitigem Vorhandensein effektiver, preiswerter Medikamente wurde in der Vergangenheit oft jede Fieberepisode bei Patienten in endemischen Malariagebieten mit Antimalaria-Medikamenten behandelt. Damals war Chloroquin die empfohlene *first-line* Therapie.<sup>52</sup>

Mittlerweile sind Chloroquin-Resistenzen weit verbreitet und die WHO empfiehlt eine Kombinationstherapie aus einem Artemisinin-Derivat und einem anderen Medikament (ACT = *Artemisinin-based combination therapy*).<sup>53-55</sup> Aktuell gelten die orale Therapie mit Artemether/Lumefantrin oder Artesunat/Amodiaquin als *first-line* Therapie bei unkomplizierter Malaria tropica in Afrika, bei schwerer Malaria tropica sollte mit Artesunat i. v. oder Chinin i. v. behandelt werden.<sup>53</sup> Die ACT ist deutlich teurer als das früher empfohlene Chloroquin. Trotzdem wird auch heute noch in vielen Teilen Afrikas mit endemischer Malaria jede Fieberepisode mit Antimalaria-Medikamenten behandelt. Selbst bei einem vorhandenen negativen Mikroskopieergebnis geschieht dies oft aus Unsicherheit.<sup>56</sup> Diese Übertherapie führt dazu, dass schneller Resistenzen gegen bis dato noch wirkungsvolle Medikamente auftreten, Ressourcen verschwendet und unnötige Kosten verursacht werden. Andere, dem Fieber ursächliche Krankheiten werden übersehen oder zu spät behandelt. Zudem wird der Patient dem Risiko der Nebenwirkungen eines Medikamentes ausgesetzt, das er gar nicht benötigt.<sup>4,57</sup>

Seit den 1990er Jahren sind Malaria-Schnelltests (RDTs = *rapid diagnostic tests*) im Handel. Dies sind immunchromatographische Teststreifen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen ein *Plasmodium*-Antigen behaftet sind. Kommt der Teststreifen in Kontakt mit Flüssigkeit, in dem sich dieses Antigen befindet, zeigt er eine bestimmte biochemische Reaktion, z. B. das Erscheinen eines farbigen Striches. Malaria-RDTs sind vergleichbar mit hierzulande erhältlichen Schwangerschaftstests. RDTs haben viele Vorteile: Sie sind sehr einfach durchzuführen, haben eine hohe Sensitivität und benötigen keine Laborgeräte, Wasser, elektrischen Strom oder Reagenzien. Das macht sie hochgradig geeignet für die Verwendung in entlegenen Regionen, auch durch wenig geschultes medizinisches Personal. Darüber hinaus werden nur sehr geringe Mengen an Blut (5 - 15µl) benötigt und ein Testergebnis ist schon nach 5 - 20 Minuten ablesbar.<sup>4</sup> RDTs weisen unterschiedliche Parasiten-Antigene nach. Die meisten Tests zielen auf das *P. falciparum* spezifische HRP2 (*histidine-rich protein 2*) ab.<sup>4,58</sup> Weitere nachweisbare Antigene sind eine *Plasmodium*-Aldolase, die jedoch den verschiedenen *Plasmodium*-Arten gemein ist, und

eine Parasiten-spezifische Laktatdehydrogenase (pLDH), von der verschiedene Isomere bekannt sind und somit die Unterscheidung einer Infektion mit *Plasmodium spp.* (pan-malaria), *P. falciparum* oder *P. vivax* ermöglicht. <sup>4</sup>

Es sind verschiedene RDTs auf dem Markt, die entweder nur ein Antigen, z. B. HRP2 nachweisen, oder mehrere Antigene, z. B. HRP2 und Plasmodium-Aldolase. Letztere Tests ermöglichen eine Unterscheidung zwischen durch *P. falciparum* verursachter Malaria (mit/ohne Mischinfektion) und durch non-*P. falciparum* verursachter Malaria. Trotz der offensichtlichen Vorteile bergen RDTs auch einige Nachteile. Da sie nur einen rein qualitativen Nachweis der jeweiligen Antigene erbringen, ist eine Aussage über die Parasitenlast nicht möglich. Somit ist der Untersucher alleinig auf klinische Zeichen zur Abschätzung der Schwere der Erkrankung angewiesen. Eine weitere Einschränkung stellt ihre begrenzte Haltbarkeit unter tropischen Umweltbedingungen dar. Bei einer Lagerung bei > 30°C und/oder einer Luftfeuchtigkeit > 70% oder einer Lagerung über mehrere Monate hinweg kann die Verlässlichkeit ihrer Testleistung deutlich eingeschränkt sein. <sup>4,58,59</sup> In den meisten Ländern, in denen RDTs zum Einsatz kommen, liegen aber genau solche Lagerungsbedingungen vor. Außerdem kann die lange Persistenz von zirkulierenden Antigenen, insbesondere HRP2, nach ausgeheilter Infektion „falsch-positive“ Ergebnisse hervorrufen, wenn ein positives Testergebnis mit dem Vorhandensein von Parasiten oder sogar einer akuten Erkrankung gleichgesetzt wird. <sup>60–64</sup> Darüber hinaus können Kreuzreaktionen mit Rheumafaktoren für falsch-positive Ergebnisse verantwortlich sein. <sup>65–67</sup> Die Sensitivität der meisten RDTs liegt für *P. falciparum* bei über 95%, zeigt jedoch für den Nachweis von *P. malariae* und *P. ovale* nicht ausreichende Ergebnisse. <sup>64,68</sup>

Die WHO sieht in RDTs eine neue Möglichkeit, Malariadiagnostik auch in entlegenen Regionen allen Patienten zugänglich zu machen und die neue Empfehlung umzusetzen, Antimalaria-Medikamente nur positiv getesteten Patienten zu verabreichen. <sup>69</sup>

Weitere Methoden, die in der Malariadiagnostik angewendet werden, sind die ELISA-Technik (*Enzyme-Linked Immunosorbant Assay* = enzymgekoppelter

Immunadsorptionstest) und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*).

Die ELISA-Technik ist eine biochemische Methode, die Analyte wie z. B. Proteine selektiv in geringen Konzentrationen nachweist und quantifiziert. Dazu werden in der Regel Antikörper gegen den nachzuweisenden Stoff (Antigen) an den Boden der Nöpfchen (*well*) einer Mikrotiterplatte gebunden. Im zweiten Schritt findet eine selektive Bindung des nachzuweisenden Antigens statt; nicht-bindende Moleküle werden gewaschen. Der Nachweis des Antigens geschieht mittels eines enzym-gekoppelten Zweitantikörpers, der zur Reaktion eines Farbstoffsubstrates führt. Die Auswertung erfolgt photometrisch, wobei die Signalstärke von der Konzentration des Antigens in der Probe abhängig ist.

<sup>70</sup> In der Malariadiagnostik werden mittels ELISA-Technik bestimmte Parasiten-Antigene wie z. B. HRP2 (siehe 1.4) im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten quantitativ nachgewiesen. Allerdings hat dieses Verfahren in der Malaria-Erstdiagnostik im klinischen Routinealltag bisher keine Bedeutung, da es im Vergleich zur Lichtmikroskopie oder zu RDTs ein gut ausgestattetes Analyselabor benötigt und höheren Kosten- und Zeitaufwand bedeutet. In der Malariaforschung wird es dagegen schon lange weitverbreitet genutzt. Außerdem wird es in Ländern mit nicht-endemischer Malaria in der routinemäßigen Untersuchung von Blutprodukten bei potentiell malariainfizierten Blutspendern angewendet.<sup>71</sup>

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) ist eine molekularbiologische Methode um spezifische DNA *in vitro* zu vervielfältigen und nachzuweisen.<sup>72</sup> So kann auch bei einer Malariainfektion spezifische Parasiten-DNA nachgewiesen werden und z. B. eine Speziesbestimmung erfolgen, wenn dies lichtmikroskopisch nicht möglich ist. Mittels PCR können auch kleinste Mengen DNA nachgewiesen werden; sie ist somit eine sehr sensitive Methode. Jedoch kann sie nicht zwischen sexuellen und asexuellen Parasitenformen oder zwischen lebenden und toten Parasiten unterscheiden.

<sup>73-75</sup> Die PCR ist ebenso wie die ELISA-Technik zeit- und kostenintensiv und setzt ein gut ausgestattetes Labor mit erfahrenen Untersuchern voraus. Sie wird bisher nicht in der Routinediagnostik eingesetzt. Ein neueres Verfahren zur DNA-Amplifizierung, die sogenannte LAMP-Methode (*loop-mediated isothermal*

*amplification* = Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation), ist weitaus kostengünstiger und technisch weniger aufwändig und ist zurzeit Gegenstand intensiver Erforschung in der Malariadiagnostik.<sup>76-79</sup>

Hochsensitive Verfahren im Allgemeinen sind besonders gut zur Diagnostik bei Malaria-naiven Patienten geeignet. Eine hohe Sensitivität ist jedoch in holoendemischen Malariaregionen, in denen ein Großteil der Bevölkerung eine asymptomatische Parasitämie aufweist, eher von Nachteil bei der Anwendung in der Routinediagnostik, da diese Verfahren nicht zwischen asymptomatischer Parasitämie und akuter Erkrankung unterscheiden können. Ein positives Testergebnis zeigt somit nicht zwingend eine akute Malariaerkrankung an und sollte kritisch interpretiert werden.

#### 1.4 HRP2

HRP2 (*histidine-rich protein 2*) ist ein 30kDa großes, Histidin- und Alaninreiches, wasserlösliches Protein, das auf von *P. falciparum* befallenen Erythrozyten exprimiert und ins Blut sezerniert wird. Es ist in Vollblut, Serum, Plasma, Liquor cerebrospinalis und Urin nachweisbar.<sup>80,81</sup> Wie in 1.3.3 beschrieben ist es ein häufig verwendetes Marker-Antigen für RDTs. HRP2 wird von asexuellen Formen von *P. falciparum* synthetisiert und zeigt somit eine aktive Infektion an. Obwohl es auch in unreifen Gametozyten vorkommt, fanden Beadle *et al.* (1994) keinen Anhalt dafür, dass eine Gametozytämie falsch-positive RDTs, die HRP2 detektieren, hervorruft.<sup>82</sup> Auch in Untersuchungen von Adesanmi *et al.* (2011) war der HRP2-detektierende RDT „Paracheck®Pf“ stets negativ für alle Blutproben, die im Blutaussstrich nur Gametozyten enthielten.<sup>83</sup> In anderen humanpathogenen *Plasmodium*-Arten als *P. falciparum* konnte HRP2 nicht nachgewiesen werden.

Die genaue Funktion von HRP2 ist im Detail noch nicht bekannt. HRP2 konnte sowohl im Zytoplasma und in der Nahrungsvakuole der Parasiten als auch im Zytosol und der Zellmembran der infizierten Erythrozyten gefunden werden. Es wird vermutet, dass der Parasit HRP2 in das Zytosol des Wirtserythrozyten sezerniert und es dann gemeinsam mit Hämoglobin in seine Nahrungsvakuole

aufnimmt. Dort spielt das HRP2 eine Rolle in der Polymerisation von Häm zu Hämozoin, welches in der Lichtmikroskopie von Blutaussstrichen als Malaria-pigment imponiert.<sup>84</sup> HRP2 hat wahrscheinlich auch Anteil daran, dass reife Entwicklungsstadien von *P. falciparum* dem Immunsystem entkommen und die befallenen Erythrozyten so nicht in der Milz abgebaut werden.<sup>85</sup>

Die Produktion und Sekretion von HRP2 ist abhängig vom Entwicklungsstadium des Parasiten. Desakorn *et al.* (2005) konnten zeigen, dass HRP2 vor allem während der zweiten Hälfte des erythrozytären Entwicklungszyklus produziert und sezerniert wird und 89% des Gesamt-HRP2 bei Schizontruptur freigesetzt werden.<sup>86</sup>

Eine Vielzahl von routinemäßig eingesetzten Malaria-Schnelltests benutzt HRP2 als Marker-Antigen. Es ist bekannt, dass HRP2 *in vivo* eine sehr lange Halbwertszeit hat. Dies führt dazu, dass selbst nach erfolgreicher Therapie einer *P. falciparum* Infektion solche RDTs noch wochenlang „falsch-positive“ Ergebnisse liefern können, wenn ein positives Testergebnis mit einer akuten Malariainfektion gleichgesetzt wird (siehe 1.3.3).<sup>60</sup> Kyabayinze *et al.* stellten in Untersuchungen mit RDTs eine mittlere persistierende Antigenämie von 32 Tagen fest, wobei die Parasitämie vor Therapiebeginn ein Indikator für die Dauer der persistierenden Antigenämie war.<sup>63</sup>

Die *in vivo* Eliminationskinetik und die genaue Halbwertszeit von HRP2 sind bisher kaum erforscht. Wie in 1.3.1 beschrieben sequestrieren späte Entwicklungsstadien von *P. falciparum* im Gefäßbett von Organen und können so nicht mehr im peripheren Blut nachgewiesen werden. Da HRP2 besonders von diesen sequestrierten Parasiten produziert und bei Schizontruptur freigesetzt wird, gibt die HRP2-Menge einen Aufschluss über die sequestrierten Parasiten. HRP2 kann relativ einfach mittels ELISA-Technik im Blut nachgewiesen und quantifiziert werden. Es wird angenommen, dass die Menge des Gesamt-HRP2 die Gesamt-Parasitenlast widerspiegelt.<sup>9</sup>

## 1.5 Ziel der Studie

Aufgrund der Sequestrierung im Gefäßbett von Organen bleiben späte Entwicklungsstadien des *Plasmodium*-Parasiten „versteckt“ und sind in Blutaussstrichen von peripherem Blut nicht detektierbar. Die in Blutaussstrichen zählbare Parasitendichte entspricht somit nicht der wahren, für die Prognose relevanten, gesamten Parasitenlast. Schon seit Jahren wird die quantitative Schätzung der Gesamt-Parasitenlast erforscht und nach brauchbaren Biomarkern hierfür gesucht. Parasitenbestandteile, die als Biomarker in Frage kommen, müssen unabhängig von der Lokalisation des Parasiten im menschlichen Körper in Vollblut, Plasma oder Serum nachweisbar und spezifisch für den nachzuweisenden Parasiten sein. Ein vielversprechender Kandidat ist HRP2.<sup>87</sup> Dondorp *et al.* (2005) verwendeten mittels ELISA gemessenes HRP2 und konstruierten ein mathematisches Modell um die Gesamt-Parasitenlast zu berechnen. Dabei konnten sie zeigen, dass die so errechnete Parasitenlast stark mit der Krankheitsschwere im Verlauf korrelierte. Die errechnete Parasitenlast war bei den Patienten am höchsten deren Verlauf letal war.<sup>9</sup>

Es wird angenommen, dass HRP2 und die daraus errechnete Gesamt-Parasitenlast einen hohen prognostischen Wert hat. Daraus würde sich auch eine für den individuellen Patienten geeignetere Therapiewahl schon bei Erstdiagnose ableiten. Wie in 1.4. beschrieben, ist bisher wenig über die *in vivo* Kinetik des HRP2 bekannt. Insbesondere die *in vivo* Eliminationskinetik dieses Proteins wurde kaum erforscht. In der von Dondorp *et al.* durchgeführten Studie zeigte sich für HRP2 eine *in vivo* Eliminationskinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 3,67 Tagen. Diese Halbwertszeit wurde in die Modellberechnung übernommen. Zum Zeitpunkt des Designs und der Durchführung unserer Studie lagen unseres Wissens keine weiteren Veröffentlichungen hierzu vor.

Ziel der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie ist die Überprüfung der *in vivo* Eliminationskinetik des *P. falciparum* HRP2 anhand von qualitativen Messungen mittels Malaria-Schnelltests und quantitativen Messungen mittels ELISA über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Diese Messungen sollen in Relation zur lichtmikroskopisch bestimmten Parasitendichte vor Therapiebeginn gestellt und der Einfluss verschiedener Wirts- und Parasitenfaktoren auf die

Kinetik untersucht werden. Die genauere Kenntnis der *in vivo* Eliminationskinetik soll helfen, Modellberechnungen zur Gesamt-Parasitenlast genauer durchführen zu können und ggf. zu korrigieren und somit ein aussagekräftiges Werkzeug zur Prognosestellung zur Verfügung zu haben, welches eine bessere Therapieplanung ermöglicht. Außerdem soll erneut die persistierende Positivität der HRP2-nachweisenden Malaria-Schnelltests untersucht und somit auch die Eignung für die Diagnosestellung einer Malaria überprüft werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Studienort und Studienzeit

#### 2.1.1 Studienort

Die Studie wurde durch das medizinische Forschungslabor (URM = *Unité des recherches médicales*) des Albert-Schweitzer Krankenhauses in Lambaréné, Gabun, durchgeführt.



**Abb. 4: Gabun in Afrika**

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabon\\_in\\_Africa\\_\(-mini\\_map\\_rivers\).svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabon_in_Africa_(-mini_map_rivers).svg);  
public Domain; eingesehen am 11.03.2015



**Abb. 5: Gabun Karte politisch**

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabun-karte-politisch.png>;  
public Domain; eingesehen am 11.03.2015

Gabun ist ein Land in Zentralafrika, das etwa zwischen dem 2° nördlicher Breite und 4° südlicher Breite liegt und vom Äquator durchquert wird.<sup>88</sup> Im Norden wird es durch Landesgrenzen zu Äquatorialguinea und Kamerun, im Westen durch den Atlantik, im Osten und Süden durch die Republik Kongo begrenzt. Gabun besitzt eine Fläche von 267.667km<sup>2</sup>, die sich auf neun Provinzen verteilt. Der größte Teil des Landes (> 80%) ist von primärem tropischen Regenwald und Sekundärwald bedeckt, gefolgt von ca. 10.000km<sup>2</sup> Oberflächenwasser (Seen, Flüsse, Lagunen). Der größte Fluss ist der Ogooué, der bei

Port Gentil in einem weitverzweigten Delta in den Atlantik mündet. Nur ein sehr kleiner Teil des Landes ist von Savanne und Grasland bedeckt.<sup>89-92</sup> In Gabun herrscht ganzjährig ein tropisches Klima mit durchschnittlichen Temperaturen von ca. 20 - 33°C und einer jährlichen Niederschlagsmenge von 2000 - 3800mm. Es zeichnet sich durch zwei Trocken- und zwei Regenperioden aus: die sogenannte „kleine Trockenzeit“ von Mitte Dezember bis Mitte Februar, die „große Regenzeit“ von Mitte Februar bis Mitte Mai, die „große Trockenzeit“ von Mitte Mai bis Mitte September und die „kleine Regenzeit“ von Mitte September bis Mitte Dezember.<sup>91,93</sup>

Von den ca. 1,5 Mio. Einwohnern lebt fast die Hälfte in der Hauptstadt Libreville und der umgebenden Agglomeration. Die zweit- und drittgrößten Städte sind Port-Gentil (ca. 110.000 Einwohner) und Franceville (ca. 43.000 Einwohner), der Rest des Landes ist nur sehr dünn besiedelt.<sup>94</sup> Amts- und Verkehrssprache ist Französisch, daneben werden je nach Region verschiedene Bantu-Sprachen gesprochen.

Lambaréné ist die Hauptstadt der Provinz Moyen-Ogooué und hat ca. 26.000 Einwohner.<sup>95</sup> Es liegt auf dem 00° 43' südlicher Breite am Fluss Ogooué in einer Region mit vielen Seen. Die verschiedenen Stadtteile verteilen sich auf das Nord- und Südufer des Ogooué sowie auf eine große Insel, die im Fluss gelegen ist. Lambaréné ist umgeben von Regenwald. Eine asphaltierte Straße, die Nationalstraße N1, durchquert die Stadt und verbindet Lambaréné mit dem 250km entfernten Libreville sowie weiter südöstlich gelegenen Landesteilen.<sup>95,96</sup>

Das Albert-Schweitzer Krankenhaus wurde im Jahre 1913 durch den elsässischen Arzt, Philosophen, Theologen und Organisten Dr. Albert Schweitzer auf dem Gelände der evangelischen Pariser Missionsgesellschaft in Andende (einem Stadtteil des heutigen Lambaréné) am Nordufer des Ogooué gegründet. Die ursprünglichen Behandlungsräume wurden jedoch zu klein, und so fand Dr. Albert Schweitzer ein neues Gelände ca. 3km flussaufwärts, wo er ein zweites Krankenhaus baute, welches im Jahre 1927 bezogen wurde. Dr. Albert

Schweitzer starb im Jahre 1965 in Lambaréné; sein Werk wurde von verschiedenen Ärzten weitergeführt. Im Rahmen einer Krankenhausvergrößerung und -modernisierung entstanden in den Jahren 1975 - 1982 neue Gebäude; die alten Gebäude sind nun als Museum zugänglich.<sup>97,98</sup>

Das heutige Albert-Schweitzer Krankenhaus umfasst die Abteilungen für Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie und Geburtshilfe sowie Pädiatrie und unterhält eine große Poliklinik und eine Zahnklinik. Es wird kofinanziert durch die internationale Stiftung des Albert-Schweitzer Krankenhauses und den gabunischen Staat und ist ein wichtiges medizinisches Versorgungszentrum weit über die Provinzgrenzen hinaus.<sup>98</sup>

Das Forschungslabor (URM = *Unité des recherches médicales*) wurde im Jahre 1981 gegründet und steht seit dem Jahr 1992 unter der Leitung von Prof. Dr. Kreamsner, Direktor des Tropeninstituts der Universität Tübingen. 2009 waren mehr als 40 Mitarbeiter aus verschiedenen afrikanischen, europäischen und amerikanischen Ländern am URM beschäftigt. Es bestehen Kollaborationen mit verschiedenen europäischen Forschungseinrichtungen. Geforscht wird ausschließlich an Erkrankungen, die in Gabun vorkommen; besondere Schwerpunkte sind hierbei Malaria und Schistosomiasis. Auf dem Gebiet der Malaria werden u. a. in klinischen Studien neue Medikamente und Impfstoffe getestet.<sup>99,100</sup>

Es besteht eine direkte Zusammenarbeit des URM mit dem Albert-Schweitzer Krankenhaus. Das URM unterhält eine eigene Ambulanz, die zu regulären Sprechzeiten wochentags geöffnet ist. Hier stellen sich Studienteilnehmer zu geplanten Untersuchungen, aber auch im Krankheitsfall vor. Zudem stellen sich Patienten vor, die selbst vermuten, an Malaria zu leiden und kein Geld für eine Krankenhausbehandlung aufbringen können, im Wissen, dass im URM Malaria-studien laufen und eine Behandlung im Falle der Teilnahme kostenlos ist.

### 2.1.2 Studienzeit

Die Studie wurde von Januar bis März 2009 durchgeführt. Das entspricht der kurzen Trockenzeit und dem Beginn der langen Regenzeit.<sup>91,93</sup>

## 2.2 Malaria in Lambaréné

Malaria ist in Lambaréné und der gesamten Umgebung holoendemisch, d. h. Malaria tritt ganzjährig auf, mit einem Anstieg der Erkrankungen v. a. in der kleinen Regenzeit. Es kommen drei Arten von humanpathogenen Plasmodien vor: *P. falciparum*, *P. malariae* und *P. ovale*, wobei mehr als 90% der Infektionen durch *P. falciparum* verursacht werden.<sup>99,101</sup>

Als *aPfeIR* (*annual entomological inoculation rate for P. falciparum*) wird die durchschnittliche Rate an Stichen durch mit *P. falciparum* infizierte *Anopheles*-Mücken pro Person pro Jahr bezeichnet. Die *aPfeIR* beträgt in Lambaréné und Umgebung 45.<sup>101–103</sup>

Durch wiederholte Infektionen besteht bei einem Großteil der Bevölkerung eine Teilimmunität. Das führt auch dazu, dass bei vielen Menschen eine Parasitämie nachweisbar ist, ohne dass es zu Symptomen oder zum Krankheitsausbruch kommt. Kinder unter fünf Jahren haben in den meisten Fällen noch keine Teilimmunität erworben und sind stark gefährdet, auch an schweren Formen von Malaria zu erkranken.<sup>104</sup>

Der Bevölkerung ist Malaria als Krankheit bewusst. Es ist allgemein bekannt, dass Malaria eine fieberhafte Erkrankung hervorrufen kann und Malaria häufig die Ursache von Fieber darstellt. Aufgrund dieses Bewusstseins wird Fieber häufig mit Malaria gleichgesetzt. In der Umgangssprache wird sogar für „Fieber“ das Wort „palu“ verwendet, welches eine Abkürzung von „paludisme“ ist, das französische Wort für Malaria. Häufig führt dies bei Fieber zu einer Selbstbehandlung mit Antimalaria-Medikamenten, die in der Apotheke frei verkäuflich sind, ohne dass eine Malariainfektion nachgewiesen ist.

## 2.3 Studiendesign

### 2.3.1 Ethik und Studienprotokoll

Die vorliegende Arbeit analysiert Daten zur *in vivo* Kinetik des *Plasmodium falciparum* HRP2, welche im Rahmen der Studie „Time dependent decrease of

*Plasmodium falciparum* assessed by thick smear, rapid test and real-time PCR after Artemisinin Combination Therapy (ACT)“ gewonnen wurden. Im Rahmen der Studie wurden die gewonnenen Proben auch mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (rtPCR = *real-time polymerase chain reaction*) untersucht; die Auswertung der auf diese Weise gewonnenen Daten ist nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Vor Beginn der Studie wurde das Studienprotokoll sowie zugehörige Dokumente (Informationsblatt, Einverständniserklärung etc.) durch das zuständige Regionale Unabhängige Ethikkomitee von Lambaréné (CERIL = *Comité d’Ethique Régional Indépendant de Lambaréné*) geprüft und autorisiert. Die Studie wurde entsprechend dem Studienprotokoll und nach den Leitsätzen der Deklaration von Helsinki und der „guten klinischen Praxis“ (GCP = *Good Clinical Practice*) durchgeführt.<sup>105,106</sup>

### 2.3.2 Studienpopulation

Die Studie wurde an Kindern und Jugendlichen im Alter von sechs Monaten bis 25 Jahren mit unkomplizierter Malaria tropica durchgeführt. Die Altersbeschränkung ergab sich aus der Tatsache, dass eine Beobachtungsphase mit mehreren *Follow-up* Besuchen während eines Zeitraumes von einem Monat geplant war. Solch ein regelmäßiges *Follow-up* ist bei erwachsenen Patienten in Gabun, v. a. in ländlichen Gegenden, äußerst schwierig, da Erwachsene sich tagsüber oft auf den Plantagen im Wald aufhalten oder auf Jagd sind und somit nicht zuhause anzutreffen. Kinder halten sich dagegen in der Regel im nahen Wohnumfeld auf, da eine Schulpflicht besteht, die in den allermeisten Fällen auch eingehalten wird. Somit sind diese in der Mittagspause oder nach der Schulzeit leicht auffindbar. Auch an Wochenenden werden Kinder in den meisten Fällen nicht in den Wald bzw. auf die Plantagen mitgenommen, sondern zuhause durch Mütter oder Großmütter betreut. Kinder unter einem Alter von sechs Monaten wurden von der Studie ausgeschlossen, da davon auszugehen ist, dass sie noch zu viele mütterliche Antikörper und zirkulierendes Hämoglobin F haben, was wahrscheinlich eine Auswirkung auf die Elimina-

tionskinetik gehabt und somit das Studienergebnis möglicherweise verfälscht hätte.<sup>107</sup> Außerdem sollten im Laufe der Studie elf Kapillarblutentnahmen aus der Fingerbeere durchgeführt werden, was jungen Säuglingen nicht zuzumuten gewesen wäre.

Die Anzahl der Studienteilnehmer wurde im Protokoll auf 50 festgesetzt, da zu erwarten war, dass nach einem geschätzten Abzug von ca. 20% von *lost-to-follow-up*-Patienten mit der verbleibenden Anzahl an Studienteilnehmern schon statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen seien. Eine höhere Anzahl wäre bei pädiatrischen Patienten nicht zu rechtfertigen gewesen.

### 2.3.3 Screening und Einschluss in die Studie

Für die Studie wurden in Lambaréné und den umgebenden Dörfern (bis zu ca. 40km von Lambaréné entfernt) Kinder und Jugendliche im entsprechenden Alter auf Malaria gescreent, die unter akutem Fieber litten (Angabe des Patienten oder des Erziehungsberechtigten) oder anamnestisch Fieber in den vergangenen 48 Stunden angaben. Es wurden Patienten gescreent, die sich im Forschungslabor des Albert-Schweitzer Krankenhauses vorstellten; zudem wurden die Dörfer in der Umgebung besucht und gezielt nach Kindern und Jugendlichen mit Fieber gefragt. Das Screening erfolgte per dickem Tropfen nach der Lambaréné-Methode<sup>51</sup> aus Kapillarblut der Fingerbeere. Wurde lichtmikroskopisch im dicken Tropfen eine *Plasmodium falciparum* Infektion mit einer Parasitämie von 300 - 250.000 *P.f.*/µl nachgewiesen und lagen keine Ausschlusskriterien (siehe unten) vor, so wurde die Teilnahme an der Studie angeboten. Bei klinischen Zeichen schwerer Malaria, einer Parasitämie, die 250.000 *P.f.*/µl überschritt, oder dem klinischen Verdacht auf eine andere Krankheit wurden die Patienten an die Pädiatrie oder Innere Abteilung des Albert-Schweitzer Krankenhauses verwiesen. Patienten und/oder Erziehungsberechtigte wurden über das Ziel und den Ablauf der Studie sowie mögliche Vor- oder Nachteile durch die Teilnahme an der Studie aufgeklärt und erhielten eine Kopie der Einverständniserklärung mit Informationen zur Studie in französischer Sprache. Es wurde das schriftliche Einverständnis des Patienten

und/oder des Erziehungsberechtigten eingeholt. Waren die Patienten und/oder Erziehungsberechtigten Analphabeten oder der französischen Sprache nicht mächtig, so wurde die Aufklärung im Beisein eines Zeugen/Dolmetschers geführt, der der französischen Sprache in Wort und Schrift mächtig war. Das Einverständnis zur Studienteilnahme erfolgte in diesem Falle durch den Patienten/Erziehungsberechtigten mündlich und wurde mittels Fingerabdruck auf der Einverständniserklärung bestätigt. Der Zeuge unterschrieb die Einverständniserklärung mit Namen. Der Mitarbeiter, der über die Studie aufgeklärt hatte, unterschrieb die Einverständniserklärung ebenfalls.

Es bestanden die folgenden Einschlusskriterien:

- Alter des Patienten zwischen sechs Monaten und 25 Jahren,
- Angabe von akutem Fieber oder anamnestisch Fieber in den vergangenen 48 Stunden,
- Lichtmikroskopischer Nachweis von *Plasmodium falciparum* mit einer Parasitämie von 300 - 250.000 *P.f.*/µl (dicker Tropfen, Lambaréné-Methode<sup>51</sup>),
- Individuell dokumentierte Einverständniserklärung.

Es bestanden die folgenden Ausschlusskriterien:

- Klinische Zeichen und Symptome von schwerer Malaria, in Anlehnung an die WHO-Kriterien (siehe unten),
- Gemischte Infektion mit anderen Plasmodien-Spezies,
- Teilnahme an einer Malaria-Impfstudie,
- Antimalaria-Therapie in den letzten 28 Tagen, laut Angabe des Patienten und/oder Erziehungsberechtigten.

WHO-Kriterien von schwerer Malaria (klinische Zeichen), Vorliegen von einem Kriterium genügt<sup>46</sup>:

Bewusstseinsstörung oder Koma; Prostration (d. h. allgemeine Schwäche, so dass der Patient nicht im Stande ist, selbständig zu laufen oder zu sitzen); Unmöglichkeit der oralen Nahrungsaufnahme; wiederholte Konvulsionen ( > 2

Anfälle in 24 Stunden); Atemnot, azidotische Atmung; Kreislaufkollaps oder Schock (systolischer Blutdruck < 70mmHg bei Erwachsenen/ < 50mmHg bei Kindern); Ikterus plus andere Anzeichen für Dysfunktion von vitalen Organen; Makrohämaturie; abnormale spontane Blutungen; Lungenödem.

Die Studienpatienten erhielten eine medikamentöse orale Kombinationstherapie mit Coarsucam® (siehe 2.3.5). Auch bei Nichtteilnahme an der Studie und nachgewiesener unkomplizierter Malaria wurde eine kostenlose orale Behandlung angeboten. Die Patienten und/oder Erziehungsberechtigten hatten jederzeit während der Studie die Möglichkeit, ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückzuziehen, ohne daraus negative Folgen zu erwarten.

#### 2.3.4 Einschluss und *Follow-up* Besuche, Probengewinnung

Es wurden insgesamt elf Besuche, davon neun *Follow-up* Besuche, durchgeführt, die im Weiteren näher erläutert werden:

1. Screening
2. Tag 0: Einschluss in die Studie, erste Dosis Coarsucam®
3. Tag 1: 1. *Follow up*, zweite Dosis Coarsucam®
4. Tag 2: 2. *Follow-up*, dritte Dosis Coarsucam®
5. Tag 3: 3. *Follow-up*
6. Tag 5: 4. *Follow-up*
7. Tag 7: 5. *Follow-up*
8. Tag 12: 6. *Follow-up*
9. Tag 17: 7. *Follow-up*
10. Tag 22: 8. *Follow-up*
11. Tag 28: 9. *Follow-up*

Tag 0:

Waren alle Einschlusskriterien erfüllt und lagen keine Ausschlusskriterien vor, so wurde eine Patienten-Identifikationsnummer (fortlaufende Nummern) vergeben und alle folgenden Daten anonymisiert notiert. Es wurden folgende

demographische Daten erhoben: Alter, Geburtsdatum (falls bekannt), Geschlecht. Die anamnestische Angabe der Fiebertage wurde notiert. Die Patienten wurden komplett körperlich untersucht und Größe (m), Gewicht (kg) und axilläre Temperatur (°C) bestimmt. Das etwaige Vorliegen einer Splenomegalie wurde explizit notiert sowie alle pathologischen Befunde.

Nach vorhergehender Desinfektion mit einem gängigen alkoholhaltigen Hautdesinfektionsmittel wurde die Fingerbeere eines Fingers mittels Lanzette (Unistik® 2 normal, Owen Mumford GmbH, Großostheim, Deutschland) punktiert. Es wurden 10µl Kapillarblut mittels einer Pipette aufgenommen und auf einen Objektträger aufgebracht. Die 10µl Blut wurden mit der Pipettenspitze auf einem Feld von 10 x 18mm möglichst gleichmäßig verstrichen. Das Feld war auf einer Karte aufgezeichnet, die unter den Objektträger gelegt wurde und somit als Schablone diente. Der Objektträger wurde flach auf eine ebene Fläche gelegt, damit das Blut lufttrocknen konnte, und mit der Patienten-Identifikationsnummer beschriftet. Im Anschluss wurde mit einem EDTA-Kapillarröhrchen 150µl Blut aufgenommen und direkt in ein EDTA-Probengefäß mit festverschließbarem Deckel geführt (Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht, Deutschland). Das verschlossene Gefäß wurde leicht geschwenkt, um eine Durchmischung mit dem EDTA zu gewährleisten. Das Probengefäß wurde mit der Patienten-Identifikationsnummer versehen und für den weiteren Transport ins Labor auf Eis gelegt.

Der Patient erhielt nach der Blutentnahme die erste Dosis Coarsucam® entsprechend seinem Alter oder Gewicht (siehe 2.3.5). Die korrekte Einnahme wurde dem Patienten bzw. der betreuenden Person erläutert und gezeigt (z. B. Auflösen der Tablette in Wasser), die erste Einnahme erfolgte unter Beobachtung. Es wurde der Blister mit der gesamten Medikation ausgehändigt und dem Patienten die Uhrzeit der nächsten Einnahme genannt. Gegebenenfalls bestehende Begleiterkrankungen wurden gemäß Leitlinien behandelt.

Tag 1:

Alle weiteren Besuche wurden als Hausbesuche durchgeführt. Die Patienten und/oder betreuenden Personen wurden nach ihrem Befinden sowie nach

Fieber oder Auffälligkeiten befragt. Es wurde eine komplette körperliche Untersuchung durchgeführt und pathologische Befunde notiert. War die Einnahmezeit des Medikamentes für diesen Tag bereits verstrichen, so wurden die Patienten nach der korrekten Einnahme und Einnahmezeit befragt. Bei Versäumnis wurde die Einnahme unter Beobachtung nachgeholt. Die Einnahmezeit wurde notiert. Wie an Tag 0 wurde Kapillarblut für einen dicken Tropfen und in ein EDTA-Probengefäß gewonnen. Den Patienten wurde die Einnahmezeit des Medikamentes für den nächsten Tag genannt.

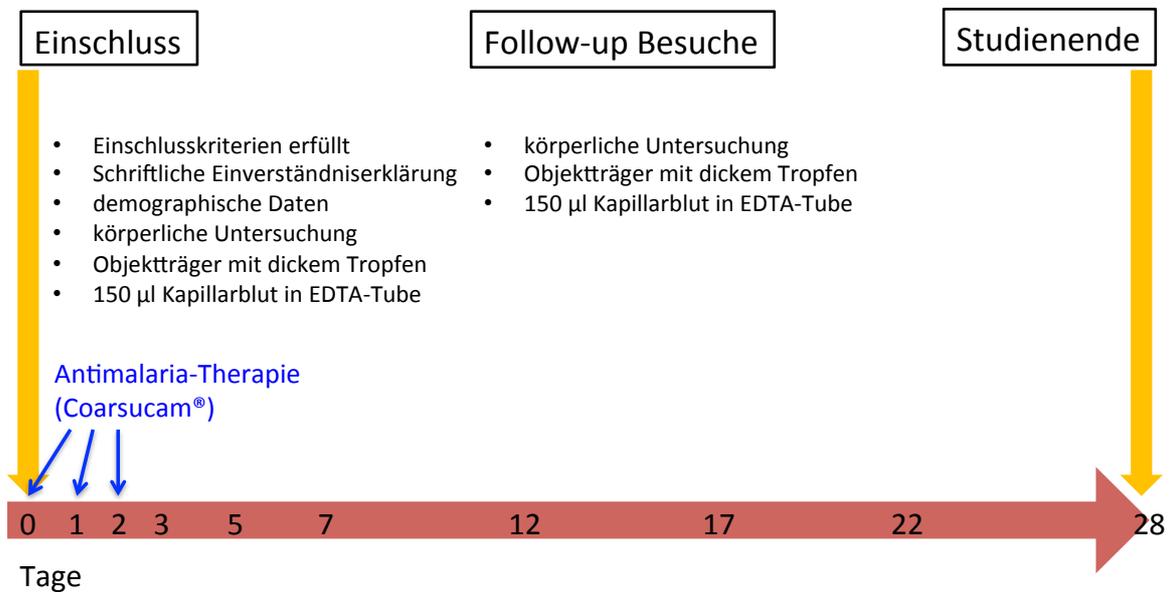
Tag 2:

Der Hausbesuch gestaltete sich entsprechend Tag 1. Es wurde betont, dass keine weitere Medikamenteneinnahme nötig sei, außer im Falle einer Begleiterkrankung die von einem Studienmitarbeiter hierfür erhaltene Medikation.

Tag 3 - 28:

Die Hausbesuche bestanden aus einer Befragung zum Befinden, Fieber oder Auffälligkeiten sowie einer körperlichen Untersuchung. Pathologische Befunde wurden notiert, Begleiterkrankungen ggf. behandelt. Die Kapillarblutentnahme und Probengewinnung erfolgte wie oben geschildert. Den Patienten wurde jeweils der nächste Termin eines Hausbesuches genannt. Sollte in der Zwischenzeit eine Verschlechterung des Zustandes auftreten, so war das Studienteam jederzeit telefonisch erreichbar und auch eine Vorstellung im URM war jederzeit möglich. Den Patienten/betreuenden Personen wurde zugesichert, dass sie in diesem Falle das Fahrtgeld zurückgezahlt bekommen würden.

Folgende Abbildung 6 soll den Ablauf der Studie verdeutlichen:



### Abb. 6: Ablauf der Studie

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Studie für den einzelnen Patienten. Auf der horizontalen Achse (roter Pfeil) sind die Zeitpunkte, zu denen *Follow-up* Besuche stattfanden, eingetragen. Beginn und Ende der Studie sind mit gelben Pfeilen markiert. Die Studienmedikation wurde an den drei ersten Tagen gegeben (blaue Pfeile). Vorgaben, erhobene Daten und Untersuchungen zu den verschiedenen Zeitpunkten sind stichwortartig aufgelistet.

µl = Mikroliter; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure.

### 2.3.5 Studienmedikation Coarsucam®

Coarsucam® ist ein Antimalaria-Medikament der Firma Sanofi-Aventis, das der Klasse der Artemisinin-Kombinationstherapeutika (ACTs = *Artemisinin-based combination therapies*) zugehörig ist. Es besteht aus den Einzelsubstanzen Artesunat (AS) und Amodiaquin (AQ). Coarsucam® ist zugelassen für die orale Therapie der unkomplizierten *Malaria tropica* für Kinder ab zwei Monaten und für die orale Vervollständigung der Therapie nach parenteraler Therapie bei komplizierter *Malaria tropica*.

Eine Artesunat/Amodiaquin-Kombinationstherapie hat eine Wirksamkeit von 92 - 98,2% mit einer 100%igen Parasiten-*Clearance* (asexuelle Stadien) innerhalb

von drei Tagen. Es wirkt auch gametozid mit einer Reduktion der Gametozytämie auf unter 1% nach 21 Tagen.<sup>108–112</sup>

Coarsucam® wird in einem Blister vertrieben, der je eine komplette Behandlung für eine Person beinhaltet. Es ist erhältlich in vier verschiedenen Dosisstärken angepasst an das Alter/Gewicht: Säuglinge, Kleinkinder, Kinder sowie Jugendliche und Erwachsene. Sollte für einen Patienten die empfohlene Dosisstärke bezüglich Alter und Gewicht nicht übereinstimmen, so sollte entsprechend des Gewichtes dosiert werden, falls dieses bekannt ist. Die Dosierungen der einzelnen Blister sind ersichtlich in folgender Tabelle:

**Tabelle 1: Dosis und Einnahmeschemata von Coarsucam®**

d = Tag; kg = Kilogramm; KG = Körpergewicht; mg = Milligramm; AS = Artesunat; AQ = Amodiaquin.

	Alter/Gewicht	Dosis pro Tablette	Einnahmeschema		
			d1	d2	d3
Säuglinge	2 - 11 Monate / 4,5 - < 9kg KG	25mg AS / 67,5mg AQ	1	1	1
Kleinkinder	1 - 5 Jahre / 9 - < 18kg KG	50mg AS / 135mg AQ	1	1	1
Kinder	6 - 13 Jahre / 18 - < 36kg KG	100mg AS / 270mg AQ	1	1	1
Jugendliche und Erwachsene	≥ 14 Jahren / ≥ 36kg KG	100mg AS / 270mg AQ	2	2	2

Die Blister in den Dosisstärken für Säuglinge, Kleinkinder und Kinder enthalten demnach drei Tabletten, von denen einmal täglich eine Tablette über einen Zeitraum von drei aufeinanderfolgenden Tagen eingenommen wird. Der Blister in der Dosisstärke für Jugendliche und Erwachsene enthält sechs Tabletten, von denen einmal täglich zwei Tabletten über einen Zeitraum von drei aufeinanderfolgenden Tagen eingenommen werden. Die vier verschiedenen Dosisstärken-Blister sind farblich unterschiedlich markiert, so dass das Risiko einer Verwechslung minimiert wird. Auf dem Blister ist die Weise, in der das Medikament einzunehmen ist, sehr vereinfacht und bildlich dargestellt, so dass auch

die korrekte Einnahme durch Analphabeten gewährleistet ist. Das Medikament ist wasserlöslich und demnach auch Kindern hervorragend zu verabreichen.

Seit 2003 gilt die Artesunat/Amodiaquin-Kombinationstherapie in Gabun als *first-line* Therapie von Malaria.<sup>113,114</sup>

Nach oraler Gabe wird Artesunat schnell absorbiert und zur aktiven Form Dihydroartemisinin metabolisiert. Es erreicht seine maximale Wirkkonzentration innerhalb von einer Stunde, die Eliminationshalbwertszeit liegt bei 0,36 – 1,2 Stunden.<sup>115,116</sup> Amodiaquin Hydrochlorid wird nach oraler Gabe schnell absorbiert und zu seiner aktiven Form Desethylamodiaquin metabolisiert. Amodiaquin hat eine Eliminationshalbwertszeit von ca. fünf Stunden, während jene von Desethylamodiaquin 6 - 18 Tage beträgt.<sup>116,117</sup> Die Artesunat/Amodiaquin-Kombinationstherapie zeigte in Studien ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften wie die Einzelsubstanzen.<sup>46,116</sup>

## 2.4 Laboranalysen

### 2.4.1 Lichtmikroskopie

Die Anfertigung der dicken Tropfen erfolgte wie im Kapitel 2.3.4 beschrieben aus Kapillarblut der Fingerbeere direkt beim Patienten. Nach Lufttrocknung erfolgte ggf. der Transport ins Labor in bruchsicheren Objektträger-Transportboxen. Die Objektträger wurden dann in einer 20% Giemsa-Lösung (Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), die zwei bis drei mal täglich neu mit Pufferlösung nach Weise (pH 7,20, 1.09879 Titrisol für 1000ml, (H<sub>2</sub>O dest.), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angesetzt und gefiltert wurde, 30 Minuten lang gefärbt und danach im Trockenschrank (Melag, Typ 405; 55°C) getrocknet.

Die dicken Tropfen wurden auf Standard-Durchlichtmikroskopen (Olympus CH30 und Nikon Eclipse E200) mit Immersionsöl bei einer 1000-fachen Vergrößerung nach Lambaréné-Methode ausgelesen.<sup>51</sup> Die Parasitämie ist definiert als die Anzahl der asexuellen *P. falciparum*-Ringformen (*P.f.*) pro Mikroliter und wird im Folgenden als *P.f.*/µl angegeben.

Zur Bestimmung der Parasitämie nach Lambaréné-Methode werden für Parasitämien von  $\geq 50$  P.f./Feld 20 Mikroskopier-Blickfelder ausgelesen, für Parasitämien von  $\leq 5$  P.f./Feld 100 Blickfelder und für Parasitämien von 5 - 50 P.f./Feld 30 Blickfelder. Wenn nach Auslesen von 100 Blickfeldern kein Parasit gefunden wurde, so gilt der dicke Tropfen als negativ. Die Parasitämie als P.f./ $\mu$ l wird dann mittels eines Multiplikationsfaktors errechnet, der für jede Art von Mikroskop bestimmt werden muss (Festgröße) und von der Größe des Blickfeldes und der Vergrößerung abhängig ist.<sup>51</sup>

Die Lesung und Auszählung erfolgte unabhängig voneinander durch zwei erfahrene Mikroskopisten. Es wurde der arithmetische Mittelwert der zwei Lesungen errechnet. Differierte das Ergebnis der zwei Lesungen um mehr als 25% (niedrigerer Wert/höherer Wert  $< 0,75$ ), so wurde eine unabhängige Drittlésung durch einen weiteren erfahrenen Mikroskopisten durchgeführt und das arithmetische Mittel der zwei Werte, die prozentual weniger voneinander abwichen, ermittelt.

Entsprechend der oben geschilderten Methode wurden von jedem Präparat die Anzahl der Gametozyten bestimmt. An Tag 0 wurde zusätzlich die Anzahl der pigmentierten Monozyten bestimmt.

#### 2.4.2 Malaria-Schnelltests

Die ProbengefäÙe mit dem EDTA-Kapillarblut wurden wie in 2.3.4 geschildert auf Eis ins Labor transportiert. Nach Eintreffen im Labor wurden aus jeder Probe zwei verschiedene Malaria-Schnelltests (RDTs) nach Anleitung des jeweiligen Herstellers angefertigt. Malaria-Schnelltests sind *in vitro* immunchromatographische Tests für die qualitative Bestimmung von *Plasmodium*-Antigenen. Es wurden der Paracheck®Pf-Schnelltest (Orchid Biomedical Systems, Verna, Indien) und der BinaxNOW®Malaria-Schnelltest (Binax Inc., Inverness Medical, Scarborough, Maine, USA) verwendet.

Der Paracheck®Pf-Schnelltest bestimmt das *P. falciparum histidine-rich protein 2* (HRP2) und ist spezifisch für *P. falciparum*. Bei vorhandenem HRP2-Antigen erscheint in einem Testfeld eine farbige Bande. Ein Kontrollfeld zeigt eine farbige Bande an bei validem Test. Zeigen nun beide Felder eine farbige Bande, so liegt eine Infektion mit *P. falciparum* vor. Zeigt nur das Kontrollfeld eine farbige Bande, so liegt keine Infektion mit *P. falciparum* vor. Der Test ist invalide, wenn keine Bande im Kontrollfeld erscheint. Der Hersteller gibt zur Erkennung von *P. falciparum* eine Sensitivität von > 95% bei einer Spezifität von > 98% an.<sup>118</sup> Verschiedene klinische Studien zeigten eine Sensitivität von 82 - 99,4% und eine Spezifität von 76 - 96,8% bei Parasitämien von > 200 *P.f./μl*.<sup>83,119-121</sup>

Der BinaxNOW®Malaria-Schnelltest bestimmt in einem ersten Testfeld (T1) HRP2, in einem zweiten Testfeld (T2) das pan-spezifische *Plasmodium*-Antigen Aldolase, das den vier häufigsten humanpathogenen *Plasmodium*-Arten gemeinsam ist (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae*). Ein drittes Feld (C) zeigt eine Kontrollbande und somit ein valides Testergebnis an. Erscheint eine farbige Bande in C und T1, so liegt eine Infektion mit *P. falciparum* vor. Sind farbige Banden in C, T1 und T2 sichtbar, so liegt entweder eine Monoinfektion mit *P. falciparum* oder eine Mischinfektion mit *P. falciparum* und mindestens einer anderen *Plasmodium*-Art vor. Erscheinen farbige Banden nur in C und T2 so liegt eine Infektion mit *P. ovale*, *P. vivax* und/oder *P. malariae* vor. Zeigt nur C eine farbige Bande, so liegt keine Infektion mit *Plasmodium* vor. Bei fehlender Bande in C ist das Testergebnis ungültig.

Die Sensitivität ist abhängig von der Parasitämie. Der Hersteller gibt zur Erkennung von *P. falciparum* eine Sensitivität zwischen 53,9% (< 100 *P.f./μl*) und 99,7% (> 5000 *P.f./μl*) an. Die Spezifität für *P. falciparum* liegt laut Hersteller bei 94,2%. Der Hersteller gibt somit eine klinische Erkennungsgrenze (LOD = *limit of detection*), definiert als der Parasitämiespiegel in infiziertem Blut, der 95% positive Testergebnisse erzeugt, von 1001 - 1500 Parasiten/μl für *P. falciparum* an.<sup>122</sup> Die Spezifität, Sensitivität und LOD zur Erkennung anderer

*Plasmodium*-Arten soll hier außer Acht gelassen werden, da Mischinfektionen von der Studie ausgeschlossen waren.

Alle RDTs wurden mit der jeweiligen Patienten-Identifikationsnummer beschriftet und das Resultat 15 Minuten nach Zugabe der Pufferlösung abgelesen und notiert. Das Ergebnis des Paracheck®Pf-Schnelltest wurde notiert als positiv oder negativ. Das Ergebnis des BinaxNOW®Malaria-Schnelltest wurde notiert als T1 positiv oder negativ und als T2 positiv oder negativ. Bei ungültigem Testergebnis wurde der Test wiederholt. Nach Entnahme des Blutes für die RDTs wurde das restliche Blut im Probengefäß bei -80°C für weitere Analysen aufbewahrt.

#### 2.4.3 ELISA

Zusätzlich zur qualitativen Bestimmung von HRP2 in den Blutproben wurde eine quantitative Messung mittels *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) durchgeführt. Es wurde ein zweiseitiger Sandwich-ELISA verwendet nach einem leicht adaptierten Protokoll von Noedl *et al.*<sup>123</sup>

Dafür wurden 96-well hoch-bindende Mikrotiterplatten (Microton 600, high-binding, F-Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 100µl/well monoklonalen Anti-PfHRP2-IgM-Antikörpern (MPFM-55A, Immunology Consultants Laboratories, Inc., Newberg, OR, USA) in einer Verdünnung von 1µg/ml in phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS = *phosphate buffered saline*) als Fängerantikörper über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Es folgte ein Blockierungsschritt mit 200µl/well einer Blockierungslösung aus PBS/2% bovinem Serumalbumin (BSA = *bovine serum albumine*). Die wells wurden dreimalig mit 200µl/well einer Waschlösung aus PBS/0,05%Tween20 gewaschen. Die Mikrotiterplatten wurden direkt weiterverwendet oder bis zur weiteren Verwendung versiegelt und bei -20°C aufbewahrt.

Die Blutproben wurden durch zwei Einfrier-/Auftauzyklen (*freeze-thawing*) hämolysiert. Von jeder Probe wurden Serienverdünnungen mit *Aqua dest.* (1:50, 1:100 und 1:200) hergestellt und je 50µl/well dieser Serienverdünnungen

in zweifacher Ausführung für eine Stunde inkubiert. Für jede Platte wurde eine Standardkurve mit Serienverdünnungen einer vorhandenen *P. falciparum*-Kultur mit 2% Parasitämie/5% Hämatokrit etabliert (Verdünnungen 1:4 bis 1:4096). Es folgte ein Waschschrift mit dreimaligem Waschen mit o. g. Waschlösung. Als nächstes wurden 100µl/well Meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-PfHRP2-IgG-Antikörper (MPFG-55P, Immunology Consultants Laboratories, Inc., Newberg, OR, USA) in einer Verdünnung von 0,2µg/ml mit PBS/2%BSA/1%Tween20 als Indikatorantikörper hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert; danach wiederum dreimaliges Waschen mit o. g. Waschlösung. 100µl/well von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Chromogen (Zymed Lab. Inc., San Francisco, CA, USA) wurden hinzugefügt und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor die Reaktion mit 50µl/well 1M Schwefelsäure gestoppt wurde. Die Absorption wurde bei 450nm im ELISA-reader (Asys Expert 96, anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) gemessen. Die Ergebnisse wurden als arbiträre Einheiten angegeben in Relation zur Probe der unverdünnten Parasitenkultur.

## 2.5 Datenmanagement und statistische Auswertung

Die klinischen Befunde jedes Patienten sowie die Ergebnisse der Laboranalysen wurden in standardisierten Patientenbögen auf Papier eingetragen. Dies geschah in anonymisierter Form: Jedem Patienten wurde eine Identifikationsnummer (fortlaufende Nummern) zugewiesen, die sowohl auf den Papierbögen als auch auf den Proben (EDTA-Röhrchen, Schnelltests usw.) notiert wurden. Die Papierbögen werden im Archiv des URM in Lambaréné verwahrt.

Alle Befunde und Testergebnisse wurden von einem Labormitarbeiter in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Richtigkeit wurde von einem weiteren unabhängigen Mitarbeiter geprüft.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel (Microsoft® Excel® für Mac 2011, Version 14.4.7), SPSS (IMB® SPSS® Statistics 2011, Version 20) und R (Version 3.1.2).

Deskriptive Statistik wurde angewendet, um demographische Merkmale der Studienpopulation und die Befunde und Testergebnisse bei Einschluss in die Studie sowie in der Beobachtungsphase zu beschreiben. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich bei Mittelwertangaben um den arithmetischen Mittelwert.

Um zu überprüfen, ob die vorliegenden Daten normalverteilt sind, wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test und zusätzlich, aufgrund der kleinen Stichprobengröße, der Shapiro-Wilk-Test angewandt.<sup>124</sup> Zeigte sich in einem der Tests keine Normalverteilung, so wurden zur Analyse der entsprechenden Daten nichtparametrische Tests angewandt. Mittelwerte wurden mittels t-Test oder - im Fall von nicht normalverteilten Daten - mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Korrelationen und entsprechende p-Werte basieren auf Spearmans-Rangkorrelationskoeffizienten.

Um Aussagen zur persistierenden Positivität der RDTs zu treffen wurde eine Ereigniszeitanalyse durchgeführt, wobei die persistierende Positivität als „Überlebenszeit“ betrachtet wurde. Da es sich hier um rechts-zensierte Daten handelt, wurden Überlebenszeiten mittels Kaplan-Meier-Schätzer geschätzt; Cox-Regression wurde zur Modellierung der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von Variablen von Interesse angewandt. Die Werte der Anfangsparasitämie wurden für die Cox-Regression logarithmiert.

Die HRP2-Eliminationskinetik wurde für jeden Patienten mithilfe einer Näherungskurve aus den HRP2-Einzelmessungen in Excel dargestellt und die HRP2-Eliminationshalbwertszeit aus der zugehörigen Formel berechnet. Die Analyse der Variablen, die einen Einfluss auf die HRP2-Eliminationshalbwertszeit haben, ist rein explorativ.

Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

---

## 3 Ergebnisse

---

### 3.1 Patientencharakteristika bei Einschluss in die Studie

#### 3.1.1 Studienpopulation, demographische Merkmale

Es wurden 27 Patienten im Alter von 1,2 bis 23,3 Jahren in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter betrug 8,6 Jahre (SD: 5,6 Jahre). Davon waren 19 männliche (70,4%) und 8 weibliche (29,6%) Patienten. Die Patienten hatten ein medianes Gewicht von 21,7kg (Spannweite: 8,6 - 68,5kg) und eine mediane Größe von 1,22m (Spannweite: 0,71 - 1,78m).

#### 3.1.2 Befunde und Testergebnisse an Tag 0

Bei Einschluss in die Studie an Tag 0 litten die Patienten im Mittel seit 3,3 Tagen an Fieber (SD: 2,8 Tage). Ein Erziehungsberechtigter eines Patienten gab 14 Fiebertage an. Bei vier Patienten (14,8%) bestand eine Splenomegalie. Bei zwei Patienten bestanden Begleiterkrankungen. Ein Patient litt unter einem Harnwegsinfekt und einer Mittelohrentzündung, welche mit Amoxicillin behandelt wurden. Ein Patient hatte ein Panaritium, welches chirurgisch drainiert wurde.

Im Blutausstrich fanden sich bei acht Patienten (29,6%) Gametozyten bei einer medianen Gametozytämie von 60 Gametozyten/ $\mu$ l (Spannweite: 7 - 1890). Bei 22 Patienten (81,5%) fanden sich pigmentierte Monozyten im Blutausstrich. Bei diesen Patienten betrug der Anteil pigmentierter Monozyten im Mittel 5,5% (SD: 5%; Spannweite: 1,5 - 22,4%; IQR: 2,5 - 5,9%).

Die Patienten hatten eine mediane Anfangsparasitämie von 33.435 *P.f.*/ $\mu$ l (Spannweite: 449 - 508.200 *P.f.*/ $\mu$ l). Ein Einschlusskriterium in die Studie war eine Parasitämie im Screening-Blutausstrich von 300 - 250.000 *P.f.*/ $\mu$ l. Es war zugelassen, dass sich im nachfolgend durchgeführten Blutausstrich bei Einschluss in die Studie durchaus eine höhere/niedrigere Parasitämie zeigte. Alle

Patienten zeigten in der Lichtmikroskopie des Blutausstriches eine Monoinfektion mit *P. falciparum*, die in der 18s-RNA-Gen-PCR bestätigt wurde.

Die Testergebnisse der HRP2-detektierenden Schnelltests (Paracheck®Pf und T1-Bande des BinaxNOW®Malaria) fielen bei allen Patienten positiv aus. Die Aldolase-detektierende T2-Bande des BinaxNOW®Malaria-Schnelltests zeigte bei 23 Patienten (85,2%) ein positives Ergebnis. Die Patienten, die ein positives Testergebnis in der T2-Bande erzielten, hatten eine signifikant höhere mittlere Anfangsparasitämie als die Patienten, die ein negatives Testergebnis erzielten (88.677 *P.f.*/μl vs. 2267 *P.f.*/μl;  $p < 0,005$ ).

Das im ELISA gemessene Anfangs-HRP2 konnte bei 24 Patienten bestimmt werden und zeigte Werte zwischen 0,05 und 33,59 AU bei einem Median von 3,15 AU (IQR: 1,02 - 5,57 AU).

Die ermittelten Werte sind in nachfolgender Tabelle 2 zusammengefasst.

---

**Tabelle 2: Patientencharakteristika bei Einschluss in die Studie**<sup>a</sup> nur bei Gametozyten im Blutaussstrich: 8/27; <sup>b</sup> nur bei Monozyten im Blutaussstrich: 22/27;<sup>c</sup> drei fehlende Werte: 24/27. n = Anzahl; SD = Standardabweichung; kg = Kilogramm; m = Meter; µl = Mikroliter; *P.f.* = *Plasmodium falciparum*; BinaxT1 = T1-Bande des BinaxNOW®Malaria-Schnelltests; BinaxT2 = T2-Bande des BinaxNOW®Malaria-Schnelltests; HRP2 = *histidine-rich protein 2*; AU = arbiträre Einheiten.

		Studienteilnehmer (n = 27)
Geschlecht	weiblich n (%)	8 (29,6)
	männlich n (%)	19 (70,4)
Alter (Jahre)	Mittelwert (SD)	8,6 (5,6)
	Median (Spannweite)	7,5 (1,2 - 23,3)
Gewicht (kg)	Mittelwert (SD)	28,4 (18,3)
	Median (Spannweite)	21,7 (8,6 - 68,5)
Größe (m)	Mittelwert (SD)	1,24 (0,31)
	Median (Spannweite)	1,22 (0,71 - 1,78)
Fieber (Tage)	Median (Spannweite)	2 (1 - 14)
Splenomegalie	n (%)	4 (14,8)
<i>P.f.</i> Parasitämie (asexuelle Formen/µl)	Median (Spannweite)	33.435 (449 – 508.200)
<i>P.f.</i> Gametozyten im Blutaussstrich	n (%)	8 (29,6)
<i>P.f.</i> Gametozyten (Anzahl/µl)	Median (Spannweite)	60 (7 - 1890) <sup>a</sup>
Anteil pigmentierter Monozyten (%)	Mittelwert (SD)	5,5 (5) <sup>b</sup>
positiver Paracheck®Pf	n (%)	27 (100)
positiver BinaxT1	n (%)	27 (100)
positiver BinaxT2	n (%)	23 (85,2)
HRP2 (AU)	Median (Spannweite)	3,15 (0,05 - 33,59) <sup>c</sup>

Die Höhe der Anfangsparasitämie war unabhängig von Geschlecht, Alter oder der Anzahl der Fiebertage, noch gab es Unterschiede bei Patienten mit oder ohne Splenomegalie. Es konnte keine Korrelation der Anfangsparasitämie mit dem Vorhandensein von Gametozyten oder der Höhe der Gametozytämie an Tag 0 oder dem Anteil an pigmentierten Monozyten gefunden werden (siehe Tabelle 3).

Die Höhe des Anfangs-HRP2-Wertes war unabhängig von Geschlecht und Alter und unterschied sich nicht bei Patienten mit oder ohne Splenomegalie. Es bestand keine Korrelation des Anfangs-HRP2-Wertes mit der Anzahl der Fiebertage, dem Vorhandensein von Gametozyten oder der Höhe der Gametozytämie an Tag 0 (siehe Tabelle 3 und 4). Hingegen zeigte sich eine Korrelation zwischen Anfangsparasitämie und Anfangs-HRP2-Wert ( $r_s = 0,609$ ;  $p < 0,002$ ). Ebenso bestand eine Korrelation zwischen dem Anteil an pigmentierten Monozyten und dem Anfangs-HRP2-Wert ( $r_s = 0,543$ ;  $p < 0,006$ ).

**Tabelle 3: Korrelationen der Anfangsparasitämie und des Anfangs-HRP2-Wertes mit Alter, Fiebertagen und Testergebnissen bei Einschluss in die Studie.**

Signifikante Korrelationen sind fett hervorgehoben. \*n = 24; n = Anzahl; HRP2 = *histidine-rich protein 2*.

		Anfangsparasitämie (n = 27)	Anfangs-HRP2-Wert (n = 24)
Alter	Korrelationskoeffizient	-0,26	-0,231
	Signifikanz (2-seitig)	0,191	0,278
Fiebertage	Korrelationskoeffizient	-0,008	0,154
	Signifikanz (2-seitig)	0,97	0,472
Gametozytämie an Tag 0	Korrelationskoeffizient	-0,153	-0,13
	Signifikanz (2-seitig)	0,447	0,545
Anteil pigmentierte Monozyten	Korrelationskoeffizient	0,277	<b>0,543</b>
	Signifikanz (2-seitig)	0,162	<b>0,006</b>
Anfangsparasitämie	Korrelationskoeffizient		<b>0,609</b>
	Signifikanz (2-seitig)		<b>0,002</b>
Anfangs-HRP2-Wert	Korrelationskoeffizient	<b>0,609*</b>	
	Signifikanz (2-seitig)	<b>0,002*</b>	

**Tabelle 4: Vergleich der Mittelwerte der Anfangsparasitämie und des Anfangs-HRP2-Wertes jeweils im Hinblick auf Geschlecht, Splenomegalie und Gametozyten an Tag 0.**

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede. HRP2 = *histidine-rich protein 2*; *P.f.* = *Plasmodium falciparum*;  $\mu\text{l}$  = Mikroliter; n = Anzahl; AU = arbiträre Einheiten.

		Anfangsparasitämie in <i>P.f.</i> / $\mu\text{l}$ (n)	Teststatistik	Anfangs-HRP2- Wert in AU (n)	Teststatistik
Geschlecht	männlich	63.935 (n = 19)	U = -0,053; p < 0,958	4,5 (n = 18)	U = -0,333; p < 0,739
	weiblich	104.233 (n = 8)		7,82 (n = 6)	
Splenomegalie	vorhanden	36.425 (n = 4)	U = -0,751; p < 0,453	3,79 (n = 4)	U = -0,387; p < 0,699
	nicht vorhanden	82.736 (n = 23)		5,64 (n = 20)	
Gametozyten an Tag 0	vorhanden	37.554 (n = 8)	U = -0,85; p < 0,396	3,51 (n = 7)	U = -0,54; p < 0,589
	nicht vorhanden	92.011 (n = 19)		6,08 (n = 17)	

### 3.2 Studienverlauf

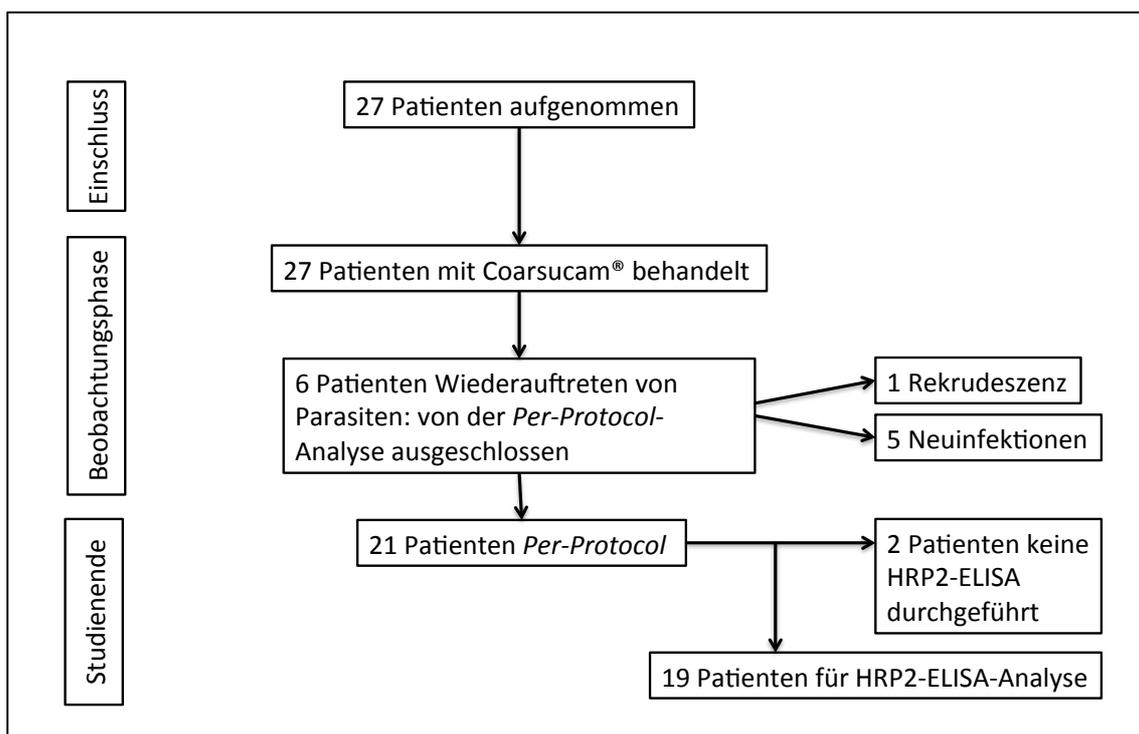
Es wurden 27 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei allen Patienten wurde die in der Lichtmikroskopie des Blutastriches diagnostizierte Monoinfektion mit *P. falciparum* mittels 18s-RNA-Gen-PCR bestätigt. Alle Patienten nahmen die Medikation nach Vorschrift ein, teilweise geschah dies unter Aufsicht durch einen Studienmitarbeiter. Sechs Patienten (22%) entwickelten im Verlauf der Beobachtungsphase ein Wiederauftreten (*reappearance*) von *Plasmodium*-Parasiten im Blutastrich. Bei zwei Patienten war dies an Tag 17 der Fall, bei drei Patienten an Tag 22 und bei einem Patienten an Tag 28. Auch in den RDTs und/oder im ELISA gab es Hinweise auf eine Infektion durch ein positives Testergebnis bei vorher negativem Testergebnis (RDTs), bzw. erneutem Anstieg des HRP2-Wertes oder erneutem Nachweis von HRP2 bei vorherigem Erreichen der Nachweisgrenze (ELISA). Diese Patienten wurden von der *Per-Protocol*-Analyse ausgeschlossen. Die Genotypisierung mittels Amplifizierung der MSP-1, MSP-2 (FC und 3D7 Allele) und GLURP Polymorphismen zeigte, dass es sich in einem Fall um eine Rekrudescenz handelte; in den fünf übrigen Fällen handelte es sich um Neuinfektionen. Die Rekrudescenz

tauchte an Tag 22 auf, die Neuinfektionen geschahen im Mittel 21,1 Tage nach Therapiebeginn.

Der Erziehungsberechtigte eines Patienten brach die Teilnahme an der Studie an Tag 22 ab, widersprach aber nicht der Verwendung der bis dato gewonnenen Daten. Da bei diesem Patienten der HRP2-Wert im ELISA bereits vorher die Nachweisgrenze erreicht hatte, können die Daten dennoch für die Analyse der HRP2-Eliminationskinetik verwendet werden.

Bei zwei Patienten wurden keine HRP2-ELISA durchgeführt, da nicht genug Probenmaterial aufbewahrt wurde. Somit verbleiben 19 Patienten für die HRP2-ELISA-Analyse.

Die folgende Abbildung 7 veranschaulicht den Studienverlauf:



**Abb. 7: Studien-Flussdiagramm**

HRP2 = *histidine-rich protein 2*; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*.

### 3.3 Testergebnisse in der Beobachtungsphase

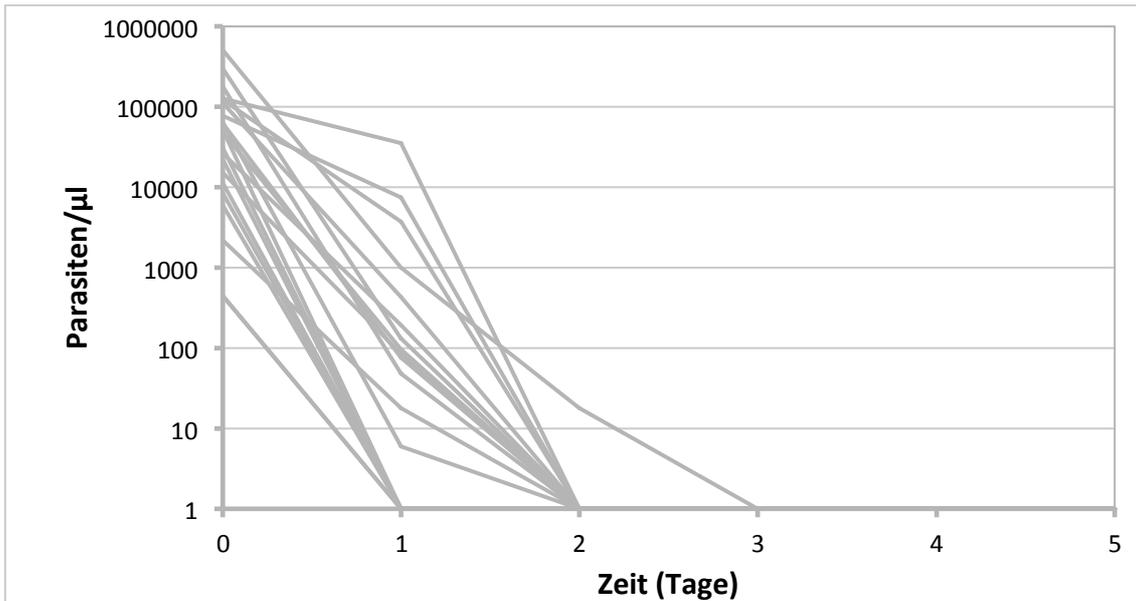
Die sechs Patienten, bei denen es im Verlauf zu einem Wiederauftreten von Parasiten kam, wurden von der *Per-Protocol*-Analyse ausgeschlossen. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf die 21 verbleibenden Patienten.

#### 3.3.1 Mikroskopie

##### 3.3.1.1 Parasitämie (asexuelle Formen)

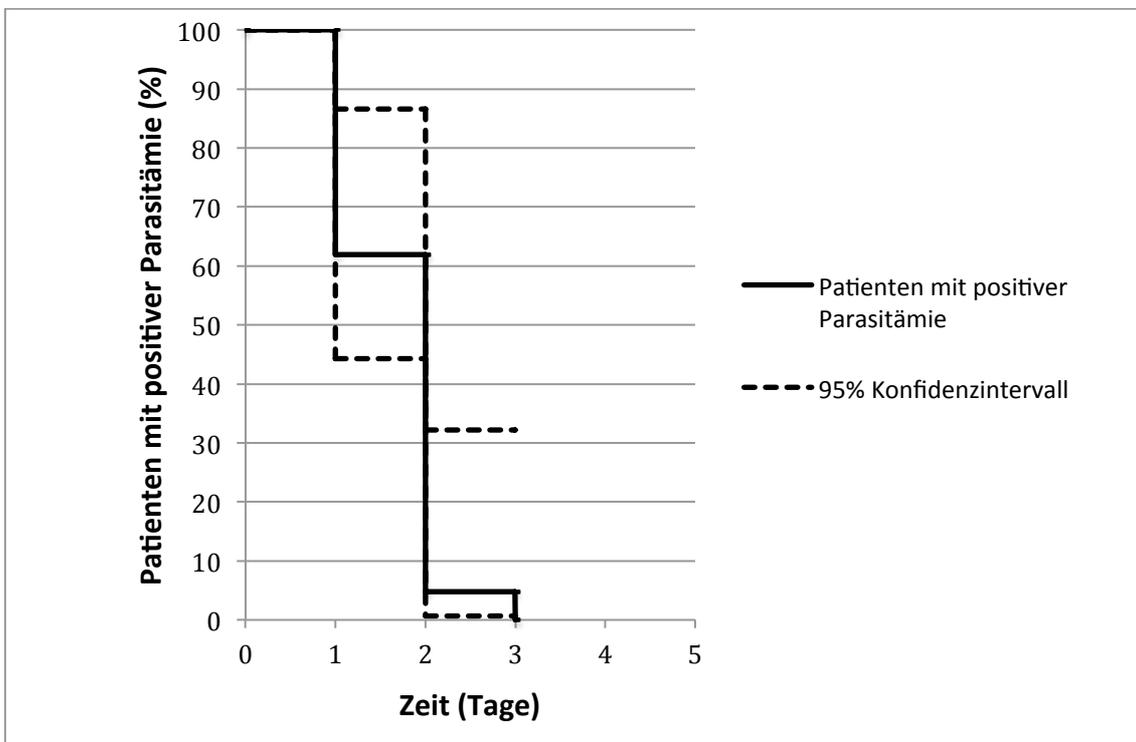
Nach Therapiebeginn mit Coarsucam® waren im Blutaussstrich rasch keine asexuellen Parasitenformen mehr nachweisbar. An Tag 1 befanden sich noch bei 13 Patienten (61,9%) asexuelle Formen im Blutaussstrich. Diese Patienten hatten eine signifikant höhere mittlere Anfangsparasitämie (Parasitämie an Tag 0) als Patienten mit einem auf asexuelle Formen negativen Blutaussstrich an Tag 1 (126.843 *P.f.*/μl vs. 16.468 *P.f.*/μl.;  $p < 0,004$ ).

An Tag 2 hatte nur noch der Patient mit der höchsten Anfangsparasitämie von 508.200 *P.f.*/μl nachweisbare asexuelle Formen im Blutaussstrich (5%, ein fehlender Wert); bei den anderen 12 Patienten, die an Tag 1 noch positiv gewesen waren, war im Blutaussstrich an Tag 2 keine Parasitämie mehr nachweisbar. An Tag 3 waren auch bei diesem Patienten keine asexuellen Formen mehr nachweisbar.



**Abb. 8: Verlauf der Parasitämien im Blutaussstrich.**

Zeitlicher Verlauf der Parasitämie im Blutaussstrich jedes Patienten der *Per-Protocol*-Analyse ( $n = 21$ ). Die Höhe der Parasitämie ist logarithmisch auf der y-Achse abgebildet.  $\mu\text{l}$  = Mikroliter;  $n$  = Anzahl.

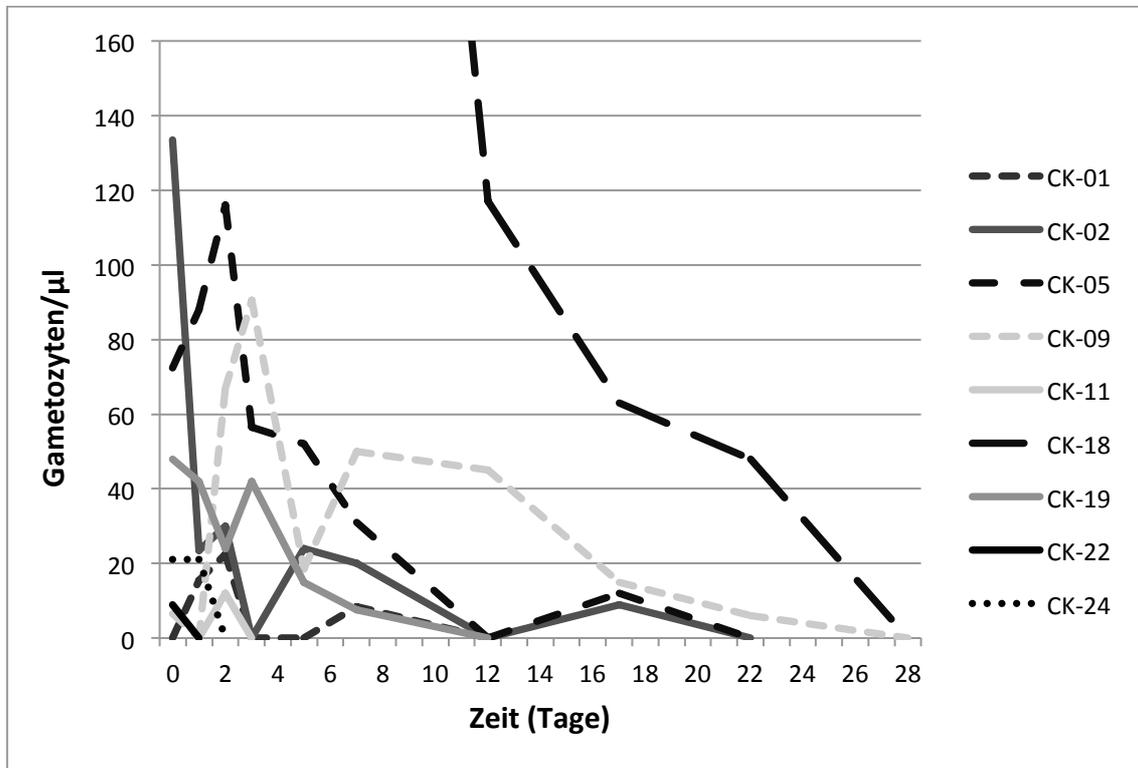


**Abb. 9: Verlauf der Positivität der Parasitämien im Blutaussstrich.**

Prozentualer Anteil an Patienten, bei denen im Blutaussstrich eine positive Parasitämie nachgewiesen werden konnte.

### 3.3.1.2 Gametozyten

Neun Patienten hatten bei Beginn bzw. im Verlauf der Studie einen positiven Nachweis von Gametozyten im Blutausstrich (42,9%).



**Abb. 10: Verlauf der Gametozytämien im Blutausstrich.**

Dargestellt sind nur Patienten, bei denen im Verlauf Gametozyten nachweisbar waren ( $n = 9$ ). Patient CK-18 ist aufgrund hoher initialer Werte nur unvollständig abgebildet (nicht abgebildete Werte: Tag 0: 1890 Gametozyten/ $\mu$ l, Tag 1: 766 Gametozyten/ $\mu$ l, Tag 2: 696 Gametozyten/ $\mu$ l, Tag 3: 621 Gametozyten/ $\mu$ l, Tag 5: 624 Gametozyten/ $\mu$ l, Tag 7: 466 Gametozyten/ $\mu$ l).  $\mu$ l = Mikroliter; CK-XX = Patienten-Identifikationsnummer; n = Anzahl.

In Abbildung 10 ist erkennbar, dass die Patienten mit positiver Gametozytämie diese bereits zu Beginn der Studie hatten (CK-02, CK-05, CK-09, CK-18, CK-19, CK-22, CK-24) oder diese in den ersten beiden Tagen entwickelten (CK-01 und CK-11). In der ersten Woche nach Studienbeginn kam es bei den meisten Patienten zu einer unregelmäßigen Zu- und Abnahme der Gametozytämie, ab der zweiten Woche zu einer deutlichen Abnahme. Bei Studienende waren bei keinem Patienten mehr Gametozyten nachweisbar. Die Patientengruppen mit oder ohne Gametozytämie bei Beginn bzw. im Verlauf der Studie unterschieden sich nicht im Hinblick auf die Höhe der Anfangsparasitämie ( $p < 0,256$ ), des

Anfangs-HRP2-Wertes ( $p < 0,556$ ) oder der HRP2-Eliminationshalbwertszeit ( $p < 0,16$ ). Auch war das Vorhandensein einer Gametozytämie nicht mit der Dauer der persistierenden Positivität der HRP2-detektierenden RDTs assoziiert (siehe 3.3.2).

### 3.3.2 Schnelltests

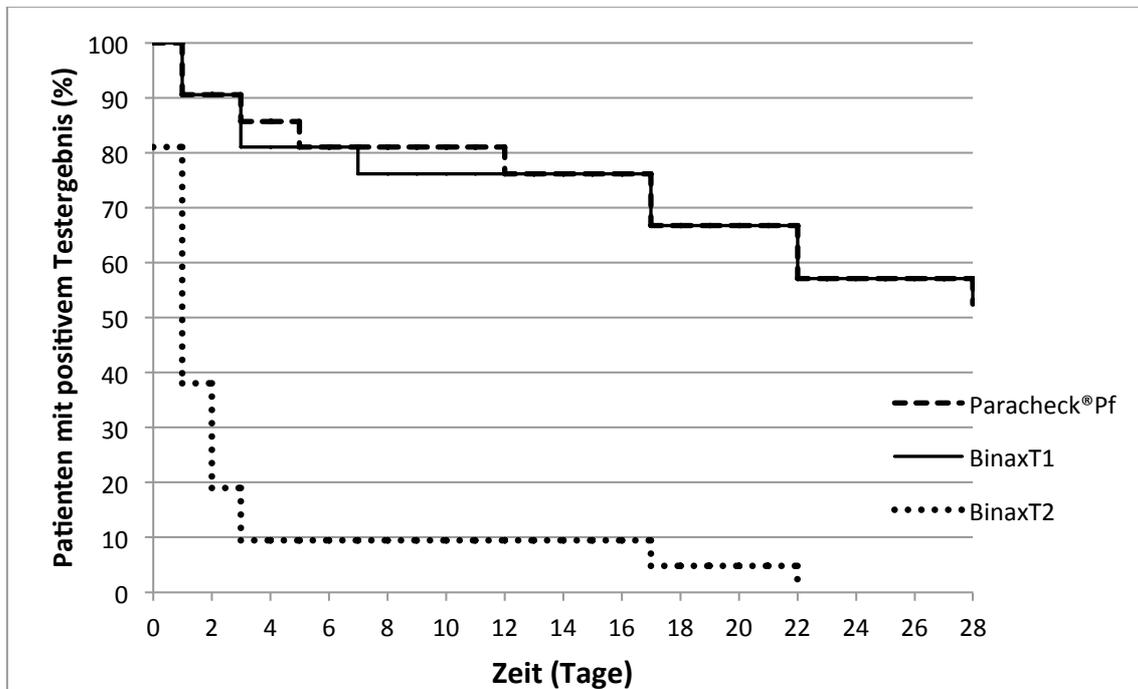
Die beiden HRP2-detektierenden Schnelltests Paracheck®Pf und die T1-Bande des BinaxNow®Malaria (im Folgenden „BinaxT1“ genannt) zeigten zu Beginn der Studie bei allen Patienten ein positives Testergebnis. Die mittels Kaplan-Meier-Schätzer geschätzte mittlere persistierende Positivität betrug bei Paracheck®Pf 20,76 Tage (SE: 2,29 Tage; 95% CI: 16,27 – 25,25 Tage), bei BinaxT1 20,52 Tage (SE: 2,35 Tage; 95% CI: 15,92 – 25,13 Tage). Die beiden Tests unterschieden sich kaum in ihren Ergebnissen. Ein Patient (CK-19) zeigte bei BinaxT1 ab Tag 7 ein negatives Ergebnis, obwohl das Ergebnis des Paracheck®Pf erst ab Tag 17 negativ ausfiel. Ein anderer Patient (CK-15) zeigte bei Paracheck®Pf ab Tag 12 ein negatives Ergebnis, obwohl das Ergebnis des BinaxT1 erst ab Tag 17 negativ ausfiel. Im Folgenden wird bei Bezug auf die persistierenden Positivität beider RDTs der Begriff „persistierende Antigenämie“ verwendet, wobei als Antigen HRP2 gemeint ist.

Die Dauer der persistierenden Antigenämie war signifikant assoziiert mit der Anfangsparasitämie (BinaxT1:  $p < 0,001$ ; Paracheck®Pf:  $p < 0,001$ ) und mit der HRP2-Halbwertszeit (BinaxT1:  $p < 0,01$ ; Paracheck®Pf:  $p < 0,008$ ).

Hingegen konnte keine signifikante Assoziation mit dem Anfangs-HRP2-Wert (BinaxT1:  $p < 0,247$ ; Paracheck®Pf:  $p < 0,248$ ) oder mit dem Vorhandensein von Gametozyten bei Beginn bzw. im Verlauf der Studie (BinaxT1:  $p < 0,796$ ; Paracheck®Pf:  $p < 0,858$ ) festgestellt werden. Bei Ende der Studie an Tag 28 waren von Paracheck®Pf und BinaxT1 noch 11/20 positiv (55%, ein fehlender Wert).

Bei der Aldolase-detektierenden T2-Bande des BinaxNow®Malaria (im Folgenden „BinaxT2“ genannt) blieb die Positivität im Mittel nur 2,24 Tage (SD: 4,75

Tage) bestehen. Bereits an Tag 3 zeigten nur noch zwei Patienten bei BinaxT2 ein positives Testergebnis (9,5%). Diese beiden Patienten blieben lange Zeit positiv. Ab Tag 22 zeigten alle Patienten ein negatives Testergebnis für BinaxT2.

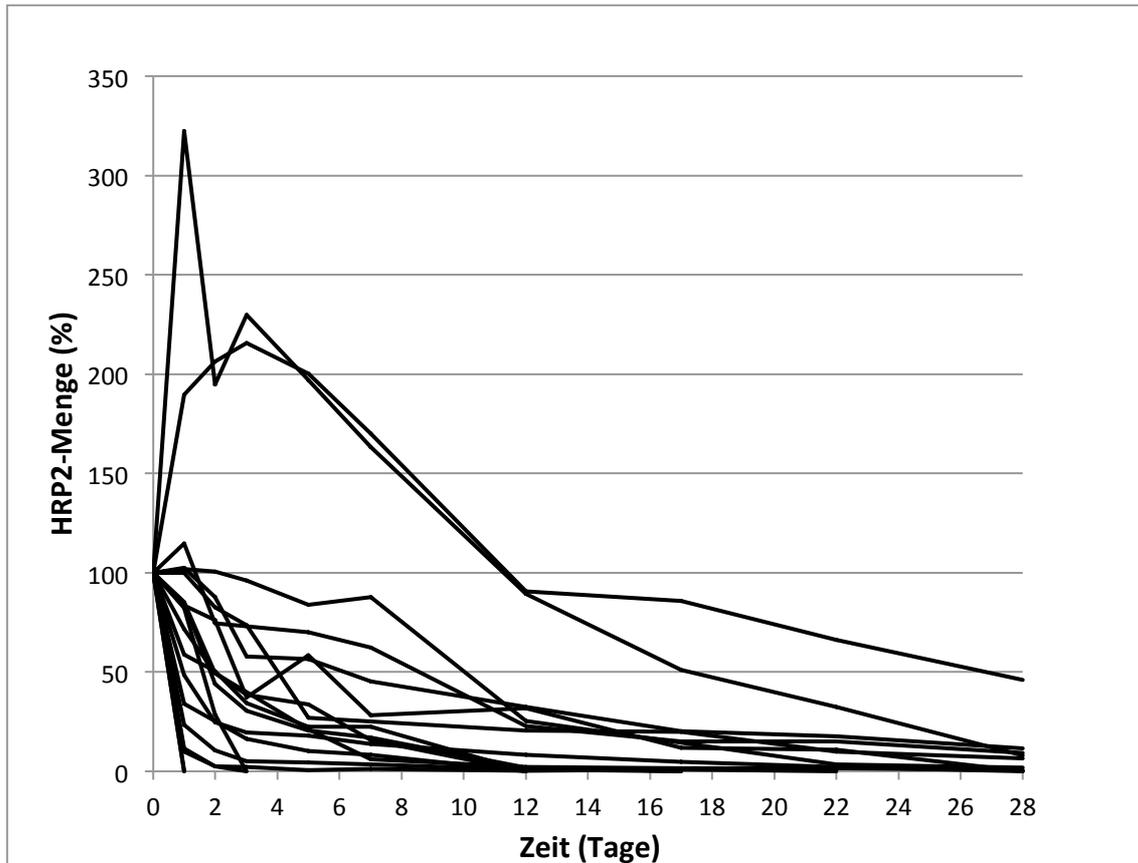


**Abb. 11: Verlauf der Positivität der RDTs.**

Prozentualer Anteil an Patienten, bei denen ein RDT zu einem Zeitpunkt ein positives Testergebnis erzielte. Die Diagrammlinien von Paracheck®Pf und BinaxT1 verlaufen größtenteils übereinander. RDT = Schnelltest; BinaxT1 = T1-Bande des BinaxNOW®Malaria-Schnelltests; BinaxT2 = T2-Bande des BinaxNOW®Malaria-Schnelltests.

### 3.3.3 ELISA

Bei 19 Patienten konnte eine HRP2-ELISA-Analyse durchgeführt werden. Ab dem Zeitpunkt des Erreichens der Nachweisgrenze (wenn nachfolgende Messungen ebenfalls nur die Nachweisgrenze zeigten) wurde der HRP2-ELISA als negativ gewertet. Die Nachweisgrenze betrug 0,01 AU (*arbitrary units* = arbiträre Einheiten). Der Messwert dieses Zeitpunktes wurde als letzter Messwert für die Berechnung der Eliminationskinetik verwendet.

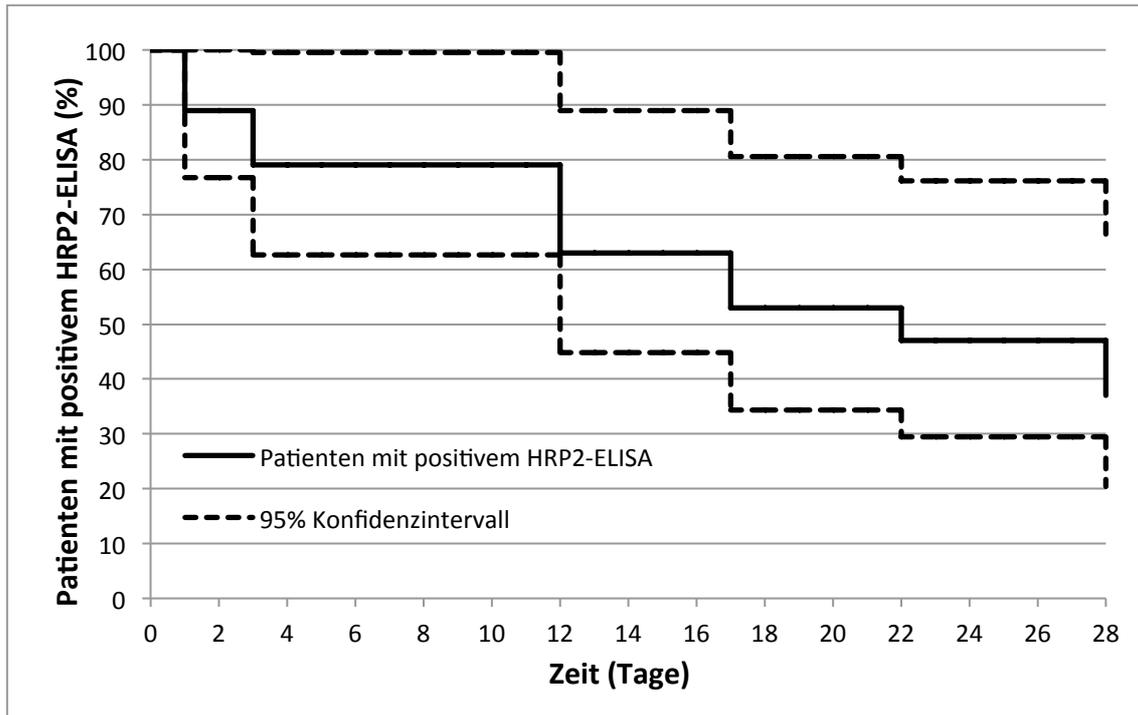


**Abb. 12: Verlauf der HRP2-Messungen (ELISA).**

Zeitlicher Verlauf der HRP2-Menge für jeden Patienten, bei dem eine HRP2-Messung mittels ELISA durchgeführt werden konnte (n = 19). Jede Linie repräsentiert die HRP2-Werte eines Patienten. Der besseren Übersichtlichkeit wegen ist die Menge des HRP2 prozentual auf der y-Achse angegeben, ausgehend vom Anfangswert als 100%. HRP2 = *histidine-rich protein 2*; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*; n = Anzahl.

Bei Einschluss in die Studie an Tag 0 zeigten alle Patienten einen positiven HRP2-ELISA. Zwei Patienten zeigten bereits an Tag 1 nur noch den Wert der Nachweisgrenze, woraus sich keine Eliminationshalbwertszeit ableiten ließ.

Zu Ende der Beobachtungsphase an Tag 28 war der HRP2-ELISA noch bei 7/19 (37%) Patienten positiv. Folgende Abbildung 13 zeigt den Verlauf der Positivität der HRP2-ELISA-Messungen.



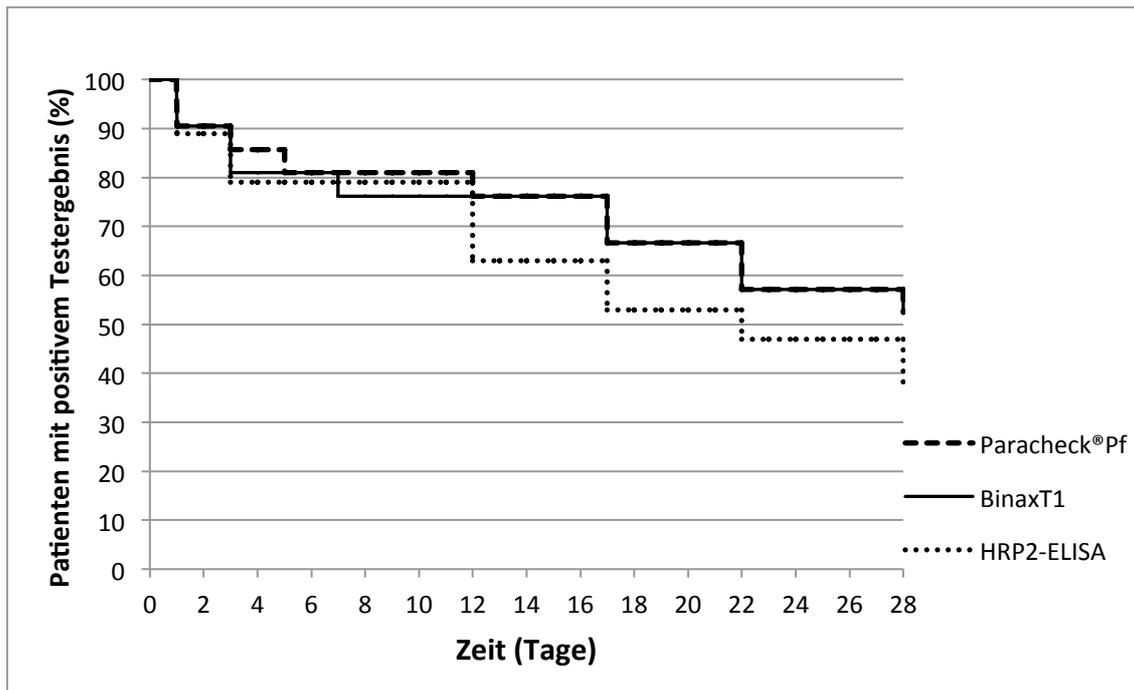
**Abb. 13: Verlauf der Positivität der HRP2-ELISA.**

Prozentualer Anteil an Patienten, bei denen der HRP2-ELISA zu einem Zeitpunkt eine positive Messung erzielte. Die Nachweisgrenze der HRP2-ELISA-Messung betrug 0,01 AU. HRP2 = *histidine-rich protein 2*; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*; AU = arbiträre Einheiten.

Aus den HRP2-Einzelmessungen zu jedem Zeitpunkt wurde für jeden Patienten eine Eliminationshalbwertszeit errechnet. Dies war für zwei Patienten aufgrund des Erreichens der Nachweisgrenze an Tag 1 nicht möglich. Die HRP2-Eliminationshalbwertszeit konnte somit nur für 17 Patienten ermittelt werden. Es zeigte sich, dass eine einfache Exponentialfunktion am besten geeignet war um die HRP2-Abnahme im zeitlichen Verlauf darzustellen. Es handelt sich somit um eine Eliminationskinetik erster Ordnung.

Bei fünf Patienten zeigte sich zu Beginn der Beobachtungsphase zunächst ein Anstieg der HRP2-Werte (siehe Abbildung 12), im Folgenden als Spitzenwert bezeichnet. Bei diesen Patienten wurde die Eliminationshalbwertszeit ab dem Zeitpunkt des Erreichens des höchsten Wertes berechnet.

Die HRP2-Eliminationshalbwertszeiten zeigten Werte von 0,33 bis 11,18 Tagen bei einem Median von 4,05 Tagen (IQR: 2,01 - 5,73 Tage). Die mittlere HRP2-Eliminationshalbwertszeit betrug 4,21 Tage (SD: 3,08 Tage).



**Abb. 14: Verlauf der Positivität der RDTs vs. HRP2-ELISA.**

Prozentualer Anteil an Patienten, bei denen ein HRP2-detektierender RDT bzw. der HRP2-ELISA zu einem Zeitpunkt ein positives Testergebnis bzw. eine positive Messung erzielte. Die Nachweisgrenze der HRP2-ELISA-Messung betrug 0,01 AU. RDT = Schnelltest; vs. = *versus*; HRP2 = *histidine-rich protein 2*; ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*; BinaxT1 = T1-Bande des BinaxNOW®Malaria-Schnelltests; AU = arbiträre Einheiten.

Die Abbildung 14 zeigt, dass mehr Patienten in den HRP2-detektierenden RDTs positive Ergebnisse erzielten als im HRP2-ELISA. Die Patienten, die während der Beobachtungsphase zu einem bestimmten Zeitpunkt zum ersten Mal ein negatives Testergebnis der HRP2-detektierenden RDTs erreichten, zeigten zum gleichen Zeitpunkt oder sogar bereits einige Tage vorher ein negatives Messergebnis im HRP2-ELISA. BinaxT1 war bei diesen Patienten im Median 3,5 Tage länger positiv als der HRP2-ELISA, Paracheck®Pf war im Median einen Tag länger positiv. Bei nur einem Patienten (CK-19) zeigte der HRP2-ELISA für längere Zeit ein positives Messergebnis als BinaxT1 und Paracheck®Pf.

Die HRP2-Eliminationshalbwertszeit korrelierte nicht mit der Anfangsparasitämie oder dem Anfangs-HRP2-Wert. Es zeigte sich weder ein Zusammenhang mit Alter oder Geschlecht, noch mit Fiebertagen, dem Vorliegen einer Splenomegalie, dem Vorliegen bzw. der Höhe einer Gametozytämie oder dem Anteil an pigmentierten Monozyten an Tag 0 (siehe Tabelle 5 und 6).

**Tabelle 5: Korrelationen der HRP2-Eliminationshalbwertszeit.**

Es bestehen keine signifikanten Korrelationen. \* n = 16

HRP2 = *histidine-rich protein 2*; n = Anzahl;  $r_s$  = Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient.

	HRP2-Halbwertszeit (n = 17)
Alter	$r_s = -0,209$ ; $p < 0,422$
Fiebertage	$r_s = -0,066$ ; $p < 0,8$
Gametozytämie an Tag 0	$r_s = -0,356$ ; $p < 0,161$
Anteil pigmentierte Monozyten	$r_s = 0,254$ ; $p < 0,325$
Anfangsparasitämie	$r_s = 0,453$ ; $p < 0,068$
Anfangs-HRP2-Wert*	$r_s = -0,212$ ; $p < 0,431$

**Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte der HRP2-Eliminationshalbwertszeit jeweils im Hinblick auf Geschlecht, Splenomegalie und Gametozyten an Tag 0.**

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede. HRP2 = *histidine-rich protein 2*; n = Anzahl.

		HRP2-Halbwertszeit in Tagen	Teststatistik (t; p-Wert)
Geschlecht	männlich (n = 14)	3,89	t = -0,973 p < 0,346
	weiblich (n = 3)	5,81	
Splenomegalie	vorhanden (n = 4)	2,62	t = 1,198 p < 0,249
	nicht vorhanden (n = 13)	4,72	
Gametozyten an Tag 0	vorhanden (n = 6)	2,77	t = 1,48 p < 0,16
	nicht vorhanden (n = 11)	5,02	

Die fünf Patienten, die einen Spitzenwert der HRP2-Werte zeigten, hatten eine signifikant längere mittlere HRP2-Eliminationshalbwertszeit als jene Patienten ohne Spitzenwert (7,56 Tage vs. 2,83 Tage;  $p < 0,001$ ). Sie unterschieden sich jedoch ansonsten nicht von den Patienten ohne Spitzenwert, insbesondere auch nicht im Hinblick auf die Höhe der Anfangsparasitämie (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7: Vergleich der Mittelwerte bzw. Häufigkeiten bei Patienten „mit Spitzenwert“ vs. „ohne Spitzenwert“ der HRP2-Werte im Verlauf.**

Signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben. Da die Anzahl der untersuchten Fälle auf 19 limitiert war, handelt es sich um eine rein explorative Analyse. <sup>a</sup>  $n = 13$ ; <sup>b</sup>  $n = 12$   
 vs. = versus; HRP2 = histidine-rich protein 2; n = Anzahl; P.f. = Plasmodium falciparum;  $\mu\text{l}$  = Mikroliter; AU = arbiträre Einheiten; HWZ = Halbwertszeit.

	Patienten „mit Spitzenwert“ (n = 5)	Patienten „ohne Spitzenwert“ (n = 14)	Teststatistik ( $\chi^2$ /t/U; p-Wert)
Geschlecht männlich (n)	3	13	$\chi^2 = 2,99$ $p < 0,084$
Alter (Jahre)	7,8	9,2	t = 0,441 $p < 0,665$
Fieber (Tage)	3,0	3,6	U = -0,242 $p < 0,809$
Splenomegalie vorhanden (n)	0	4	$\chi^2 = 1,81$ $p < 0,179$
Vorhandensein von Gametozyten an Tag 0 (n)	1	5	$\chi^2 = 0,421$ $p < 0,516$
Gametozytämie an Tag 0 (Gametozyten/ $\mu\text{l}$ )	2	146	U = -0,786 $p < 0,432$
Anteil pigmentierte Monozyten (%)	5,2	4,7	U = -0,745 $p < 0,457$
Anfangsparasitämie (P.f./ $\mu\text{l}$ )	159781	59876	U = -1,852 $p < 0,064$
Anfangs-HRP2-Wert (AU)	9,01	5,03 <sup>a</sup>	U = -0,246 $p < 0,805$
HRP2-HWZ (Tage)	<b>7,56</b>	<b>2,83<sup>b</sup></b>	<b>t = -3,974</b> <b>p &lt; 0,001</b>

---

## 4 Diskussion

---

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Studie untersuchte die HRP2-Werte von Patienten mit akuter Malaria tropica vor Therapiebeginn und in einer Beobachtungsphase mit besonderem Augenmerk auf der *in vivo* HRP2-Eliminationskinetik. Dies soll dazu dienen, zwei von mehreren Anwendungsbereichen des HRP2 in der klinischen Diagnostik kritisch zu überprüfen und ggf. weiterzuentwickeln. Einen Anwendungsbereich findet HRP2 in der Malaria-Routinediagnostik. Dort wird es täglich unzählige Male in Form von Malaria-Schnelltests qualitativ nachgewiesen. Ein anderer Anwendungsbereich ist noch nicht etabliert, sondern bisher rein hypothetisch: Es wird angenommen, dass bei einer akuten Malariaerkrankung das vor Therapiebeginn quantitativ bestimmte HRP2 die Gesamt-Parasitenlast widerspiegeln und aufgrund dessen eine Prognose über den Krankheitsverlauf getroffen werden kann. In früheren Arbeiten wurden hierzu verschiedene Berechnungsmodelle entwickelt.<sup>9,11</sup>

Bei Einschluss in die Studie untersuchten wir verschiedene Einflussfaktoren auf das Anfangs-HRP2 wie die Infektionsdauer und -schwere oder eine erworbene Teilimmunität. Des Weiteren wurde im Verlauf die *in vivo* HRP2-Eliminationskinetik mittels HRP2-detektierender Schnelltests und ELISA untersucht und es wurde analysiert ob und inwiefern die Kinetik von Wirtsfaktoren und unterschiedlichen Krankheitsausprägungen abhängig ist. Eine genaue Kenntnis der HRP2-Eliminationskinetik ist sowohl Voraussetzung für ein valides Berechnungsmodell, als auch unabdingbar, um die Bedeutung von HRP2-detektierenden Schnelltests im klinischen Alltag beurteilen zu können.

### 4.1 Einschluss in die Studie

Das Screening und das Auffinden von geeigneten Patienten gestalteten sich schwieriger als ursprünglich angenommen. Mit fortschreitender Zeit fanden sich immer weniger Patienten mit Malariainfektionen durch *P. falciparum*, was vermutlich auf die jahreszeitlichen Schwankungen der Häufigkeit von Malariainfektionen zurückzuführen ist, die verstärkt mit einer gewissen Latenz nach

Einsetzen der Regenzeit auftreten und deren Häufigkeit nach Beginn der Trockenzeit ebenfalls mit einer gewissen Latenz wieder zurückgeht. Des Weiteren gestalteten sich die Hausbesuche der Patienten während der Beobachtungsphase als immer schwieriger, da vermehrt Polizeikontrollen an Straßensperren durchgeführt wurden, was zu einem zeitlich verlängerten Rückweg zum Forschungslabor und somit einem verzögerten Rücktransport der eisgekühlten Blutproben führte und womöglich die Unversehrtheit der Proben gefährdet hätte. Nachdem 27 Patienten in die Studie eingeschlossen worden waren, die ersten Analysen problemlos durchgeführt und bis dato kein Patient *lost-to-follow-up* war, war davon auszugehen, dass bereits diese Teilnehmerzahl statistisch aussagekräftige Ergebnisse liefern würde. Nach gründlichem Abwägen durch das Studienteam wurde deshalb die Rekrutierung von Studienteilnehmern zu diesem Zeitpunkt beendet, obwohl die Anzahl der Studienteilnehmer im Protokoll ursprünglich auf 50 festgesetzt worden war.

#### 4.1.1 Studienpopulation, demographische Merkmale

Die 27 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, verteilten sich recht homogen zwischen dem Kleinkindalter bis zum jungen Erwachsenenalter. In einer holoendemischen Malariaregion lässt das Alter eines Patienten aufgrund immer wiederkehrender Malariainfektionen Schlüsse auf die bereits erworbene Teilimmunität zu: Mit zunehmendem Alter steigt auch die erworbene Teilimmunität.<sup>125–127</sup> Es ist somit davon auszugehen, dass innerhalb unserer Studienpopulation verschiedenste Ausprägungen einer bereits erworbenen Teilimmunität vorlagen. Bezüglich Körpergewicht und Körpergröße entsprach die Studienpopulation dem Durchschnitt der gabunischen Kinder in diesem Alter, in Anlehnung an die Referenzwerte der WHO.<sup>128–130</sup>

#### 4.1.2 Befunde und Testergebnisse an Tag 0

Bei Einschluss in die Studie wurden verschiedene Parameter untersucht, die auf eine schon länger andauernde Malariaerkrankung hinweisen können. Es ist bekannt, dass eine schon seit längerer Zeit bestehende Malariainfektion durch

die größere Anzahl an durchlaufenen Parasiten-Replikationszyklen mit einer höheren Parasitenlast einhergeht. Es ist anzunehmen, dass sie auch positive Auswirkung auf die Höhe der HRP2-Menge hat, da die Halbwertszeit des HRP2 weit länger als ein Replikationszyklus ist und das HRP2 somit kumuliert. Parameter, die auf eine schon seit längerer Zeit bestehende Malariainfektion hinweisen können, sind (unter anderem):

- die anamnestische Angabe von vielen Fiebertagen vs. erst seit kurzem bestehendes Fieber,
- bei der körperlichen Untersuchung das Vorliegen einer Splenomegalie,
- im Blutausstrich das Vorhandensein bzw. eine hohe Anzahl an Gametozyten,
- im Blutausstrich ein hoher Anteil an pigmentierten Monozyten.

Die genannten Parameter können ebenso auf eine zurückliegende, behandelte Malariaerkrankung hinweisen, jedoch war in der vorliegenden Studie eine Behandlung mit einem Antimalaria-Medikament in den letzten 28 Tagen ein Ausschlusskriterium.

Mehr als 28 Tage nach einer behandelten Malariaerkrankung ist nicht damit zu rechnen, dass noch Fieber besteht. Eine Splenomegalie kann jedoch nach behandelter Malariaerkrankung weit länger als 28 Tage bestehen.

Es ist unwahrscheinlich, dass 28 Tage nach einer behandelten Malariaerkrankung noch Gametozyten im Blutausstrich nachweisbar sind; Eichner *et al.* (2001) schätzten die maximale Gametozyten-Zirkulationszeit auf 22,2 Tage.<sup>131</sup>

Nach Therapie mit den *first-line* Medikamenten Artesunat/Amodiaquin oder Artemether/Lumefantrin ist nach 28 Tagen mit keiner Gametozytämie mehr zu rechnen.<sup>109,132,133</sup> Allerdings konnten verschiedene Studien auch noch 3 - 6 Wochen nach Antimalaria-Therapien, darunter auch ACTs, (sub)mikroskopische Gametozytämien nachweisen.<sup>134-137</sup> Da viele verschiedene Antimalaria-Medikamente in den Apotheken in Gabun frei verkäuflich sind, ist nicht ganz auszuschließen, dass eine Gametozytämie von einer mehr als 28 Tage vorangegangenen Malariaerkrankung herrührt.

Monozyten und andere phagozytierende Zellen nehmen zirkulierendes Malaria-pigment auf, welches lichtmikroskopisch intrazellulär nachgewiesen werden

kann. Die Anzahl von pigmentierten Monozyten im Speziellen gilt als ein guter Indikator für die Dauer einer Malariainfektion, da ihre Halbwertszeit mehrere Tage beträgt. Day *et al.* (1996) stellten eine mediane *Clearance* von pigmentierten Monozyten von 9 Tagen fest. Es ist also nicht davon auszugehen, dass pigmentierte Monozyten nach erfolgreicher Behandlung länger als 28 Tage im Blutaussstrich nachweisbar sind.<sup>138–141</sup>

Von den genannten Parametern und in Anbetracht der Ausschlusskriterien dieser Studie scheint der Anteil an pigmentierten Monozyten der zuverlässigste Parameter zu sein, eine schon seit längerer Zeit andauernde Malariainfektion anzuzeigen.

Zwei Patienten hatten Begleiterkrankungen. Ein Patient litt unter einer Mittelohrentzündung und einem akuten Harnwegsinfekt, welche mit Amoxicillin behandelt wurden, bei einem anderen Patienten wurde ein bestehendes Panaritium chirurgisch drainiert. Es ist nicht davon auszugehen, dass diese Begleiterkrankungen in Zusammenhang mit einer Malaria stehen, noch ihre Therapie die Therapie der Malaria oder die Studienuntersuchungen beeinflusst haben, insbesondere sind keine Wechselwirkungen von Artesunat/Amodiaquin mit Amoxicillin bekannt.<sup>142</sup>

Die Patienten/Erziehungsberechtigten gaben im Durchschnitt eine Anzahl von 3,3 Fiebertagen an (SD: 2,8 Tage). Ein Patient litt seit 14 Tagen an Fieber. Nach den Fiebertagen zu urteilen, handelte es sich also größtenteils um erst seit wenigen Tagen bestehende Erkrankungen. Allerdings ist diese anamnestische Angabe sehr stark abhängig von der Betreuungssituation des Kindes (z. B. wechselnde Betreuer an aufeinanderfolgenden Tagen) und anderen Faktoren, z. B. ob ein Fieberthermometer zur objektiven Beurteilung von „Fieber“ verfügbar ist.

Bei vier Patienten konnte eine Splenomegalie festgestellt werden. Diese als Kriterium für eine seit längerer Zeit andauernde Malariainfektion zu werten, ist in einer Population mit einer hohen Prävalenz von homo- und heterozygoter Sichelzellanämie, welche ebenfalls, besonders bei Kindern, eine Splenomegalie

hervorrufen kann, jedoch sehr kritisch zu sehen. In der gabunischen Bevölkerung beträgt der Heterozygotenanteil für Sichelzellanämie 21,1%.<sup>143</sup> Des Weiteren ist eine Fallzahl von vier sehr gering, um statistisch signifikante Aussagen zu treffen.

Im Blutausstrich fanden sich bei 29,6% der Patienten Gametozyten und bei 81,5% der Patienten pigmentierte Monozyten bei einem mittleren Anteil von 5,5% pigmentierten Monozyten (SD: 5%).

Es gab eine große Spannweite der Anfangsparasitämie zwischen den Patienten. Alle Patienten hatten Krankheitssymptome mindestens in Form von Fieber, kein Patient wies jedoch klinische Zeichen einer schweren Malaria oder Komplikationen auf. Die große Spannweite der Parasitämie bei ähnlichem Krankheitsbild verdeutlicht die mittlerweile allgemein akzeptierte Meinung, dass nicht von der peripher bestimmten Parasitämie auf die Schwere der Erkrankung geschlossen werden kann.<sup>9,11,144–146</sup>

Die o. g. Parameter, die auf eine länger andauernde Malariaerkrankung hinweisen können, korrelierten nicht mit der Höhe der Anfangsparasitämie. Ginge man davon aus, dass alle im Wirtsorganismus befindlichen Parasiten im peripheren Blut zirkulieren, so wäre ein linearer Zusammenhang zwischen der Dauer der Infektion, den dadurch bereits durchlaufenen Replikationszyklen und der peripher bestimmten Parasitämie zu erwarten. Dass keiner der Parameter für die Dauer der Infektion mit der Parasitämie korreliert, kann zwei Gründe haben: Einerseits ist möglich, dass die Patienten mit einer bereits erworbenen Teilimmunität die im Körper befindlichen Parasiten schneller eliminieren und somit die Parasitämie trotz langer Dauer der Infektion relativ niedrig ist. Wir konnten allerdings keinen signifikanten Zusammenhang des Alters (als Parameter für eine bereits erworbene Teilimmunität) mit der Parasitämie feststellen. Eine andere Erklärung ist, dass die peripher bestimmte Parasitämie aufgrund der Sequestrierung (siehe 1.3.1) eben nicht der wirklichen Parasitenlast entspricht. Somit ist zwar ein linearer Zusammenhang zwischen der Dauer der Infektion und der wirklichen Parasitenlast möglich, dieser kann aber nicht anhand der peripheren Parasitämie gezeigt werden.

Auch der Anfangs-HRP2-Wert zeigte eine hohe Spannweite zwischen 0,05-33,59 AU. Wir konnten eine signifikante Korrelation des Anfangs-HRP2-Wertes sowohl mit dem Anteil der pigmentierten Monozyten als auch mit der Höhe der Anfangsparasitämie nachweisen. Wie oben aufgeführt, scheint der Anteil der pigmentierten Monozyten ein zuverlässiger Parameter für die Dauer der bestehenden Infektion zu sein. Dies legt nahe, dass die Höhe des HRP2-Wertes von der Dauer der bestehenden Infektion abhängig ist: Mit länger dauernder Infektion nimmt auch der HRP2-Wert zu. Der positive Zusammenhang zwischen Parasitämie und HRP2-Wert konnte schon in mehreren Studien gezeigt werden.<sup>43,147,148</sup> Er wird gestützt durch die Beobachtungen einer längeren persistierenden HRP2-Antigenämie bei höherer Parasitämie durch Mayxay *et al.* (2001) und Kyabayinze *et al.* (2008).<sup>60,63</sup> Aufgrund des Phänomens der Sequestrierung lässt sich zwar nicht direkt von der peripher bestimmten Parasitämie auf die Gesamt-Parasitenlast schließen, jedoch ist bei einer hohen peripheren Parasitämie eine hohe Gesamt-Parasitenlast wahrscheinlich. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen die Annahme von anderen Autoren, dass das im Blut gemessene HRP2 die Gesamt-Parasitenlast widerspiegeln kann.<sup>9,10,86,87,147</sup>

Desakorn *et al.* (1997) stellten eine niedrigere Nachweisgrenze für HRP2 in Vollblut als in Plasma fest, allerdings hielten sie den HRP2-Nachweis in Plasma für ein genaueres Maß für die Gesamt-Parasitenlast. Wie auch schon von anderen Studien bekannt, war die Sensitivität für HRP2 höher, wenn das Vollblut vorher gefroren und aufgetaut war.<sup>43,149</sup> Durch das Einfrieren und Auftauen werden die Erythrozyten lysiert, das darin befindliche HRP2 freigesetzt und somit auch gemessen. Desakorn *et al.* (2005) stellten fest, dass während eines intraerythrozytären Parasiten-Entwicklungszyklus 89% des synthetisierten HRP2 intraerythrozytär verbleibt und erst zum Zeitpunkt der Schizontruptur freigesetzt wird.<sup>86</sup> Bei der HRP2 Bestimmung aus lysiertem Vollblut wird demnach das gesamte HRP2 (intraerythrozytär und sezerniert) gemessen, wohingegen bei Bestimmung aus Plasma nur das bis zu diesem Zeitpunkt sezernierte HRP2 gemessen wird. Allerdings sind in peripherem Blut

die infizierten Erythrozyten mit reiferen asexuellen Parasitenstadien (und einem höheren HRP2-Gehalt) aufgrund der Sequestrierung unterrepräsentiert. Da auch die Parasiten in sequestrierten Erythrozyten HRP2 ins Plasma sezernieren, scheint in Plasma gemessenes HRP2 ein genaueres Maß für die Gesamt-Parasitenlast zu sein, wenngleich die Sensitivität herabgesetzt ist.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass in der vorliegenden Studie die Stärke der Korrelation der Parasitämie mit dem HRP2-Wert darauf zurückzuführen ist, dass dieser aus lysiertem Vollblut und nicht aus Plasma bestimmt wurde. Bei der HRP2-Messung aus Vollblut sind sequestrierte Parasiten ebenso unterrepräsentiert wie in der lichtmikroskopisch bestimmten Parasitämie. Dies könnte die Verstärkung einer bestehenden Korrelation zwischen dem HRP2-Wert und der Parasitämie bewirken. In früheren Studien konnte jedoch eine Korrelation der Parasitämie mit dem HRP2-Wert gezeigt werden, auch wenn das HRP2 aus Plasma bestimmt wurde.<sup>9,147,148</sup> Somit ist nicht davon auszugehen, dass die in unserer Studie vorliegende Korrelation zwischen Parasitämie und HRP2-Wert allein auf den oben genannten möglicherweise verstärkenden Effekt zurückzuführen ist.

Der Anfangs-HRP2-Wert war unabhängig vom Patientenalter. Somit lässt sich kein Einfluss der eventuell bereits erworbenen Teilimmunität auf den HRP2-Wert vermuten.

Beide HRP2-detektierenden RDTs fielen bei allen Patienten bei Einschluss in die Studie positiv aus. Dies entspricht einer Sensitivität von 100%. In früheren Studien wurde für Paracheck®Pf und BinaxNOW®Malaria eine Abhängigkeit der Sensitivität von der Höhe der Parasitämie gezeigt. Bei Paracheck®Pf lag die Sensitivität bei 82 – 99,4% für Parasitämien > 200 *P.f.*/µl.<sup>118–121</sup> Der Hersteller von BinaxNOW®Malaria gibt eine Sensitivität zwischen 53,9% (< 100 *P.f.*/µl) und 99,7% (> 5000 *P.f.*/µl) an. Eine Parasitämie von 1001 - 1500 *P.f.*/µl erzeuge 95% positive Testergebnisse.<sup>122</sup> Die überdurchschnittliche Sensitivität beider HRP2-detektierenden RDTs in unserer Studie ist erklärbar durch die Höhe der Anfangsparasitämie. Parasitämien unter 300 *P.f.*/µl waren

von der Studie ausgeschlossen. Die niedrigste in der Lichtmikroskopie ausgezählte Anfangsparasitämie lag bei 449 *P.f.*/μl.

Das Ergebnis des Aldolase-detektierenden Schnelltests BinaxT2 war abhängig von der Anfangsparasitämie und fiel bei 23/27 Patienten (85,2%) positiv aus. Die Abhängigkeit eines positiven Testergebnisses eines Aldolase-detektierenden RDTs von der Höhe der Parasitämie konnten auch schon Ghanchi *et al.* (2009) zeigen.<sup>147</sup>

## 4.2 Verlauf

Die *Follow-up*-Rate der Patienten war hervorragend und übertraf deutlich die Erwartungen. Lediglich die Erziehungsberechtigte eines Patienten brach die Teilnahme an der Studie an Tag 22 ab, widersprach aber nicht der Verwendung der bis dahin gewonnenen Daten, so dass diese zur Analyse der HRP2-Eliminationskinetik zur Verfügung standen. Jedoch mussten sechs Patienten aufgrund eines Wiederauftretens von Parasiten von der *Per-Protocol*-Analyse ausgeschlossen werden, so dass hierfür nur 21 Patienten verblieben. Die Genotypisierung zeigte, dass es sich bloß in einem Fall um eine Rekrudeszenz handelte, bei den fünf übrigen lagen Neuinfektionen vor. Diese Anzahl lag deutlich über den Erwartungen.

### 4.2.1 Mikroskopie

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Blutausstriche zeigte eine rasche *Clearance* von asexuellen Parasiten. An Tag 3 nach Studienbeginn waren bei keinem Patienten mehr asexuelle Parasitenstadien nachweisbar. Dies entspricht der in anderen Studien festgestellten Parasiten-*Clearance* nach korrekter Einnahme eines Artesunat/Amodiaquin-Kombinationspräparats. Auch der Verlauf der Gametozytenzahl nach Therapiebeginn ist vergleichbar mit anderen Studien.<sup>108–112</sup> Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Gametozytämie bei Beginn bzw. im Verlauf und der Höhe der Anfangsparasitämie oder dem Anfangs-HRP2-Wert festgestellt werden.

Es ist bekannt, dass auch Gametozyten HRP2 synthetisieren. In früheren Studien wurde vermutet, dass Gametozyten möglicherweise zu einer verlängerten persistierenden HRP2-Antigenämie nach Behandlung beitragen.<sup>150,151</sup> Allerdings konnten spätere Studien keine signifikante Assoziation zwischen (persistierender) Antigenämie und Gametozytämie feststellen.<sup>62,83,147</sup> Auch die hier vorliegenden Daten geben keinen Hinweis darauf, dass das Vorhandensein von Gametozyten den HRP2-Wert, sei er qualitativ bestimmt durch RDTs oder quantitativ gemessen im ELISA, signifikant beeinflusst. Ein Grund hierfür kann sein, dass die Menge des durch Gametozyten synthetisierten HRP2 relativ gering ist im Vergleich zur Menge des durch asexuelle Parasitenstadien synthetisierten HRP2 und somit nicht ins Gewicht fällt. Ein anderer möglicher Grund wäre, dass Gametozyten nicht immer mikroskopisch sichtbar sind und es wahrscheinlich ist, dass eine höhere Anzahl an Patienten eine (submikroskopische) Gametozytämie hatte.<sup>152</sup>

#### 4.2.2 Schnelltests

In unserer Studie bestätigte sich die hohe Sensitivität der HRP2-detektierenden Schnelltests auch dadurch, dass wir zeigen konnten, dass auch sehr geringe Mengen an HRP2 zu einem positiven Testergebnis führen. In den meisten Fällen zeigten die HRP2-detektierenden RDTs auch dann noch ein positives Testergebnis, wenn die Antigenmenge bereits so gering war, dass sie im ELISA nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die mittels Kaplan-Meier-Schätzer geschätzte mittlere persistierende Antigenämie betrug 20,76 Tage für Paracheck®Pf und 20,52 Tage für BinaxNOW®Malaria. Die Daten für die zugrunde liegende Ereigniszeitanalyse sind rechts-zensiert, da die Patienten nur bis zum 28. Tag nach Studienbeginn beobachtet wurden, die Testergebnisse der Schnelltests zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht bei allen Patienten negativ waren. In der Tat war erst bei 10/21 Patienten (47,6%) das Ereignis „erstmalig negativer Schnelltest“ eingetreten, d. h. mehr als die Hälfte der Patienten wurde zensiert. Aufgrund der hohen Anzahl der Zensierungen kann der „echte“ Mittelwert der Dauer der persistierenden Antigenämie noch erheblich vom

geschätzten Mittelwert abweichen. 55% der Patienten hatten an Tag 28 noch ein positives Testergebnis der Schnelltests. Dies lässt vermuten, dass der „echte“ Mittelwert der Dauer der persistierenden Antigenämie eher um diesen Zeitpunkt liegt. Dies käme den Ergebnissen von Kyabayinze *et al.* (2008) nahe, die jeden ihrer Patienten bis zum Negativwerden des Schnelltests beobachteten und so eine mittlere persistierende Antigenämie von 32 Tagen feststellten, wobei die Dauer der persistierenden Antigenämie von der Anfangsparasitämie abhängig war.<sup>63</sup> Die Abhängigkeit der persistierenden Antigenämie von der Anfangsparasitämie wurde auch schon in anderen Studien beschrieben<sup>10,60</sup> und konnte durch unsere Studie bestätigt werden. Wie in 4.2.1 aufgeführt, weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht auf eine Beeinflussung der persistierenden Antigenämie durch Gametozyten hin.

Es konnte keine signifikante Assoziation mit dem Anfangs-HRP2-Wert nachgewiesen werden. Die persistierende Antigenämie war jedoch signifikant mit der HRP2-Eliminationshalbwertszeit assoziiert. Dies ist plausibel, wenn man bedenkt, dass bei einer Eliminationskinetik erster Ordnung die Konzentration einer Substanz nach 5 - 7 Halbwertszeiten häufig unter die Nachweisgrenze fällt, auch wenn die Streuung der Ausgangskonzentration relativ groß ist. Die Länge der Nachweisbarkeit ist demnach also abhängig von der Halbwertszeit. Diese Überlegung untermauert die von uns mittels ELISA festgestellte HRP2-Eliminationshalbwertszeit: Bei einer mittleren HRP2-Eliminationshalbwertszeit von 4,21 Tagen müsste nach ca. 21 - 29,5 Tagen (5 - 7 Halbwertszeiten) die Grenze der Nachweisbarkeit erreicht sein. Die von uns angenommene mittlere Dauer der persistierenden Antigenämie (Nachweisbarkeit des HRP2 mittels RDT) liegt genau innerhalb dieses Intervalls. Die Ergebnisse der beiden unabhängigen Methoden RDT und ELISA sind also kongruent.

Die lange persistierende Positivität von HRP2-detektierenden RDTs stellt ebenso wie ihre hohe Sensitivität einen Nachteil für die Anwendung dieser Schnelltests in einem holoendemischen Setting dar. In Regionen mit holoendemischer Malaria hat ein Großteil der Bevölkerung häufig wiederkehrende Malariainfektionen oder eine asymptomatische Parasitämie. Noch Wochen

nach einer vorangegangenen Infektion kann weiterhin HRP2 im Blutkreislauf zirkulieren. Auch eine asymptomatische Parasitämie geht mit dem Vorhandensein von HRP2 in der Blutzirkulation einher. Ein HRP2-detektierender RDT würde in diesen Fällen positiv ausfallen. Dies bedeutet, dass bei klinisch Gesunden ein zu einem beliebigen Zeitpunkt durchgeführter HRP2-detektierender Schnelltest in vielen Fällen ein positives Testergebnis aufzeigen kann.

Treten Fieber und Krankheitssymptome auf, so wird häufig ein solcher Malaria-Schnelltest zur Diagnose oder zum Ausschluss von Malaria verwendet. Ein Problem liegt nun in der Interpretation eines positiven Testergebnisses: Ein positives Ergebnis zeigt lediglich den Nachweis von HRP2 an, nicht jedoch eine akute Malariaerkrankung. Im klinischen Alltag besteht der Zweck eines diagnostischen Tests aber nicht darin, Parasiten (-bestandteile) nachzuweisen, sondern den klinischen Verdacht einer Malariaerkrankung zu bestätigen oder auszuschließen.<sup>153</sup> In den meisten Fällen wird aber von einem positiven Testergebnis auf eine akute Malariaerkrankung geschlossen und die Therapieentscheidung davon abhängig gemacht. Dies führt dazu, dass Malaria als Ursache des Fiebers (fälschlich) überdiagnostiziert wird und die wahre ursächliche Krankheit zu spät erkannt und behandelt wird.<sup>154,155</sup> Es werden unnötig häufig Antimalaria-Medikamente eingenommen, was neben unerwünschten Arzneimittelwirkungen für den Patienten zu einer verstärkten Resistenzentwicklung der Plasmodien gegen diese Medikamente führen kann.<sup>119</sup> Außerdem werden dadurch unnötig hohe Kosten verursacht.<sup>52</sup> Perneger *et al.* (2006) schlossen aus ihren Untersuchungen sogar, dass der Nachweis von *P. falciparum*-Parasiten oder deren Produkten im Generellen in Regionen mit einer Malaria-Prävalenz > 20% klinisch unbrauchbar ist.<sup>153</sup> Umso mehr scheint es zweifelhaft, ob einem positiven Testergebnis eines HRP2-detektierenden RDTs aufgrund der langen Persistenz von HRP2 überhaupt eine klinische Relevanz in einer holoendemischen Malariaregion zugesprochen werden kann. Eine ähnliche Auffassung teilen auch Willcox *et al.*<sup>119</sup> Andererseits scheint ein negatives Testergebnis sehr wohl dazu geeignet, Malaria als Ursache des Fiebers auszuschließen.

Dieser Nachteil der HRP2-detektierenden RDTs wurde schon in anderen Studien aufgezeigt, allerdings wurde die Dauer der persistierenden Antigenämie bislang überwiegend niedriger geschätzt.<sup>60,62,150,156,157</sup> Die Ergebnisse unserer Studie zeigen deutlich, dass eine persistierende Antigenämie noch Wochen nach einer erfolgreich behandelten Malariainfektion bestehen kann und der daraus entstehende Nachteil für diese Methode bedeutend ist.

Hingegen können bei Malaria-naiven Patienten (z. B. Reisenden) oder in Regionen mit geringer saisonaler Malariaübertragung HRP2-detektierende RDTs ein gutes diagnostisches Instrument darstellen, da ein positives Testergebnis nahezu immer auf eine akute Malariaerkrankung zurückzuführen ist.<sup>158</sup> Ebenso wahrscheinlich sind HRP2-detektierende RDTs als Screeningmethode gut geeignet, wenn zur Konfirmation eines positiven Testergebnisses ein lichtmikroskopischer Nachweis der Parasitämie durchgeführt wird.

#### 4.2.3 ELISA

Aus den HRP2-Einzelmessungen im ELISA wurde für jeden Patienten eine Eliminationshalbwertszeit errechnet. Aufgrund von zu wenig Probenmaterial oder Erreichen der Nachweisgrenze an Tag 1 konnte die HRP2-Eliminationshalbwertszeit nur für 17 Patienten ermittelt werden. Fünf Patienten hatten im Zeitverlauf zuerst ansteigende HRP2-Werte, erreichten spätestens an Tag 3 den höchsten Messwert und zeigten danach eine Abnahme der HRP2-Werte. Zur Berechnung der Halbwertszeit wurde nur die Elimination des HRP2 untersucht und daher die Abnahme des HRP2 ab dem Erreichen des höchsten Messwertes (Spitzenwertes) betrachtet. Es zeigte sich eine Eliminationskinetik erster Ordnung.

Die HRP2-Eliminationshalbwertszeiten der einzelnen Patienten hatten eine Spannweite zwischen 0,33 bis 11,18 Tagen bei einem Median von 4,05 Tagen (IQR: 2,01 - 5,73 Tage). Dies zeigt eine hohe interindividuelle Varianz der Halbwertszeit. Das Mittel der HRP2-Eliminationshalbwertszeit betrug 4,21 Tage (SD: 3,08 Tage).

Dondorp *et al.* (2005) hatten zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Studie die bis dahin einzige Studie veröffentlicht, in der die *in vivo* Eliminationskinetik von HRP2 untersucht wurde.<sup>9</sup> Im Jahr 2012 veröffentlichten Hendriksen *et al.* eine weitere Studie zur HRP2-Eliminationskinetik.<sup>11</sup> Weitere Studien hierzu wurden unseres Wissens bisher nicht veröffentlicht (Stand: 04.03.2015). Die beiden genannten Studien konnten eine Eliminationskinetik erster Ordnung feststellen, kamen jedoch in Hinsicht auf die Eliminationshalbwertszeit auf sehr unterschiedliche Ergebnisse. Dondorp *et al.* gaben eine mittlere HRP2-Eliminationshalbwertszeit von 3,67 Tagen an, wohingegen Hendriksen *et al.* eine mittlere Eliminationshalbwertszeit von 1,1 Tagen feststellten. Die von uns errechnete mittlere Halbwertszeit liegt mäßig über der von Dondorp *et al.*, jedoch deutlich über der von Hendriksen *et al.*

In den von Dondorp *et al.* und Hendriksen *et al.* veröffentlichten Studien wurden die Patienten bis 21 respektive sieben Tage nach Therapiebeginn beobachtet und es fanden Untersuchungen mit quantitativen HRP2-Messungen nur an sechs respektive drei Zeitpunkten statt (Tag 0, 1, 3, 7, 14, 21 respektive Tag 0, 3, 7). Es ist davon auszugehen, dass unsere Untersuchungen über einen längeren Beobachtungszeitraum mit mehr Einzelmessungen zu genaueren Ergebnissen führen. Zudem sind die Ergebnisse von Dondorp *et al.* auf eine noch kleinere Stichprobe (13 Patienten) zurückzuführen.

Die drei Studien sind allerdings nur bedingt miteinander vergleichbar. Dondorp *et al.* untersuchte ausschließlich erwachsene Patienten in Thailand, von denen 77% eine schwere Malaria hatten. Hendriksen *et al.* untersuchte nur Kinder < 15 Jahren mit schwerer Malaria in Tansania. Im Gegensatz dazu wurden in unsere Studie Kinder und junge Erwachsene im Alter von sechs Monaten bis 25 Jahren eingeschlossen und das Vorliegen von klinischen Zeichen einer schweren Malaria war ein Ausschlusskriterium. Zudem wurde in der vorliegenden Studie das HRP2 aus lysiertem Vollblut bestimmt, während in den beiden anderen Studien das HRP2 im Plasma gemessen wurde.

Es ist denkbar, dass auch nach erfolgreicher Therapie noch HRP2 enthaltende Erythrozyten zirkulieren und das aus ihnen bei der Lyse freigesetzte HRP2 die errechnete Eliminationshalbwertszeit länger erscheinen lässt (vergleiche 4.1.2).

Hingegen ist es eher zweifelhaft, dass sich alleine dadurch der bedeutende Unterschied zwischen der von uns festgestellten mittleren Halbwertszeit von 4,21 Tagen und der von Hendriksen *et al.* ermittelten Halbwertszeit von 1,1 Tagen erklären ließe. Über Ursachen dieser großen Diskrepanz bleibt nur zu spekulieren. Am wahrscheinlichsten sind methodische/technische Unterschiede, z. B. die Verwendung eines anderen ELISA mit einer höheren Nachweisgrenze durch Hendriksen *et al.*, welcher bei vielen HRP2-Kurven früh nur Nullwerte anzeigte und somit die Halbwertszeit kürzer erscheinen ließ. Andererseits kann auch die ausschließliche Untersuchung von Patienten mit schwerer Malaria durch Hendriksen *et al.* Ursache für die Diskrepanz sein. Möglicherweise führt ein durch die Krankheitsschwere verstärkter Stoffwechsel zu einer schnelleren Elimination von HRP2. Theoretisch kann auch eine intensivmedizinische Therapie, z. B. mit parenteraler Therapie, wie sie bei fast allen Patienten mit schwerer Malaria angenommen werden kann, zu einer schnelleren HRP2-Elimination führen. Darüber hinaus ist auch denkbar, dass bei schweren Malariaverläufen das HRP2 schneller in Antikörper-Antigen-Komplexe gebunden wird und somit im ELISA nicht mehr nachweisbar ist. Da die Patienten nur über sieben Tage beobachtet wurden, würden diese eventuellen Ursachen, besonders bei einer anfänglich schnelleren HRP2-Elimination kurz nach Therapiebeginn, die ermittelte Halbwertszeit deutlich zu niedrig erscheinen lassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten keine Abhängigkeit der HRP2-Eliminationshalbwertszeit von Wirtsfaktoren wie Geschlecht und Alter feststellen, noch von Parametern der Krankheitsdauer oder verschiedener Krankheitsausprägungen wie der Anfangsparasitämie. Es lag keine Konzentrationsabhängigkeit vor. Daher scheint es möglich, diese Halbwertszeit als festen Faktor in Modellberechnungen zu übernehmen - bei allen Patienten und bei verschiedensten Ausprägungen von Malariainfektionen.

Mit den in unserer Studie untersuchten Parametern konnten wir die hohe Varianz der Halbwertszeit nicht erklären. Eine Einschränkung unserer Studie könnte in diesem Hinblick die fehlende Untersuchung von Parametern der

Stoffwechselleistung des Individuums sein, z. B. Leberwerte oder insbesondere Nierenwerte. Da Patienten mit klinischen Zeichen einer schweren Malaria ausgeschlossen waren, ist allerdings nicht davon auszugehen, dass bei unseren Patienten eine Nieren- oder Leberfunktionsstörung vorlag. Auch Hendriksen *et al.* konnten keine Korrelation der HRP2-Eliminationshalbwertszeit mit der Nierenfunktion feststellen.<sup>11</sup>

Fünf Patienten zeigten zunächst einen Anstieg der HRP2-Werte bis zu einem Spitzenwert. Diese Patienten hatten eine signifikant längere Eliminationshalbwertszeit als Patienten ohne Spitzenwert. Anhand der untersuchten Parameter kann nicht erklärt werden, warum einige Patienten einen Spitzenwert zeigten und andere nicht. Im Folgenden kann deshalb über mögliche Ursachen nur spekuliert werden. Gravenor *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Sterberate der Parasiten mit unterschiedlichem Entwicklungsalter deutlich variiert und vom gegebenen Medikament abhängig ist.<sup>159</sup> Artesunat wirkt auf frühe Entwicklungsstadien toxischer als auf reife Entwicklungsstadien.<sup>160</sup> Womöglich sind die Parasiten bei den Patienten mit Spitzenwert besser synchronisiert und zum Zeitpunkt der Anfangsmessung (Tag 0) in einer späten Phase des Replikationszyklus. Da das verwendete Medikament weniger toxisch auf reife Parasitenstadien wirkt, könnten sich viele Parasiten noch weiter entwickeln, weitere Erythrozyten infizieren und während ihrer Entwicklung weiterhin HRP2 synthetisieren. Dies würde zu dem gemessenen anfänglichen Anstieg der HRP2-Werte führen. Erst im nächsten Replikationszyklus würden diese Parasiten dann absterben. Der neu beginnende Replikationszyklus mit Infektion von weiteren Erythrozyten könnte durch die verzögerte Parasiten-Clearance auch die längere HRP2-Eliminationshalbwertszeit erklären.

In jedem Fall aber wird hier noch einmal die hohe Varianz der Halbwertszeit zwischen verschiedenen Patienten(-gruppen) deutlich.

Die lange Eliminationshalbwertszeit von HRP2 bedeutet, dass das HRP2 mit fortschreitender Dauer der Infektion im Wirtsorganismus akkumuliert. Das zu einem beliebigen Zeitpunkt gemessene HRP2 spiegelt somit nicht nur die

---

aktuelle Parasitenlast wider. Vielmehr setzt es sich zusammen aus dem HRP2, welches von aktuell vorhandenen Parasiten synthetisiert wurde, und dem HRP2, welches von Parasiten aus vorherigen Entwicklungszyklen synthetisiert wurde. Parasiten aus vorherigen Zyklen könnten aber schon größtenteils durch eine funktionierende Immunantwort, besonders bei bestehender Teilimmunität, eliminiert sein und gar nicht mehr relevant für die Pathogenese und Schwere der Erkrankung zum Messzeitpunkt. Das von ihnen synthetisierte HRP2 zirkuliert dennoch weiterhin in der Blutbahn und wird bei der HRP2-Messung miterfasst. So kann ein hoher HRP2-Messwert, je nach Immunantwort, eine hohe oder niedrige aktuelle Gesamt-Parasitenlast repräsentieren. Im hypothetischen Extremfall liegt einem HRP2-Messwert gar keine aktuelle Parasitenlast mehr zugrunde, wie in folgendem Gedankenexperiment verdeutlicht werden soll: Bei erfolgreicher Antimalaria-Therapie sind meist schon nach drei Tagen keine Parasiten mehr in Blutausstrichen nachweisbar. Es ist möglich, dass trotzdem noch einige Parasiten im Körper vorhanden sind. Allerdings verschwinden auch diese bei erfolgreicher Therapie irgendwann (z. B. nach einer Woche). Nichtsdestotrotz ist zu diesem Zeitpunkt noch HRP2 nachweisbar. Daraus ergibt sich die logische Problematik, dass auch bei nicht-vorhandenen Parasiten HRP2 vorhanden sein kann. Diese Konsequenz ist nun nicht nur bei einer erfolgreichen Therapie, sondern auch bei einem funktionierenden Immunsystem denkbar.

Aufgrund der langen Eliminationshalbwertszeit dient unserer Meinung nach ein HRP2-Messwert zu einem beliebigen Zeitpunkt somit eher als Verlaufsdarstellung einer Malariainfektion. Dies schränkt den Nutzen von HRP2 als diagnostisches Instrument einer aktiven Infektion deutlich ein. Sein Einsatz als Parameter der Schwere einer Malariainfektion erscheint bei klinischen Interventionsstudien sinnvoller, bei denen die Betrachtung der aktuellen und vergangenen Parasitenzahl relevant ist. Dies konnten auch Kifude *et al.* (2008) aus ihren Beobachtungen schlussfolgern.<sup>87</sup>

### 4.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eine signifikante Korrelation des vor Therapiebeginn bestimmten HRP2-Wertes mit der Anfangsparasitämie und dem Anteil an pigmentierten Monozyten als Parameter der Infektionsdauer. Es lässt sich keine Abhängigkeit des HRP2-Wertes vom Geschlecht oder vom Immunitätsstatus vermuten. Somit ist ein Zusammenhang des vor Therapiebeginn gemessenen HRP2 und der Gesamt-Parasitenlast, unabhängig von Wirtsfaktoren, wahrscheinlich. Dies stützt die Annahme von anderen Autoren, dass sich HRP2 als Biomarker für Modellberechnungen der Gesamt-Parasitenlast und somit zur Einschätzung der Schwere der Erkrankung und der Prognose eigne. Allerdings liegen mit einer langen HRP2-Eliminationshalbwertszeit und einer hohen Varianz dieser nicht zu vernachlässigende Einschränkungen solcher Modellberechnungen vor.

Unsere Studie untersuchte schwerpunktmäßig die *in vivo* Eliminationskinetik des HRP2. Wir konnten eine HRP2-Eliminationskinetik erster Ordnung mit einer mittleren Eliminationshalbwertszeit von 4,21 Tagen (SD: 3,08 Tage) feststellen. Dabei lag weder eine Konzentrationsabhängigkeit noch eine Abhängigkeit von Wirtsfaktoren oder verschiedenen Krankheitsausprägungen vor; die errechnete Halbwertszeit erscheint somit allgemeingültig. Jedoch lag eine hohe interindividuelle Varianz der Halbwertszeit vor. Die in unserer Studie untersuchten Parameter konnten diese Varianz nicht erklären.

Eine lange Eliminationshalbwertszeit bedeutet, dass das HRP2 mit zunehmender Infektionsdauer im Wirtsorganismus akkumuliert. Ein hoher gemessener HRP2-Wert vor Therapiebeginn kann also auf eine schon länger andauernde Malariainfektion oder auf eine hohe Parasitenlast zurückzuführen sein. Diese hohe Parasitenlast kann sowohl durch eine schon länger andauernde Infektion und die damit einhergehende größere Anzahl an bereits durchlaufenen Replikationszyklen zustande kommen, als auch durch eine erst seit kurzer Zeit bestehende Infektion, wenn z. B. (noch) keine Teilimmunität besteht oder diese kompromittiert ist. Aufgrund der langen HRP2-Eliminationshalbwertszeit stammt das gemessene HRP2 aus der aktuellen Parasitenlast sowie aus der Parasitenlast der vorangegangenen Replikationszyklen. Dies schränkt die Verwendung

des HRP2 als Biomarker für die aktuelle Gesamt-Parasitenlast und somit als Instrument zur Prognoseeinschätzung bei akuten Infektionen deutlich ein. Auch die festgestellte hohe Varianz der HRP2-Eliminationshalbwertszeit kann Berechnungsmodelle der Gesamt-Parasitenlast anhand des HRP2-Wertes sehr unsicher werden lassen. Es kann jedoch angenommen werden, dass HRP2 als Parameter der Schwere einer Infektion bei klinischen Interventionsstudien dienen kann.

Gleichermaßen stellt die lange HRP2-Eliminationshalbwertszeit ein Problem für die Verwendung von HRP2-detektierenden RDTs als alleiniges Diagnostikum in holoendemischen Malariaregionen dar. In diesen Regionen haben viele Menschen häufig wiederkehrende Malariainfektionen oder eine asymptomatische Parasitämie, d. h. ein zu einem beliebigen Zeitpunkt durchgeführter HRP2-detektierender Schnelltest würde in vielen Fällen ein positives Testergebnis aufzeigen, ohne dass die Person akut erkrankt ist. Vielmehr kann eine persistierende HRP2-Antigenämie auch noch Wochen nach einer erfolgreich behandelten vorangegangenen Malariainfektion für ein positives Testergebnis verantwortlich sein. Treten nun plötzlich Fieber und Krankheitssymptome auf, so wird aber zumeist von einem positiven Testergebnis auf eine akute Malariainfektion als Ursache von Fieber und Krankheitssymptomen geschlossen. Wird eine Therapieentscheidung davon abhängig gemacht, so kann diese Überdiagnose zu einer Übertherapie mit möglichen negativen Folgen für den Patienten und sogar für das gesamte Gesundheitssystem führen. Die Verwendung von RDTs sollte unter diesen Umständen also nur unter der Berücksichtigung der starken Einschränkung dieser Methode verwendet und eine therapeutische Konsequenz daraus abgeleitet werden.

Weitere Studien werden nötig sein um ein noch genaueres Bild der HRP2-Eliminationskinetik zu erhalten. Nach unseren Erkenntnissen erscheint es sinnvoll, die Patienten über einen noch längeren Zeitraum zu beobachten, da nach 28 Tagen noch bei mehr als der Hälfte unserer Patienten HRP2 im Blut nachweisbar war. Auch wäre es interessant bei einer folgenden Studie die ELISA-Untersuchungen mit HRP2-Messungen aus Serum und Plasma zu

wiederholen. Eine weitere Studie könnte die Aussagekraft einer HRP2-Messung bei Patienten untersuchen, die Zeichen einer schweren Malaria aufweisen (z. B. zerebrale Malaria) trotz niedriger peripherer Parasitämie. Die Hypothese, dass diese Patienten einen in Relation zur Parasitämie höheren HRP2-Messwert aufweisen als Patienten mit unkomplizierter Malaria und vergleichbar niedriger Parasitämie oder als Patienten, die an schwerer Erkrankung anderer Genese leiden und zusätzlich eine (asymptomatische) Parasitämie aufweisen, sollte diesbezüglich geprüft werden.

---

## 5 Zusammenfassung

---

**Hintergrund:** Die Malaria ist eine tropische Infektionskrankheit, die von Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird. Jährlich fordert sie etwa 600.000 Menschenleben, wobei die Hauptkrankheitslast von der Bevölkerung afrikanischer Länder südlich der Sahara getragen wird. Besonders schwere Krankheitsverläufe treten bei der Malaria tropica auf, hervorgerufen durch *Plasmodium falciparum*. Wird sie rechtzeitig diagnostiziert und adäquat behandelt, so ist ihre Prognose sehr gut. Reife Blutstadien von *P. falciparum* sequestrieren im Gefäßbett. Dadurch ist nur ein Teil der Gesamt-Parasitenlast durch Ausstriche des peripheren Blutes nachweisbar. Es wird angenommen, dass durch Bestimmung des *P. falciparum*-Proteins *histidine-rich protein 2* (HRP2) im Blut die Gesamt-Parasitenlast besser als im Ausstrich geschätzt und somit auf die Schwere der Erkrankung und auf die Prognose geschlossen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wird die *in vivo* Eliminationskinetik des HRP2 anhand von qualitativen Messungen mittels Schnelltests und quantitativen Messungen mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) sowie mögliche Einflussfaktoren darauf untersucht. Im Anschluss werden Berechnungsmodelle der Gesamt-Parasitenlast und die Eignung von HRP2-detektierenden Schnelltests zur Malariadiagnostik diskutiert.

**Methoden:** Im zentralafrikanischen Gabun wurden 27 Patienten im Alter von 1,2 bis 23,3 Jahren mit unkomplizierter Malaria tropica nach Therapie mit Artesunat/Amodiaquin über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Bei Einschluss in die Studie sowie an neun *Follow-up* Zeitpunkten wurden Blutproben gewonnen, bei denen mittels Lichtmikroskopie die Parasitämie, Gametozytenanzahl und Anteil an pigmentierten Monozyten bestimmt wurden. Außerdem wurde das Blut mit den Malaria-Schnelltests BinaxNOW®Malaria und Paracheck®Pf und einem HRP2-ELISA untersucht.

**Ergebnisse:** Bei Einschluss in die Studie zeigte der im ELISA gemessene HRP2-Wert eine Spannweite von 0,05 bis 33,59 AU bei einem Median von 3,15

AU. Der Anfangs-HRP2-Wert korrelierte signifikant mit der Anfangsparasitämie ( $r_s = 0,609$ ;  $p < 0,002$ ) sowie mit dem Anteil an pigmentierten Monozyten ( $r_s = 0,543$ ;  $p < 0,006$ ). Die HRP2-Elimination kann mit einer Kinetik erster Ordnung beschrieben werden. Die mittlere HRP2-Eliminationshalbwertszeit betrug 4,21 Tage (SD: 3,08 Tage) und war unabhängig von der HRP2-Konzentration, Patientenalter und -geschlecht, der Anfangsparasitämie oder dem Nachweis von Gametozyten. Es lag eine hohe interindividuelle Varianz der Halbwertszeit vor. Die HRP2-detektierenden Schnelltests fielen bei 100% der Patienten bei Einschluss in die Studie positiv aus. Am Ende des Beobachtungszeitraumes hatten noch 55% der Patienten positive Testergebnisse. Die mittlere Dauer der persistierenden HRP2-Antigenämie wurde auf 20,52 Tage (BinaxNOW®Malaria) und 20,76 Tage (Paracheck®Pf) geschätzt und war signifikant mit der Anfangsparasitämie (BinaxNOW®Malaria:  $p < 0,001$ ; Paracheck®Pf:  $p < 0,001$ ) und mit der HRP2-Eliminationshalbwertszeit (BinaxNOW®Malaria:  $p < 0,01$ ; Paracheck®Pf:  $p < 0,008$ ) assoziiert.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse unserer Studie unterstützen die Annahme, dass das vor Therapiebeginn bestimmte HRP2 bedingt zur Berechnung der Gesamt-Parasitenlast verwendet werden kann. Allerdings kommt es durch die lange *in vivo* HRP2-Eliminationshalbwertszeit zu einer Akkumulation des HRP2 im Wirtsorganismus. Somit ist die Verwendung von HRP2 als Biomarker der aktuellen Gesamt-Parasitenlast und folglich der Schwere einer Malariainfektion vor allem in hochendemischen Gebieten eingeschränkt. Auch die hohe Varianz der Halbwertszeit lässt Berechnungsmodelle unsicher werden.

Die Resultate der vorliegenden Studie zeigen deutlich, dass aufgrund der langen persistierenden HRP2-Antigenämie die diagnostische Aussagekraft von HRP2-detektierenden Schnelltests in einer Region mit holoendemischer Malaria tropica deutlich eingeschränkt ist. Ein signifikanter Teil positiver Testergebnisse kann durch persistierendes zirkulierendes HRP2 nach vorangegangener, erfolgreich therapierter Infektion entstehen. Die Anwendung von solchen Tests im klinischen Umfeld und die Ableitung einer therapeutischen Konsequenz sollten kritisch geschehen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. World Health Organization. World Malaria Report 2014 [Internet]. 2014. Available from: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/)
2. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit. AWMF-Leitlinie : Diagnostik und Therapie der Malaria [Internet]. 2014. Available from: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/042-001.html>
3. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4(1):e2012026.
4. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A Review of Malaria Diagnostic Tools : Microscopy and Rapid Diagnostic Test ( RDT ). *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(2):119–27.
5. Silamut K, Phu NH, et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol* 1999;155:395–410.
6. Beeson JG, Amin N, Kanjala M, Rogerson SJ. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun* 2002;70:5412–5.
7. Miller LH, Baruch DI, Marsh K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415(February):673–9.
8. Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol* 2004;20(12):597–603.
9. Dondorp AM, Desakorn V, et al. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. *PLoS Med* 2005;2(8):e204.
10. Marquart L, Butterworth A, McCarthy JS, Gatton ML. Modelling the dynamics of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in human malaria to better understand malaria rapid diagnostic test performance. *Malar J* 2012;11(1):74.
11. Hendriksen ICE, Mwanga-Amumpaire J, et al. Diagnosing severe falciparum malaria in parasitaemic African children: a prospective evaluation of plasma PfHRP2 measurement. *PLoS Med* 2012;9(8):e1001297.
12. Chavatte JM, Chiron F, Chabaud A, Landau I. Probable speciations by “host-vector ‘fidelity’”: 14 species of *Plasmodium* from magpies. *Parasite* 2007;14(1):21–37.
13. World Health Organization. Malaria Fact sheet No 94 [Internet]. 2014;1–8. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
14. Pain A, Böhme U, et al. The genome of the simian and human malaria

- parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 2008;455(7214):799–803.
15. Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: A Malaria Parasite of Monkeys and Humans. *Annu Rev Entomol* 2012;57:107–21.
  16. Warren M, Bennett GF, Sandosham AA, Coatney GR. *Plasmodium eylesi* sp. nov., a tertian malaria parasite from the white-handed gibbon, *Hylobates lar*. *Ann Trop Med Parasitol* 1965;59:500–8.
  17. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG, Division of Parasitic Disease producer. CD-ROM. The primates malarias [original book published 1971]. Version 1. Atlanta, GA: CDC: 2003.
  18. Wiser MF. *Plasmodium* Life Cycle [Internet]. 2013;(5):1–4. Available from: [http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/mal\\_lc.PDF](http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/mal_lc.PDF)
  19. Centers for Disease Control and Prevention. Anopheles Mosquitoes [Internet]. 2012; Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>
  20. Killeen GF, Seyoum A, et al. Eliminating malaria vectors. *Parasit Vectors* 2013;6(1):172.
  21. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice*. 1st ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1999.
  22. White NJ, Ho M. The pathophysiology of malaria. *Adv Parasitol* 1992;31:83–173.
  23. van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* 2006;22(11):503–8.
  24. Luse S, Miller L. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* 1971;20(5):655–60.
  25. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 1985;119:385–401.
  26. Baruch DI, Pasloske BL, et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 1995;82:77–87.
  27. Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: Defining the ties that bind. *Microbes Infect* 2003;5(10):897–909.
  28. Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* 2000;16:228–32.
  29. Idro R, Jenkins NE, Newton CRJC. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* 2005;4(December):827–40.

30. Clark IA, Cowden WB. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther* 2003;99:221–60.
31. Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 2005;130 Suppl:S45–62.
32. Franke-Fayard B, Fonager J, Braks A, Khan SM, Janse CJ. Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria ? *PLoS Pathog* 2010;6(9).
33. Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: Pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop* 2004;89:309–17.
34. Handunnetti SM, David PH, Perera KLRL, Mendis KN. Uninfected erythrocytes form “rosettes” around Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:115–8.
35. Roberts DJ, Pain A, Kai O, Kortok M, Marsh K. Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity. *Lancet* 2000;355:1427–8.
36. Pain A, Ferguson DJ, et al. Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1805–10.
37. Glenister FK, Coppel RL, Cowman AF, Mohandas N, Cooke BM. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* 2002;99(3):1060–3.
38. Dondorp AM, Nyanoti M, Kager PA, Mithwani S, Vreeken J, Marsh K. The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(3):282–6.
39. Langreth SG, Peterson E. Pathogenicity, stability, and immunogenicity of a knobless clone of Plasmodium falciparum in Colombian owl monkeys. *Infect Immun* 1985;47:760–6.
40. Field JW. Blood examination and prognosis in acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1949;43(1):33–48.
41. Silamut K, White NJ. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87(4):436–43.
42. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care* 2003;7(4):315–23.
43. Desakorn V, Silamut K, et al. Semi-quantitative measurement of Plasmodium falciparum antigen PfHRP2 in blood and plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91:479–83.
44. Löscher T, Burchard G-D. Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise- und Migrationsmedizin. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG;

- 2010.
45. Keystone JS. Immigrants returning home to visit friends and relatives (VFRs). In: CDC Health information for international travel 2012. New York: Oxford University Press; 2012. p. 547–51.
  46. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2010.
  47. Taylor TE, Borgstein A, Molyneux ME. Acid-base status in pediatric Plasmodium falciparum malaria. *Q J Med* 1993;86(2):99–109.
  48. English M, Waruiru C, Amukoye E, Murphy S. Deep breathing in children with severe malaria: indicator of metabolic acidosis and poor outcome. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(5):521–4.
  49. Giemsa G. Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. *Cent für Bakteriol I Abteilung* 32 1904;307–13.
  50. Fleischer B. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. *Trop Med Int Health* 2004;9(7):755–6.
  51. Planche T, Krishna S, et al. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(5):599–602.
  52. Zurovac D, Midia B, Ochola S a, English M, Snow RW. Microscopy and outpatient malaria case management among older children and adults in Kenya. *Trop Med Int Health* 2006;11(4):432–40.
  53. WHO. Antimalarial Drug Combination Therapy. Report of a WHO Technical Consultation [Internet]. Geneva: 2001. Available from: [whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_CDS\\_RBM\\_2001.35.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_RBM_2001.35.pdf)
  54. Bloland PB, Lackritz EM, Kazembe PN, Were JB, Steketee R, Campbell CC. Beyond chloroquine: implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *J Infect Dis* 1993;167(4):932–7.
  55. Bloland PB, Ettlign M. Making malaria-treatment policy in the face of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93(1):5–23.
  56. Wilson ML. Laboratory diagnosis of malaria: conventional and rapid diagnostic methods. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(6):805–11.
  57. Barnish G, Bates I, Iboru J. Newer drug combinations for malaria. *BMJ* 2004;328(7455):1511–2.
  58. Bell D, Wongsrichanalai C, Barnwell J. Ensuring quality and access for malaria diagnosis- how can it be achieved? *Nat Rev Microbiol* 2006;4(9):682–95.
  59. Mboera L, Fanello C, et al. Comparison of the Paracheck-Pf test with microscopy, for the confirmation of Plasmodium falciparum malaria in Tanzania. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100(2):115–22.
  60. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Looareesuwan S, White

- NJ. Persistence of Plasmodium falciparum HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(2):179–82.
61. Grobusch MP, Hänscheid T, et al. Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travellers returning to Berlin, Germany. *Parasitol Res* 2003;89:354–7.
62. Iqbal J, Siddique A, Jameel M, Hira PR. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of Plasmodium falciparum monoinfection. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):4237–41.
63. Kyabayinze DJ, Tibenderana JK, Odong GW, Rwakimari JB, Counihan H. Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for Plasmodium falciparum malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malar J* 2008;7:221.
64. Abba K, Deeks JJ, et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated P. falciparum malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;CD008122.
65. Grobusch MP, Jelinek T, et al. False positivity of rapid antigen detection tests for diagnosis of Plasmodium falciparum malaria: Issue appears to be more complicated than presented. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3781–2.
66. Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, Jelinek T, Warhurst D. False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet* 1999;353(9149):297.
67. Iqbal J, Sher a., Rab a. Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: Cross-reactivity with rheumatoid factors. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1184–6.
68. Grobusch M, Hänscheid T, Zoller T. Rapid immunochromatographic malarial antigen detection unreliable for detecting Plasmodium malariae and plasmodium ovale. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(11):818–20.
69. World Health Organization. Universal access to malaria diagnostic testing. An operational manual [Internet]. 2011;12(1). Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502092\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502092_eng.pdf)
70. Greiner Bio-One GmbH. ELISA Platten [Internet]. 2014; Available from: [https://shop.gbo.com/de/germany/articles/catalogue/article-groups/0110\\_0040\\_0060/](https://shop.gbo.com/de/germany/articles/catalogue/article-groups/0110_0040_0060/)
71. Doderer C, Heschung A, et al. A new ELISA kit which uses a combination of Plasmodium falciparum extract and recombinant Plasmodium vivax antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J* 2007;6:19.
72. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335–50.
73. Gilles H. Diagnostic methods in malaria. In: Gilles H, Warrell D, editors.

- Bruce Chwatt's Essential Malariology. New York: Oxford University Press; 1993. p. 78–95.
74. Srinivasan S, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of blood-film microscopy, the OptiMAL dipstick, Rhodamine-123 fluorescence staining and PCR, for monitoring antimalarial treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 2000;94(3):227–32.
  75. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(1):66–78.
  76. Notomi T, Okayama H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):E63.
  77. Poon L, Wong B, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem* 2006;52(2):303–6.
  78. Hopkins H, González IJ, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: Performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis* 2013;208:645–52.
  79. Han ET, Watanabe R, et al. Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2007;45(8):2521–8.
  80. Rock E, Marsh K, Saul A, Wellems T. Comparative analysis of the Plasmodium falciparum histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology* 1987;95(Pt 2):209–27.
  81. Genton B, Paget S, Beck H. Diagnosis of Plasmodium falciparum infection using Parasight(R)F-test in blood an urine of Papua New Guinean children. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal* 1998;29(1):35–40.
  82. Beadle C, Long G, Weiss W. Diagnosis of malaria by detection of plasmodium falciparum HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* 1994;343(8897):564–8.
  83. Adesanmi T, Okafur H, Okoro A, Mafe A. Diagnosis of malaria parasitemia in children using a rapid diagnostic test. *Niger J Clin Pract* 2011;14(2):195–200.
  84. Sullivan DJ, Gluzman I, Goldberg D. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science (80- )* 1996;271(5246):219–22.
  85. Lopez R, Urquiza M, Curtidor H. Plasmodium falciparum: red blood cell binding studies of peptides derived from histidine-rich KAHRP-I, HRP-II and HRP-III proteins. *Acta Trop* 2000;75(3):349–59.
  86. Desakorn V, Dondorp AM, et al. Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005;99(7):517–24.

87. Kifude CM, Rajasekariah HG, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in blood, plasma, and serum. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(6):1012–8.
88. Reader's Digest. Weltatlas. deutsche S. The Reader's Digest Association Limited, London; 2004.
89. Fischer Weltalmanach. Länderkennzahlen Gabun [Internet]. 2013;(0). Available from: <http://www.weltalmanach.de/staaten/details/gabun/>
90. CIA. The World Factbook: Gabon [Internet]. 2013; Available from: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/gb.html>
91. Centre d'échange d'informations de la République Gabonaise. Caractéristiques physiques du Gabon [Internet]. Available from: <http://bch-cbd.naturalsciences.be/gabon/gabondef/contribution/documentsnat/strategienat/part1chapa.htm>
92. Warne S. Chapter 1: background & history. In: Gabon, Sao Tome & Principe: The Bradt Travel Guide. Chalfont St Peter: Bradt Travel Guides Ltd; 2007. p. 5.
93. Climate Charts - World Climate. Lambarene, Gabon: Climate, Global Warming, and Daylight Charts and Data [Internet]. Available from: <http://www.climate-charts.com/Locations/g/GN64551.php>
94. Wikipedia. Liste der Städte in Gabun [Internet]. 2013; Available from: [http://de.wikipedia.org/wiki/Liste\\_der\\_Städte\\_in\\_Gabun](http://de.wikipedia.org/wiki/Liste_der_Städte_in_Gabun)
95. Gabonews. Présentation du Moyen-Ogooué: Lambaréné, ville mondialement connue à travers l'hôpital du célèbre Docteur Albert Schweitzer [Internet]. 2010; Available from: <http://www.bdpgabon.org/articles/2010/03/10/presentation-du-moyen-ogooe-lambarene-ville-mondialement-con nue-a-travers-lhopital-du-celebre-docteur-albert-schweitzer/#.UUst3HjrZII>
96. Wikipedia. Liste der Fernstraßen in Gabun [Internet]. 2012; Available from: [http://de.wikipedia.org/wiki/Liste\\_der\\_Fernstraßen\\_in\\_Gabun](http://de.wikipedia.org/wiki/Liste_der_Fernstraßen_in_Gabun)
97. Association Internationale Schweitzer Lambaréné. Albert Schweitzer, Biografie [Internet]. 2013; Available from: <http://www.schweitzer.org/2012/de/leben-und-werk/albert-schweitzer/biografie-kurz?limitstart=0>
98. Fondation Internationale de l'hôpital Albert Schweitzer Lambaréné. L'hôpital aujourd'hui [Internet]. 2013; Available from: [http://www.schweitzerlambarene.org/images/stories/pdf/lhopital\\_aujourd'hui.pdf](http://www.schweitzerlambarene.org/images/stories/pdf/lhopital_aujourd'hui.pdf)
99. Medical Research Unit Lambaréné Gabon. Medical Research Unit Albert Schweitzer Hospital Lambaréné, Gabon. About us [Internet]. 2010; Available from: [http://www.uni-tuebingen.de/delta/daten/foundation\\_f.html](http://www.uni-tuebingen.de/delta/daten/foundation_f.html)
100. Medical Research Unit Lambaréné Gabon. Medical Research Unit Albert

- Schweitzer Hospital Lambaréné Gabon. Research Areas [Internet]. 2010; Available from: [http://www.uni-tuebingen.de/delta/daten/research\\_f.html](http://www.uni-tuebingen.de/delta/daten/research_f.html)
101. Wildling E, Winkler S, Kreamsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop Med Parasitol* 1995;46(2):77–82.
  102. Sylla EHK, Kun JFJ, Kreamsner PG. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94(6):652–6.
  103. Sylla EHK, Lell B, Kreamsner PG, Kun J. Plasmodium falciparum transmission intensity and infection rates in children in Gabon. *Parasitol Res* 2001;87(7):530–3.
  104. Thera M a, Plowe C V. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu Rev Med* 2012;63:345–57.
  105. World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. [Internet]. 59th WMA Gen. Assem. 2008;8(3). Available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>
  106. World Health Organization. Handbook For Good Clinical Practice [Internet]. 2002; Available from: [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/safety\\_efficacy/gcp1.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/gcp1.pdf)
  107. May J. Malaria. In: Jelinek T, editor. Kursbuch Reisemedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2012. p. 84–106.
  108. Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in African children- a randomized multicentre trail. *Lancet* 2002;359(9315):1365–72.
  109. Yeka A, Lameyre V, et al. Efficacy and Safety of Fixed-Dose Artesunate-Amodiaquine vs. Artemether-Lumefantrine for Repeated Treatment of Uncomplicated Malaria in Ugandan Children. *PLoS One* 2014;9(12):e1113311.
  110. Djallé D, Njuimo SP, Manirakiza A, Laganier R, Le Faou A, Rogier C. Efficacy and safety of artemether + lumefantrine, artesunate + sulphamethoxypyrazine-pyrimethamine and artesunate + amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine + amodiaquine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Bangui, Central African Re. *Malar J* 2014;13:9.
  111. Ouldabdallahi M, Alew I, et al. Efficacy of artesunate-amodiaquine for the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria in southern Mauritania. *Malar J* 2014;13(1):496.
  112. Schramm B, Valeh P, et al. Efficacy of artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine fixed-dose combinations for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria among children aged six

- to 59 months in Nimba County, Liberia: an open-label randomized non-inferiority. *Malar J* 2013;12:251.
113. Nsimba B, Guiyedi V, et al. Sulphadoxine/pyrimethamine versus amodiaquine for treating uncomplicated childhood malaria in Gabon: a randomized trial to guide national policy. *Malar J* 2008;7:31.
  114. Dugue M. Overview of present WHO recommendations for first and second line treatment for malaria [Internet]. 2006;Available from: [www.unicef.org/supply/files/WHO\\_MMSS.pdf](http://www.unicef.org/supply/files/WHO_MMSS.pdf)
  115. Morris C a, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin C-S, Fleckenstein L. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J* 2011;10(1):263.
  116. Orrell C, Little F, et al. Pharmacokinetics and tolerability of artesunate and amodiaquine alone and in combination in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(7):683–90.
  117. Krishna S, White NJ. Pharmacokinetics of Quinine, Chloroquine and Amodiaquine. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1996;30(4):263–99.
  118. The tulip group India. Paracheck Pf report. A compendium of decade long performance data [Internet]. 2009;Available from: [http://www.tulipgroup.com/Common\\_New/FAQ/PARACHECK PF REPORT.pdf](http://www.tulipgroup.com/Common_New/FAQ/PARACHECK PF REPORT.pdf)
  119. Willcox ML, Sanogo F, et al. Rapid diagnostic tests for the home-based management of malaria, in a high-transmission area. *Ann Trop Med Parasitol* 2009;103(1):3–16.
  120. Nigussie D, Legesse M, Animut A, H/Mariam A, Mulu A. Evaluation of Paracheck pf o and Parascreen pan/pf o tests for the diagnosis of malaria in an endemic area, South Ethiopia. *Ethiop Med J* 2008;46(4):375–81.
  121. Sharew B, Legesse M, Animut A, Jima D, Medhin G, Erko B. Evaluation of the performance of CareStart Malaria Pf/Pv Combo and Paracheck Pf tests for the diagnosis of malaria in Wondo Genet, southern Ethiopia. *Acta Trop* 2009;111(3):321–4.
  122. Binax Inc. BinaxNOW® Malaria Test Kit Product Instructions. 2007.
  123. Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple Histidine-Rich Protein 2 Double-Site Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3575–7.
  124. Brosius F. Explorative Datenanalyse. Test auf Gleichheit der Varianzen. In: SPSS 19. Heidelberg, München, Landsberg, Frechen, Hamburg: Verlagsgruppe Hüthig-Jehle-Rehm GmbH; 2011. p. 405.
  125. Trape JF, Zoulani A, Quinet MC. Assessment of the incidence and prevalence of clinicial malaria in semi-immune children exposed to intense and perennial transmission. *Am J Epidemiol* 1987;126(2):193–201.

126. Hogh B. Clinical and parasitological studies on immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996;102:1–53.
127. Hviid L. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Trop* 2005;95(3):270–5.
128. WHO. WHO Child growth standards [Internet]. 2006 [cited 2015 Jan 27];Available from: <http://www.who.int/childgrowth/standards/en/>
129. WHO. WHO growth reference data for 5-19 years [Internet]. 2007 [cited 2015 Jan 27];Available from: <http://www.who.int/growthref/en/>
130. Schwarz NG, Grobusch MP, et al. WHO 2006 child growth standards: implications for the prevalence of stunting and underweight-for-age in a birth cohort of Gabonese children in comparison to the Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts and the National Center for Heal. *Public Health Nutr* 2008;11(7):714–9.
131. Eichner M, Diebner HH, Molineaux L, Collins WE, Jeffery GM, Dietz K. Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(5):497–501.
132. Abuaku B, Duah N, Quaye L, Quashie N, Koram K. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine combination in the treatment of uncomplicated malaria among children under five years of age in three ecological zones in Ghana. *Malar J* 2012;11(1):388.
133. van den Broek I, Amsalu R, et al. Efficacy of two artemisinin combination therapies for uncomplicated *falciparum* malaria in children under 5 years, Malakal, Upper Nile, Sudan. *Malar J* 2005;4:14.
134. Dunyo S, Milligan P, Edwards T, Sutherland C, Targett G, Pinder M. Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin Trials* 2006;1(4):e20.
135. Bousema JT, Schneider P, et al. Moderate Effect of Artemisinin-Based Combination Therapy on Transmission of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 2006;193:1151–9.
136. Shekalaghe S, Drakeley C, et al. Primaquine clears submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate. *PLoS One* 2007;2(10):e1023.
137. Bousema T, Okell L, et al. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malar J* 2010;9:136.
138. Metzger WG, Mordmüller BG, Kremsner PG. Malaria pigment in leukocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89(6):637–8.
139. Lyke K, Diallo D, Dicko A. Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(3):253–9.

140. Kremsner PG, Valim C, et al. Prognostic value of circulating pigmented cells in African children with malaria. *J Infect Dis* 2009;199(1):142–50.
141. Day NP, Pham TD, Phan TL, Dinh XS. Clearance Kinetics of Parasites and Pigment-Containing Leukocytes in Severe Malaria. *Blood* 1996;88(12):4694–700.
142. Sanofi-Aventis. Artesunate/Amodiaquine tablets, (Sanofi-Aventis), Summary of Product Characteristics [Internet]. Gentilly, France: 2012. Available from: <http://apps.who.int/prequal/whopar/whoparproducts/MA056-58part4v2.pdf>
143. Délicat-Loembet LM, Elguero E, et al. Prevalance of the sickle cell trait in Gabon- a nationwide study. *Infect Genet Evol* 2014;25:52–6.
144. Marsh K, Forster D, et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med* 1995;332(21):1399–404.
145. Jaffar S, Van Hensbroek MB, Palmer A, Schneider G, Greenwood B. Predictors of a fatal outcome following childhood cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57(1):20–4.
146. Gonçalves BP, Huang C-Y, et al. Parasite Burden and Severity of Malaria in Tanzanian Children. *N Engl J Med* 2014;370(19):1799–808.
147. Ghanchi NK, Beg M a, Hussain R. Estimation of parasite load using Rapid diagnostic test ICT Now Malaria P.f/P.v in Plasmodium falciparum malaria. *Scand J Infect Dis* 2009;41(May):597–601.
148. Martin SK, Rajasekariah GH, Awinda G, Waitumbi J, Kifude C. Unified parasite lactate dehydrogenase and histidine-rich protein ELISA for quantification of Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80(4):516–22.
149. Namsiripongpun V, Wilde H, Pamsandang P, Tiersansern P. Field study of an antigen-detection ELISA specific for Plasmodium falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87(1):32–4.
150. Tjitra E, Suprianto S, McBroom J, Currie BJ, Anstey NM. Persistent ICT malaria P.f/P.v Panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of Plasmodium falciparum malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of Plasmodium vivax in convalescence. *J Clin Microbiol* 2001;39(3):1025–31.
151. Vakharia S, Gopinathan N, Kshirsagar NA. The ParaSight-F test for detecting treatment failure. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91(4):490–1.
152. Drakeley C, Sutherland C, Bousema JT, Sauerwein RW, Targett G a T. The epidemiology of Plasmodium falciparum gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends Parasitol* 2006;22(9):424–30.
153. Perneger T V, Szeless T, Rougemont A. Utility of the detection of Plasmodium parasites for the diagnosis of malaria in endemic areas. *BMC Infect Dis* 2006;6:81.
154. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT. Malaria. *Lancet* 2005;365:1487–98.

- 
155. Reyburn H, Mbatia R, et al. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ* 2004;329(November):1212.
  156. 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(6):646–8.
  157. Gogtay NJ, Dalvi SS, et al. Diagnostic and prognostic utility of rapid strip (Optimal and Paracheck) versus conventional smear microscopy in adult patients of acute, uncomplicated P. falciparum malaria in Mumbai, India. *J Assoc Physicians India* 2003;51:762–5.
  158. Marx A, Pewsner D, et al. Meta-analysis: Accuracy of rapid tests for malaria in travelers returning from endemic areas. *Ann Intern Med* 2005;142(10):836–46.
  159. Gravenor MB, Lloyd AL, et al. A model for estimating total parasite load in falciparum malaria patients. *J Theor Biol* 2002;217:137–48.
  160. Held J, Gebru T, et al. Antimalarial Activity of the Myxobacterial Macrolide Chlorotonil A. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(11):6378–84.

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: <i>Plasmodium</i> -Lebenszyklus.....	9
<a href="http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html">http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html</a> public Domain, eingesehen am 10.03.2015	
Abbildung 2: Objektträger mit Blutausstrich für die Malariadiagnostik .....	17
Public Health Image Library, ID#:5896 ( <a href="http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/20041018/eb227540263a40758fc96a857f26b9d1/5896_lores.jpg">http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/20041018/eb227540263a40758fc96a857f26b9d1/5896_lores.jpg</a> ) public Domain, eingesehen am 10.03.2015	
Abbildung 3: Dünner Blutausstrich mit <i>Plasmodium falciparum</i> .....	18
Public Health Image Library, ID#:5939 ( <a href="http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/20040709/cfed0d4131b1411ea34f047ef7345fe2/5939_lores.jpg">http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/20040709/cfed0d4131b1411ea34f047ef7345fe2/5939_lores.jpg</a> ) public Domain, eingesehen am 10.03.2015	
Abbildung 4: Gabun in Afrika.....	26
<a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabon_in_Africa_(-mini_map_rivers).svg">http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabon_in_Africa_(-mini_map_rivers).svg</a> public Domain, eingesehen am 11.03.2015	
Abbildung 5: Gabun Karte politisch .....	26
<a href="http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabun-karte-politisch.png">http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gabun-karte-politisch.png</a> public Domain, eingesehen am 11.03.2015	
Abbildung 6: Ablauf der Studie.....	36
Abbildung 7: Studien-Flussdiagramm .....	49
Abbildung 8: Verlauf der Parasitämien im Blutausstrich .....	51
Abbildung 9: Verlauf der Positivität der Parasitämien im Blutausstrich.....	51
Abbildung 10: Verlauf der Gametozytämien im Blutausstrich .....	52
Abbildung 11: Verlauf der Positivität der RDTs .....	54
Abbildung 12: Verlauf der HRP2-Messungen (ELISA).....	55
Abbildung 13: Verlauf der Positivität der HRP2-ELISA .....	56
Abbildung 14: Verlauf der Positivität der RDTs vs. HRP2-ELISA .....	57

---

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Dosis und Einnahmeschemata von Coarsucam® .....	37
Tabelle 2: Patientencharakteristika bei Einschluss in die Studie .....	46
Tabelle 3: Korrelationen der Anfangsparasitämie und des Anfangs-HRP2- Wertes mit Alter, Fiebertagen und Testergebnissen bei Einschluss in die Studie .....	47
Tabelle 4: Vergleich der Mittelwerte der Anfangsparasitämie und des Anfangs- HRP2-Wertes jeweils im Hinblick auf Geschlecht, Splenomegalie und Gametozyten an Tag 0 .....	48
Tabelle 5: Korrelationen der HRP2-Eliminationshalbwertszeit .....	58
Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte der HRP2-Eliminationshalbwertszeit jeweils im Hinblick auf Geschlecht, Splenomegalie und Gametozyten an Tag 0 .....	58
Tabelle 7: Vergleich der Mittelwerte bzw. Häufigkeiten bei Patienten „mit Spitzenwert“ vs. „ohne Spitzenwert“ der HRP2-Werte im Verlauf ....	59

---

## Erklärung zum Eigenanteil

---

Die Doktorandin Saskia Breil hat im Rahmen ihrer Tätigkeit im Forschungslabor am Albert-Schweitzer Krankenhaus (Lambaréné, Gabun) des Instituts für Tropenmedizin Tübingen maßgeblich an der Durchführung der oben genannten Studie mitgewirkt und die gewonnenen Daten ausgewertet.

Frieder Schaumburg, Pablo Martinez de Salazar und Thorsten Rieck konzipierten die Studie, schrieben das Studienprotokoll und erarbeiteten den Antrag an die zuständige Ethikkommission in Lambaréné. Das Screening, die Patientenbetreuung und die Probengewinnung sowie die Anfertigung und Färbung der Blutausstriche, die lichtmikroskopischen Untersuchungen und Schnelltests wurden von Frieder Schaumburg, Pablo Martinez de Salazar, Johannes Behringer und Saskia Breil durchgeführt. Zuletzt geschahen Patientenbetreuung, Probengewinnung sowie Anfertigung und Färbung der Blutausstriche allein durch Saskia Breil. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen und Schnelltests wurden von Saskia Breil, Léonce Massoussa Mbadinga und Ariane Carine Ntseyi durchgeführt. Die PCR wurden durch Anne Marie Nkoma Mouima durchgeführt.

Saskia Breil arbeitete sich selbständig in die verwendeten Labormethoden ein; das Erlernen der ELISA-Technik geschah unter Anleitung von Jana Held. Hierbei führte Saskia Breil eigenständig Vorexperimente durch und erstellte die Standardkurve unter Beratung durch Rolf Fendel. Aufgrund technischer Probleme wurden die ELISA-Experimente in Tübingen durch Rolf Fendel wiederholt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Saskia Breil unter Mithilfe von Johanna Haß und Beratung durch Benjamin Mordmüller.

Benjamin Mordmüller, Bertrand Lell und Peter Gottfried Kreamsner betreuten die Studie in Form von beratender und technischer Unterstützung.

---

## Danksagung

---

Für die Unterstützung während meiner Promotion gilt sehr vielen Menschen mein herzlicher Dank.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Benjamin Mordmüller für die hervorragende Betreuung während der Arbeit in Lambaréné und Tübingen sowie bei der Dissertation. Danke für viele Erklärungen, wertvolle Anregungen und ausgiebige Diskussionen. Ich danke Prof. Dr. Peter Gottfried Kreamer für die Ermöglichung des Aufenthaltes in Lambaréné, die großzügige Überlassung des Themas und nützliche Ratschläge während der Studie. Mein Dank gilt PD Dr. Frieder Schaumburg, Pablo Martinez de Salazar und Dr. Johannes Behringer für die Ermöglichung der Mitarbeit an der Studie und ihre Erklärungen. Für die Unterstützung bei der Laborarbeit danke ich allen Mitarbeitern, insbesondere Léonce Massoussa Mbadinga, Ariane Carine Ntseyi und Anne Marie Nkoma Mouima. Ich danke Dr. Jana Held, die mir geduldig die ELISA-Technik beigebracht hat und mir bei der Anfertigung mit Rat und Tat zur Seite stand. Dr. Rolf Fendel gilt mein besonderer Dank für die wertvollen Ratschläge bezüglich der ELISAs und die Wiederholung der Messungen in Tübingen. Ich danke Dr. Bertrand Lell, der mir bei der Durchführung der Studie in Lambaréné beratend zur Seite stand. Ebenso gilt mein herzlicher Dank Dr. Johanna Haß für die immer prompte und unkomplizierte Hilfe bei der statistischen Auswertung und das Korrekturlesen der Dissertation.

Ich danke allen Studienteilnehmern und ihren Eltern für die Teilnahme an dieser Studie. Sie haben die Studie erst ermöglicht und mir zudem einen tiefen Einblick in das Leben in Gabun und ihre Kultur gewährt und die Liebe zu diesem Land ins Herz gelegt.

Neben der fachlichen Unterstützung danke ich auch denjenigen, die mir während meiner Promotion menschlich zur Seite standen. Ich danke meinen Mitdoktoranden, Kollegen, Mitbewohnern und Freunden in Lambaréné, mit denen ich außerhalb des Labors gelebt, entdeckt, diskutiert, gefeiert und viel Zeit verbracht habe. Durch euch ist Lambaréné ein Stück Heimat geworden. Ebenso danke ich meinen Mitbewohnern und Freunden in Deutschland, die mich in den letzten Jahren begleitet und so alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit miterlebt haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Carmen und Wolfgang Landmann, meinem Mann Thomas und meinen Kindern Lucas und Luana. Ihr habt mich stets in allen Vorhaben uneingeschränkt unterstützt und immer an mich geglaubt. Mama und Papa, ohne euer bereitwilliges Angebot, meine Kinder zu betreuen, hätte ich diese Doktorarbeit nie zu Ende bringen können. Auch meinen Schwiegereltern Helene und Franz-Josef Breil danke ich von Herzen für ihre Unterstützung. Thomas, Lucas und Luana, ich danke euch für eure Liebe, eure aufmunternde gute Laune und immer neue Ermutigung. Ihr wart mir die größte Motivation, strukturiert und zu festen Zeiten an der Dissertation zu arbeiten. Es war wunderbar zu wissen, dass nach einem Tag am Schreibtisch Kinderlachen auf mich wartet und das Betrachten eines Käfers im Gras im Augenblick wichtiger sein kann als jede große Wissenschaft.