



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Die molekulare Bestätigung der hohen Prävalenz von
asymptomatischer Malaria in Bangladesch“

Verfasserin

Verena Elisabeth Habler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, im Oktober 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 439

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Zoologie

Betreuerin: Univ.-Prof. Dr. Christine Fellner (ehem. Frank)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Geschichte der Malaria.....	2
1.2. Systematik der Malariaerreger.....	3
1.3. Malaria - Einblick in die Plasmodienarten.....	4
1.4. Plasmodienarten.....	6
1.4.1. <i>Plasmodium falciparum</i>	6
1.4.1.1. Krankheitsverlauf.....	8
1.4.2. <i>Plasmodium vivax</i>	9
1.4.2.1. Krankheitsverlauf.....	10
1.4.3. <i>Plasmodium malariae</i>	11
1.4.3.1. Krankheitsverlauf.....	12
1.4.4. <i>Plasmodium ovale</i>	12
1.4.4.1. Krankheitsverlauf.....	14
1.4.5. <i>Plasmodium knowlesi</i>	14
1.4.5.1. Krankheitsverlauf.....	16
1.5. Bangladesch - staatliche Gliederung und Lage des Landes.....	16
1.6. Zielsetzung der Diplomarbeit.....	19
2. Material und Methodik.....	20
2.1. Material.....	20
2.2. Methodik.....	20
2.2.1. Auswahl der Studienteilnehmer.....	20
2.2.2. Mikroskop.....	21
2.2.3. Rapid Diagnostic Test.....	21
2.2.4. Molekulare Methode.....	21
2.2.4.1. DNA-Isolierung.....	21
2.2.4.2. Schritte der Nested PCR für <i>Plasmodium</i> spp. Arten.....	23
2.2.4.2.1. Primer – Nested PCR.....	23
2.2.4.2.2. Verdünnung Primer.....	24
2.2.4.2.3. Vorbereitung der DNA-Leiter.....	25
2.2.4.2.4. PCR-Analyse.....	25
a.) NEST 1 PCR.....	25
b.) NEST 2-Reaktionen (Gattungsspezifisch).....	26

c.) NEST 2 (Artspezifisch).....	26
2.2.4.2.5. Amplifikationsreaktion.....	27
2.2.4.2.6. Gel-Elektrophorese.....	28
2.2.4.2.7. Interpretation der Ergebnisse.....	29
2.2.4.2.8. Auswertung.....	30
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Geschlechterverteilung der Studienteilnehmer.....	33
3.2. Altersvergleich der Studienteilnehmer.....	33
3.3. Rapid Diagnostic Test.....	34
3.3.1. Allgemeine Durchführung des RDT.....	34
3.3.2. Detailergebnisse des RDT.....	34
3.3.3. RDT im Vergleich mit Mikroskopie.....	35
3.3.4. RDT im Vergleich mit molekularen Untersuchungsmethoden (PCR).....	36
3.4. Vergleich Mikroskopie mit PCR.....	37
3.4.1. Allgemeine Artenverteilung bei Mikroskopie und PCR.....	38
3.4.2. Vergleich der verschiedenen Malariaarten in den einzelnen Subbezirken.....	40
4. Diskussion.....	45
5. Zusammenfassung.....	50
5.1. Abstract.....	51
6. Literaturverzeichnis.....	53
7. Abbildungsverzeichnis.....	67
8. Tabellenverzeichnis.....	70
9. Anhang.....	74
10. Lebenslauf.....	76
11. Danksagung.....	79

1. Einleitung

Im modernen Zeitalter des 21. Jahrhunderts ist Malaria immer noch eine sehr ernst zu nehmende Krankheit, da auch heute mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung in Malaria endemischen Gebieten lebt. Sie ist z.B. in Afrika, Zentral-, Südamerika, Süd- und Südostasien zu finden, wobei die meisten Fälle in Afrika südlich der Sahara auftreten (DÖNGES, 1988; WHO, 2013b). Somit handelt es sich hier um die wichtigste tropische und parasitäre Erkrankung des Menschen (HAQUE et. al., 2010). Malaria wird durch die Infektion der roten Blutkörperchen mit Plasmodien hervorgerufen. Als Vektor fungieren blutsaugende weibliche *Anopheles*-Mücken. Etwa 5 % der Weltbevölkerung sind mit Plasmodien infiziert und ungefähr 1 Million Menschen (vor allem Kinder und Schwangere) sterben jährlich an den Folgen dieser Krankheit (COOK & ZUMLA, 2003; WHO, 2013c). Es wird geschätzt, dass alle 2 Minuten ein Mensch an den Folgen von Malaria stirbt (WHO, 2013c). Besonders in den armen Entwicklungsländern (diese liegen meist in den tropischen und subtropischen Gebieten) tritt sie noch heute häufig unterhalb von 2.000 m Meereshöhe auf. In gemäßigten Zonen ist sie teilweise noch regional anzutreffen (COOK & ZUMLA, 2003; DÖNGES, 1988). Im 20. Jahrhundert kam Malaria auch in Europa in den gemäßigten Zonen, sowie im mediterranen Raum vor. In Mitteleuropa gab es z.B. in den holländischen und ostfriesisch-oldenburgischen Marschen- und Küstenregionen immer wieder bestätigte Vorkommen. Viele Sümpfe wurden in unseren Breitengraden trocken gelegt und damit verschwand immer mehr die Gefahr mit der Parasitose in Berührung zu gelangen (WESTHEIDE & RIEGER, 1996). Seit Mitte des 20. Jahrhunderts gibt es in Österreich und Deutschland keine endemische Malaria (DÖNGES, 1988). Vereinzelt werden auch heutzutage immer wieder Malariafälle in Österreich diagnostiziert. Hierbei handelt es sich aber um importierte Fälle (MOUCHET, 2000).

Für die Stadien der Gamogonie und Sporogonie (Entwicklung in den Mücken) benötigen *Anopheles*-Mücken einen Temperaturbereich von 16 bis 33 Grad. In unseren Breitengraden liegt das Temperaturoptimum außerhalb des von *Plasmodium falciparum* benötigten Bereichs und daher war dieser Erreger (durch die limitierte Anzahl an Mückengenerationen) in Österreich nicht heimisch (WESTHEIDE & RIEGER, 1996; COOK & ZUMLA, 2003).

Stechmücken besitzen stechend-saugende Mundwerkzeuge (Abb. 1). Jedoch ernähren sich nur die weiblichen Insekten nachts durch Saugen des Blutes an ihren Wirten. Dabei verwenden sie ihren Stechrüssel. Alle 3 – 4 Tage benötigen sie eine sogenannte „Blutmahlzeit“ um ihre Eier zur Entwicklung zu bringen. Die Männchen hingegen sind vegetarisch und ernähren sich ausschließlich von Pflanzensäften (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998).

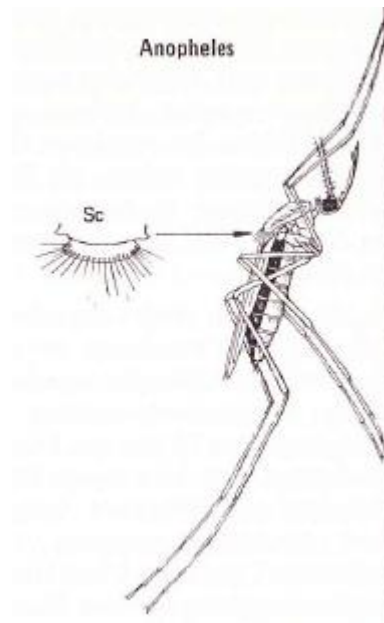


Abb. 1: Darstellung einer geschlechtsreifen erwachsenen *Anopheles* sp. in Ruheposition (aus DÖNGES, 1988)

Mit Hilfe von Insektiziden konnte weltweit in den 1960er Jahren die weitere Malariaausbreitung teilweise eingedämmt werden. Es wurde unter anderem das bekannte und umstrittene DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) sowie andere Chemikalien verwendet. Damit versuchte man die *Anopheles*-Mücken an ihrer Vermehrung zu hindern (CAMPBELL, 2000). 1985 wurde DDT z.B. in Bangladesch verboten. Deshalb kam es wieder zu einem höheren Malariavorkommen (HAQUE et. al., 2009).

1.1. Geschichte der Malaria

Der Name Malaria stammt aus dem Italienischen und wird von den zwei Wörtern „Mala“ und „aria“ abgeleitet. Welches übersetzt werden kann als „schlechte Luft“ (McPHERSON & PINCUS, 2007). Schon in früheren Zeiten wurde die „schlechte Luft“ mit Sümpfen in Verbindung gebracht (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998).

Bereits in der Antike wurde Malaria schriftlich erwähnt (COOK & ZUMLA, 2003). So beeinflusst das sogenannte „Sumpffieber“ schon über 2.000 Jahre die Geschichte der Menschheit. Auch bekannte Städte im mediterranen Raum, wie z.B. Ephesus und Milet mussten sich mit Malaria auseinandersetzen. Das Gebiet der Toskana war ebenfalls betroffen. Daher war nicht nur die Kriegsgefahr (z.B. Kreuzzüge), sondern auch die Malaria ein Grund weshalb in Mittelitalien viele Städte auf höheren Lagen errichtet wurden. Dort waren die Einwohner aufgrund der Höhenlage besser vor der Malaria-Mücke und deren Erregern geschützt (DÖNGES, 1988).

Laut Überlieferungen beschrieb schon HIPPOKRATES (460 – 377 v. Chr.) Malaria, sowie die dazu gehörenden Symptome (COOK & ZUMLA, 2003). Später befassten sich GALEN (129 – 199 n. Chr.) und seine Schüler mit dem Krankheitsverlauf. LAVERAN gelang 1880 der wissenschaftliche Durchbruch durch die mikroskopische Beschreibung der Plasmodien im menschlichen Blut. Herr GOLGI - unter Biologen ein gängiger Name - beschäftigte sich 1885 mit der Entdeckung der erythrocytären Schizogonie. Bereits 1894 konnte SIR RONALD ROSS durch einen Versuch den Beweis erbringen, dass Malaria durch einen Vektor - in dem Fall eine blutsaugende Stechmücke - übertragen wird. 1902 erhielt er für dieses Werk den Nobelpreis. GIEMSA entwickelte vor gut 100 Jahren eine Färbemethode. Es konnten von nun an für die Forscher die kleinen und transparenten Plasmodienstadien im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Auch heute ist diese Methode der Gold-Standard bei der Diagnose von Malaria (DÖNGES, 1988).

1.2. Systematik der Malariaerreger

Den verschiedenen Plasmodienarten (Tab. 1) gehören alle einzelligen Parasiten an und können wie folgt systematisch eingeteilt werden (DÖNGES, 1988). Die für den Menschen relevanten Arten sind *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium knowlesi*.

Tab. 1: Systematische Ordnung der Malariaerreger (nach DÖNGES, 1988)

Stamm: Apicomplexa (= Sporozoa)

Ordnung: Coccidida

Unterordnung: Haemosporina

Familie: Plasmodiidae

1.3. Malaria - Einblick in die Plasmodienarten

Die Infektion wird durch einen Stich eines *Anopheles*-Weibchen eingeleitet. Dabei werden die Parasiten (sog. Sporozoiten) durch den Speichel in die angestochenen Kapillaren in die Blutbahn des Wirtes injiziert (Abb. 2). Die Stechmücken (Culicidae) sind sowohl der Endwirt, als auch der Vektor der Plasmodien (DÖNGES, 1988). Für eine Übertragung der Plasmodien reichen pro Stich der weiblichen *Anopheles* 20 Sporozoiten aus. Die Übertragung erfolgt stets wirtsspezifisch von Arthropoden (z.B. *Anopheles*) auf das Wirtstier (z.B. Menschen). Sie gliedert sich in 3 bekannte Phasen der Sporozoen (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998; CAMPBELL, 2000).

- **Schizogonie:** im Menschen findet eine Phase der asexuellen Vermehrung statt
- **Gamogonie:** hier findet die Entwicklung von Gamonten zur Zygote (diploid) statt, mit sexueller Fortpflanzung
- **Sporogonie:** Phase innerhalb der Mücke, stets asexuelle Vermehrung

Nach dem Eindringen in die Blutbahn erfolgt das Heranwachsen. Dieses geht von einem Trophozoitenstadium zu einem Schizonten (intrazellulär) über. Die Schizonten die sich in den Erythrozyten befinden beinhalten Merozoiten. Die Anzahl der Merozoiten ist artspezifisch und die Erythrozyten lysieren. Je nach Plasmodienart können unterschiedliche Verläufe stattfinden. So konnte bei der meist verbreitetsten Art *Plasmodium falciparum* festgestellt werden, dass bis zu 40.000 Merozoiten durch Leberschizonten gebildet werden. Diese suchen nach 6 – 9 Tagen Erythrozyten auf und schädigen diese. *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* verfolgen eine andere Strategie. Vereinzelt überleben Sporozoiten in den Leberzellen um Merozoiten der ersten Generation (Hypnozoiten) zu bilden. Diese können mehrere Jahre unbeobachtet im Wirt verweilen ohne eine Krankheit auszulösen. Bei aktiv werden durch Vermehrung können sie Malaria verursachen. Bei *Plasmodium malariae* wurde ähnliches berichtet, jedoch wird hier von einer noch vorhandenen Erythrozytenparasitämie ausgegangen. Nicht nur Menschen, sondern z.B. Amphibien, Reptilien, Vögel und Säuger können auch durch die Gattung *Plasmodium* befallen werden (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998).

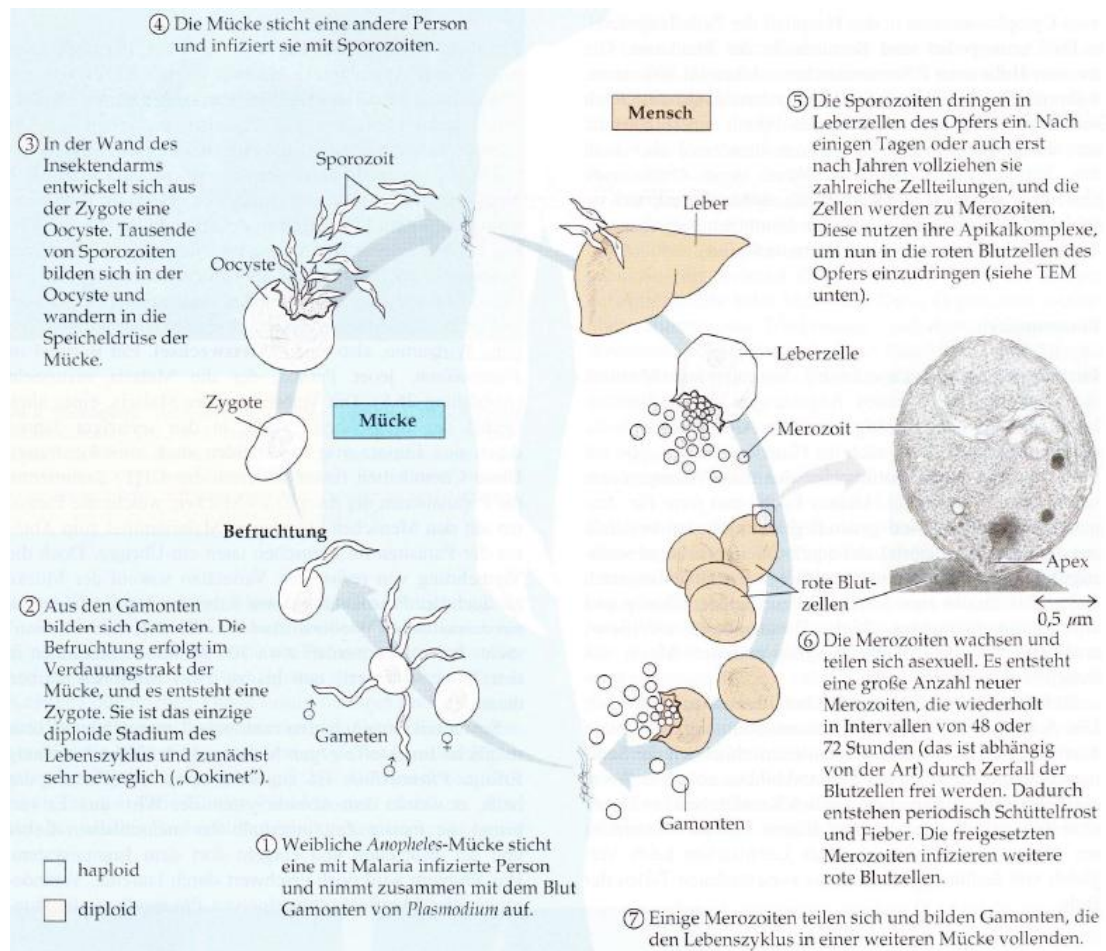


Abb. 2: Entwicklungszyklus der Gattung *Plasmodium* (Gamogonie, Sporogonie und Schizogonie) (aus CAMPBELL, 2000)

Alle Plasmodienarten lösen bei befallenen Menschen im Allgemeinen Fieberschub, auch „Wechselfieber“ genannt aus (DÖNGES, 1988). Der Körper setzt die Fieberschübe gegen die Parasiten ein. Verursacht werden die Fieberschübe durch Parasiten und deren Ausschüttung von Toxinen (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998).

Mittlerweile konnten mit Hilfe moderner Untersuchungsmethoden vermehrt Mischinfektionen mit verschiedenen Plasmodienspezies nachgewiesen werden. Die Erkennung dieser Parasitosen ist äußerst schwierig. Unregelmäßige Fieberschübe können auftreten, oder gänzlich ausbleiben. Ein tödlicher Krankheitsverlauf ist möglich (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998).

Oftmals zeigen mit Parasitenarten (Mono- als auch Mischinfektionen) infizierte Personen keine Krankheitserscheinungen oder Symptome. In solchen Fällen spricht man von asymptomatischen Fällen (DIESFELD et. al., 2001).

Dank intensiver Forschung sind bis jetzt ca. 160 Plasmodienarten beschrieben worden. Davon sind nur 11 von veterinärmedizinischer oder humaner Bedeutung (WESTHEIDE & RIEGER, 1996). Von diesen haben sich einige Arten auf Vögel spezialisiert. Ursprünglich waren 4 Arten beim Menschen bekannt: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* (DÖNGES, 1988). Lange Zeit bestand die Annahme, dass nur die 4 genannten humanen Arten von relevanter Bedeutung sind. SUTHERLAND et. al. unterteilten *Plasmodium ovale* in 2 sympatrisch vorkommende Arten: *Plasmodium ovale curtisi* (klassischer Typ) und *Plasmodium ovale wallikeri* (Variation-Typ) (SUTHERLAND et. al., 2010).

Doch neueste Erkenntnisse zeigen, dass noch eine weitere sechste Art im Menschen vorkommen kann: *Plasmodium knowlesi* (KANTELE & JOKIRANTA, 2011). Schon 1931 wurde *Plasmodium knowlesi* in *Macaca fascicularis*, den sogenannten Langschwanzmakaken entdeckt (COATNEY et. al., 2003). Insgesamt sind den Wissenschaftlern bis heute 26 Plasmodienarten bekannt, die Affen infizieren können (KANTELE & JOKIRANTA, 2011). Ursprünglich wurde nur von einer Plasmodieninfizierung innerhalb der Makakenaffen ausgegangen. Jedoch konnte anhand von verschiedenen zeitaufwändigen experimentellen Untersuchungen u.a. 1967 von CHIN et. al. nachgewiesen werden, dass sich *Plasmodium knowlesi* sehr wohl von Mensch zu Tier und umgekehrt übertragen kann (CHIN et. al., 1968a). Eine strenge Artspezifität liegt daher nicht vor (CHIN et. al., 1968b). Die Nutzung des gleichen Lebensraumes kann für eine mögliche Übertragung auf den Menschen ausreichen (WHITE, 2008). 1965 und 1971 wurden von ersten natürlichen Übertragungen auf Menschen auf der Halbinsel Malaysia berichtet (CHIN et. al., 1965b; FONG et. al., 1971). Bis heute liegen einige hundert bekannte Fälle in Malaysia und anderen südostasiatischen Ländern vor (KANTELE & JOKIRANTA, 2011).

1.4. Plasmodienarten

1.4.1. *Plasmodium falciparum*

Kinder unter 5 Jahren sind am ehesten durch den schweren Krankheitsverlauf bei Infektionen mit der Malariaart *Plasmodium falciparum* betroffen. Der Verlauf dieser Form kann sehr unterschiedlich sein. Die Bandbreite reicht von unauffälligem

Verhalten, leichtem bis schwerem Krankheitsverlauf und möglichem Tod (WHO, 2013c; COOK & ZUMLA, 2003).

Plasmodium falciparum ist hauptsächlich in warmen Gebieten wie den Tropen vertreten. Eine ganzjährige Verbreitung ist daher möglich. Bei *Plasmodium falciparum* handelt es sich um den Erreger der gefährlichen Malaria tropica (DÖNGES, 1988).

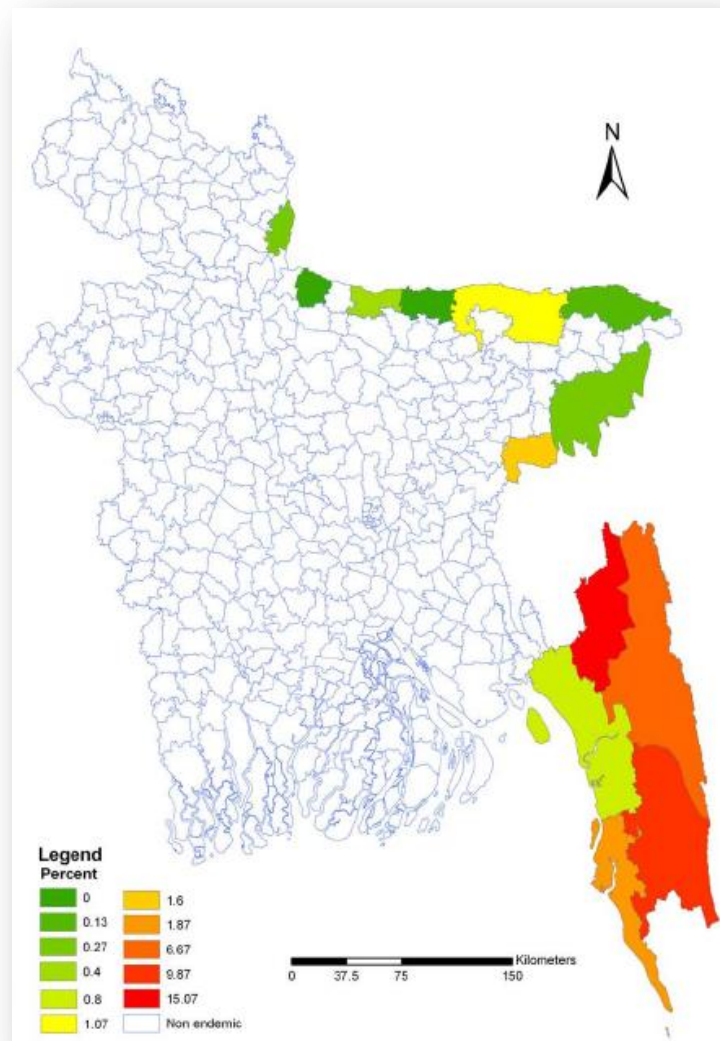


Abb. 3: HAQUE et. al. untersuchten mittels RDT die Verteilung von *Plasmodium falciparum* in Malaria endemischen Gebieten in Bangladesch. *Plasmodium falciparum* wurde in 11 der 13 untersuchten Bezirken nachgewiesen, das Vorkommen reichte von 0,13 % bis 15,7 % (aus HAQUE et. al., 2009)

Die Verbreitung von *Plasmodium falciparum* korreliert mit der Niederschlagsmenge. Zum Beispiel steigen die Anzahl der Infektionen in Sri Lanka bis 3 Monate nach den Regenfällen an (BRIET et. al., 2008).

Bangladesch, insbesondere die Chittagong Hill Tracts sind nach wie vor ein Gebiet mit endemisch vorkommender *falciparum* Malaria. HAQUE et. al. führten in Bangladesch eine Untersuchung mittels RDTs in 13 endemischen Bezirken durch, wobei in 11 Bezirken *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden konnte (Abb. 3) (HAQUE et. al., 2009). Die heute gängigen RDTs haben mittlerweile eine über 95 % Wahrscheinlichkeit, Malaria aufgrund ihrer hohen Sensitivität zu erkennen. Insbesondere sind sie für *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* ausgelegt. Jedoch sind die RDTs bei der Art *Plasmodium falciparum* sensativer als bei *Plasmodium vivax* (WONGSRICHANALAI et. al., 2007).

1.4.1.1. Krankheitsverlauf

Malaria tropica wird durch *Plasmodium falciparum* ausgelöst und ist in den Tropen und Subtropen weit verbreitet. Früher war *Plasmodium falciparum* auch unter *Plasmodium immaculatum* geläufig (COATNEY et. al., 2003). Es handelt sich hier um den schwersten Krankheitsverlauf aller bekannten humanen Malariaerreger, oftmals gefolgt von einem bedrohlichen Lebenszustand mit möglicher Todesfolge. Diese Form der Malaria kann oft nur schwer erkannt werden, da sie normalerweise einen untypischen Verlauf zeigt (EICHENLAUB et. al., 1984). Anzeichen dafür können z.B. unerwartet hohes Fieber, gemischt mit (un-)regelmäßigen Fieberschüben (im 48h-Zyklus) sein. Schüttelfrost, Erbrechen, Benommenheit, Leber- und Milzschwellung können ebenso auftreten (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998; EICHENLAUB et. al., 1984). Die Schizonten werden im 48h-Zyklus gebildet und die Inkubationszeit liegt bei durchschnittlich 7 bis 15 Tagen (ADAM et. al., 2004; ROBERT KOCH INSTITUT, 2013). Unter dem Mikroskop können die befallenen Erythrozyten betrachtet werden. Diese sind optisch durch kleine Ringformen (ca. ein Fünftel der Gesamtgröße) innerhalb der Erythrozyten (Abb. 4) deutlich von den gesunden zu unterscheiden (GROSS, 2009).

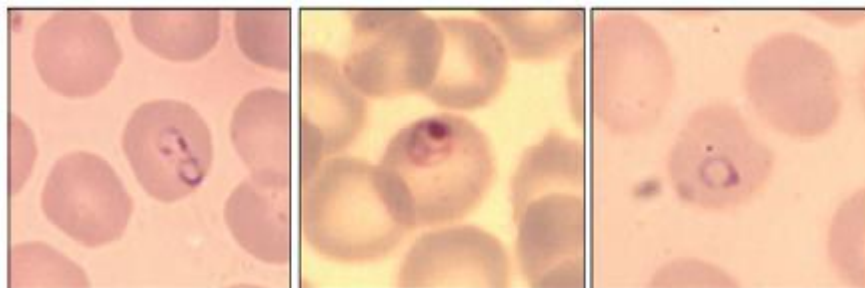


Abb. 4: Blutausstriche einer *Plasmodium falciparum* Infektion, Giemsafärbung, Originalgröße unter Mikroskop, 1.000fache Vergrößerung (aus KANTELE & JOKIRANTA, 2011)

1.4.2. *Plasmodium vivax*

Plasmodium vivax ist besonders in gemäßigten Zonen, aber auch in tropischen Gebieten vorzufinden, z.B. in Südamerika, Mexiko, im Mittleren Osten, nördlichen Afrika, Indien, Pakistan, Sri Lanka oder Papua Neuguinea. Es handelt sich hier um die weltweit verbreitetste Art (HOMBHANGE, 1998; McPHERSON & PINCUS, 2007; CHEESBROUGH, 2005).

MENDIS et. al. schätzen, dass weltweit jährlich ca. 70 – 80 Millionen Malariafälle allein durch *Plasmodium vivax* verursacht werden. Mehr als 50 % aller Pv-Infizierungen treten außerhalb Afrikas auf. Davon sind ungefähr 80 – 90 % im Mittleren Osten, in Asien, im West Pazifik sowie in tropischen Regionen zu finden. Nur 10 – 15 % lassen sich Zentral- und Südamerika zuordnen. Weltweit gesehen treten in etwa 10 – 20 % der Pv-Ansteckungen in Afrika südlich der Sahara auf. Eine unterschiedliche Verteilung zeigt sich innerhalb Afrikas. Es fällt die Ansteckung in Zentral- und Westafrika mit weniger als 1 % sehr gering aus, während sie in Ost- und Südafrika mit ca. 10 % 10-mal so hoch ist (Abb. 5) (MENDIS et. al., 2001).

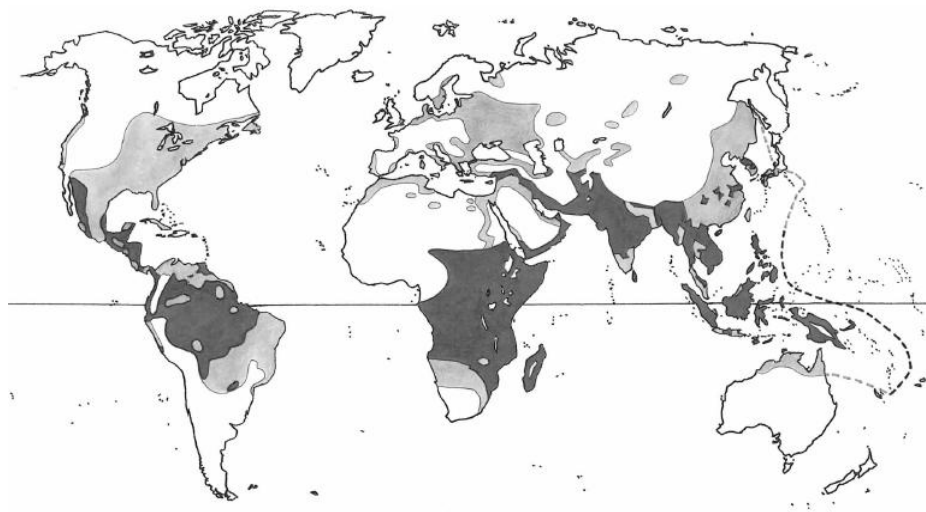


Abb. 5: Hell gefärbt ist die geschätzte Malariaverteilung von *Plasmodium vivax* zu Mitte des 17. Jahrhunderts bis Anfang des 20. Jahrhunderts zu sehen, dunkel gefärbt ist die Situation Ende des 20. Jahrhunderts dargestellt (aus MENDIS et. al., 2001)

In einer aktuellen auf RDTs basierenden Studie von HAQUE et. al. aus dem Jahre 2009 wird gezeigt, dass *Plasmodium vivax* in 10 von 13 untersuchten endemischen Bezirken Bangladeschs heimisch ist (Abb. 6). Die Prävalenz von *Plasmodium vivax* reicht von 0,13 bis 1,2 % (HAQUE et. al., 2009). Besonders in den nördlichen und östlichen Grenzen zu Indien und Myanmar werden die meisten Krankheitsfälle von Malaria dokumentiert (TANGIN et. al., 2008).

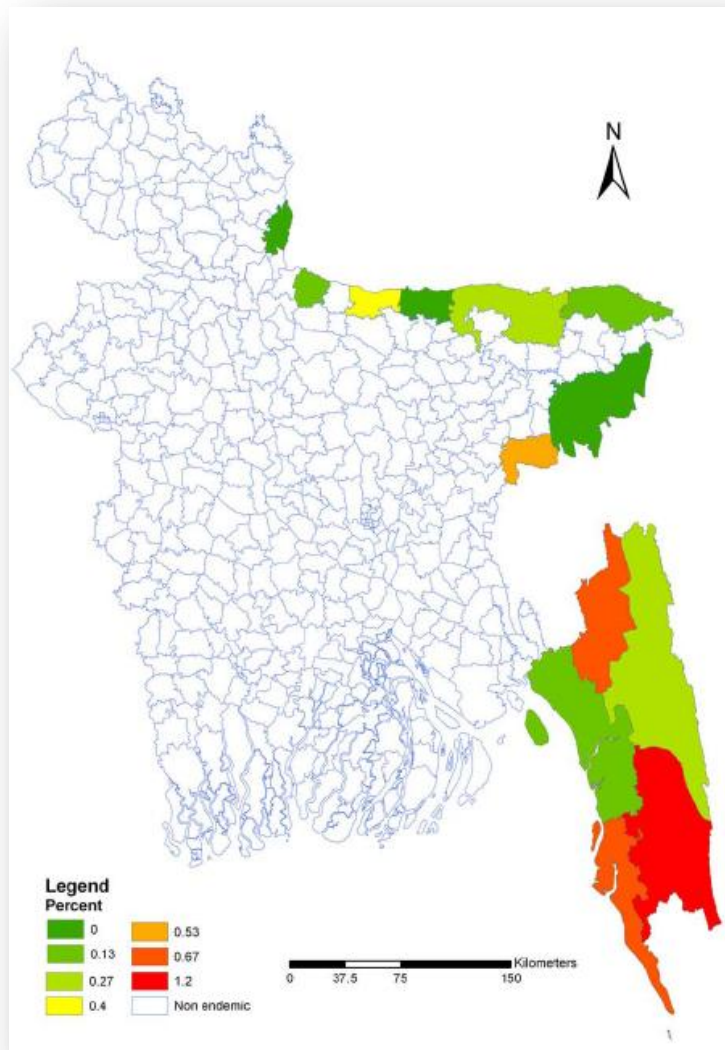


Abb. 6: *Plasmodium vivax* wurde von HAQUE et. al. in 10 der 13 endemischen Bezirken Bangladeschs nachgewiesen, *Plasmodium vivax* wurde in 0,13 % bis 1,2 % der Untersuchungen gefunden (aus HAQUE et. al., 2009)

1.4.2.1. Krankheitsverlauf

Plasmodium vivax und *Plasmodium ovale* gelten als Erreger der Malaria tertiana (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998; DARAI et. al., 2009). Charakteristisch für *Plasmodium vivax* zeigt sich der Ablauf eines fieberfreien Tages, gefolgt von einem Fiebertag aus (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998). Bereits 12 bis 18 Tage nach einer Infizierung können bei Malaria tertiana Krankheitssymptome auftreten (ROBERT KOCH INSTITUT, 2013). Der Krankheitsverlauf beginnt zuerst uncharakteristisch. In der ersten Woche tritt leichtes Fieber auf, danach treten alle 3 Tage Fieberschübe mit hohem Fieber (40 – 41 °C), sowie Schüttelfrost auf. Ringformen können wie auch bei *Plasmodium falciparum* gefunden werden. Nur 48

Stunden dauert die Entwicklung bis zur Freisetzung der Merozoiten. Gametozyten besitzen eine große runde Gestalt (HEIZMANN et. al., 1999; ROLLINSON et. al., 2013) Bei *Plasmodium vivax* kann bis zu 5 Jahre nach einer Erstinfektion ein Relaps erfolgen, da Hypnozoiten (sog. Ruheformen) in der Leber überdauern und wieder aktiv werden können (HEIZMANN et. al., 1999).

1.4.3. *Plasmodium malariae*

Plasmodium malariae ist eine weniger häufig diagnostizierte Malariaart (GROSS, 2009), mit weltweiter Verbreitung. Auch in Bangladesch spielt sie im Vergleich mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* eher eine untergeordnete Rolle (RAHMAN et. al., 2010; McPHERSON & PINCUS, 2007). Bei einer Pm-Monoinfektion sind schwere Erkrankungen eher selten. *Plasmodium malariae* wird teilweise unterschätzt, da diese im frühen Stadium anderen Arten ähnelt. Ungeübte Personen könnten daher eine Pm-Infizierung mittels Mikroskopie falsch zuordnen (RAHMAN et. al., 2010).

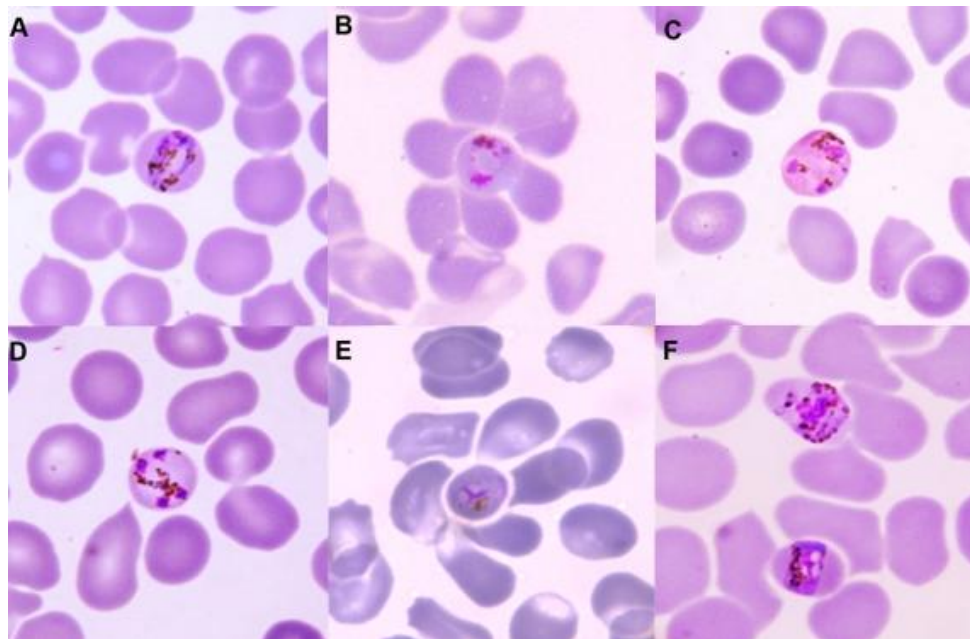


Abb. 7: Durch *Plasmodium malariae* infizierte Erythrozyten eines Patienten, 1.000fache Vergrößerung. A) Trophozoiten, B + E) Trophozoiten mit umgebenden Rosetten, C + D) Schizonten, F) Zwei Trophozoiten die ein Band bilden (aus RAHMAN et. al., 2010)

ZHOU et. al. berichten in ihrer Studie, dass das Auftreten von *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* entlang der Grenze von Thailand und Myanmar stark vernachlässigt und verharmlost wird (ZHOU et. al., 1998). Außerhalb Afrikas gehört Myanmar mittlerweile zu jenen Ländern, welche die meisten Infektionen mit

Plasmodium malariae vorweisen können. Diese liegen bei 10 bis 20 % (GARNHAM, 1966; HAWORTH, 1988b). RAHMAN et. al. untersuchten das Blut eines Patienten zusätzlich mittels molekularen Methoden. Das Ergebnis der PCR zeigte, dass der Patient *Plasmodium malariae* positiv war (Abb. 7) (RAHMAN et. al., 2010).

1.4.3.1. Krankheitsverlauf

Malaria quartana wird durch *Plasmodium malariae* hervorgerufen. Diese Art ist weltweit punktuell auftretend. Früher war sie auch in gemäßigten Zonen beheimatet (WIEDERMANN-SCHMIDT & SCHEINER 2004). Die Schizonten benötigen 3 Tage für deren Wachstum (Abb. 7) (GANTEN & RUCKPAUL, 1999; HEIZMANN et. al., 1999; GOEBBEL, 1991). Nach 14 Tagen haben sich 2000 Merozoiten pro Leberschizont gebildet. Anschließend entstehen 8 bis 16 Merozoiten pro Erythrozyten (Abb. 8) (BANKLER, 2001). Wie der Name Malaria quartana vermuten lässt, treten die Fieberanfälle (40 – 41 °C) alle 72 Stunden auf. Schüttelfrost ist möglich (GROSS, 2009; MEHLHORN, 2012). Zwei Tage ohne Fieber werden von einem Tag mit Fieber abgewechselt (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998). Die Inkubationszeit kann bis zu 6 Wochen betragen (MEHLHORN, 2012). Mehrere Jahrzehnte (bis 40 Jahre) nach der Erstinfektion ist ein Wiederauftreten des damaligen Befalls möglich (ROBERT KOCH INSTITUT, 2013; TH et. al., 2002).

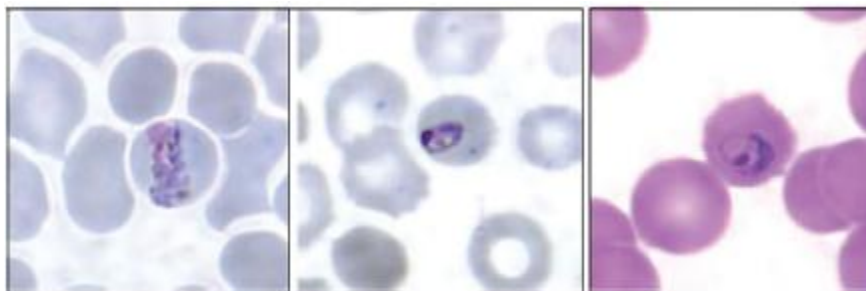


Abb. 8: Mikroskopische Aufnahme dünner Ausstriche eines mit *Plasmodium malariae* infizierten Patienten, Giemsa Technik, Originalvergrößerung 1.000fach (aus KANTELE & JOKIRANTA, 2011)

1.4.4. *Plasmodium ovale*

Von den uns bekannten Malariaarten wurde *Plasmodium ovale* als eine der letzten beschrieben. Das erste Mal wurde der Begriff *Plasmodium ovale* 1922 von Stephens vorgeschlagen und geprägt. Der Name *Plasmodium ovale* wurde entsprechend der infizierten oval geformten Erythrozyten gewählt (Abb. 9) (STEPHENS, 1922).

Informationen über *Plasmodium ovale* Infektionen gibt es hauptsächlich aus dem tropischen Afrika. *Plasmodium ovale* ist im Westen Afrikas, an der Westküste beheimatet, südlich der Sahara, in Äthiopien, Ghana, Nigeria, Indonesien, China, auf den Philippinen und auf einigen Inseln des Westpazifiks. Dort ist diese Art regelmäßig vertreten (WIEDERMANN-SCHMID & SCHEINER, 2004; MARATHE et. al., 2006; WIN et. al., 2002; HOMBHANJE, 1998; CHEESBROUGH, 2005). Außerdem tritt diese Art noch in Indien und Südamerika auf (McPHERSON & PINCUS, 2007; CHEESBROUGH, 2005). In allen anderen Malaria endemischen Gebieten sind die Aufzeichnungen von *Plasmodium ovale* eher nur unregelmäßig überliefert (MARATHE et. al., 2006). Mittlerweile wird ebenfalls von gefundenen Po-Infektionen im Mittleren Osten, Papua Neuguinea und Irian Jaya in Indonesien gesprochen (HAWORTH, 1988a; MOLINEAUX, 1988; BAIRD et. al., 1990; BANGS et. al., 1992). Auch in Indien sind einige wenige Fälle bekannt (MUKHERJEA et. al., 1966; JAMBULINGAM et. al., 1989; MISHRA et. al., 1999; MARATHE et. al., 2006).

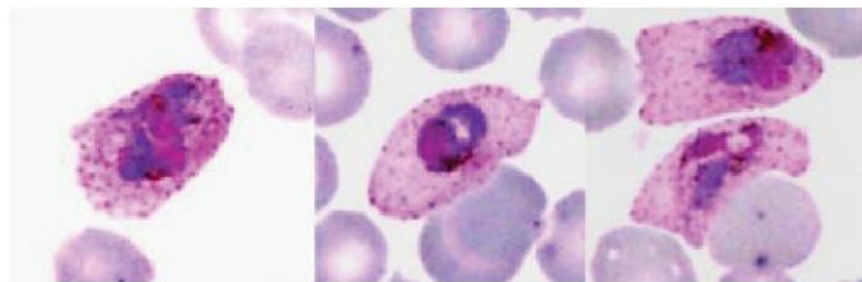


Abb. 9: Darstellung von befallenen Erythrozyten mit *Plasmodium ovale* in einem Schimpansen, die infizierten Erythrozyten sind durch ihre längliche Form deutlich zu erkennen (aus COLLINS & JEFFERY, 2005)

Seit Ende des letzten Jahrhunderts, in den 1990er Jahren sind vereinzelt durch PCR bestätigte Fälle zu beobachten gewesen, aus denen folgt, dass *Plasmodium ovale* genauso in Teilen Asiens vorkommen kann (KAWAMOTO et. al., 1999). WIN et. al. berichten zum Beispiel von dem ersten gefundenen *Plasmodium ovale* Fall in Myanmar. Es wurden Mono- und Co-Infektionen mit anderen Arten gefunden (WIN et. al., 2002). 2010 wurde von dem ersten heimischen, durch PCR und Sequenzanalyse bestätigten *Plasmodium ovale* Fall in Bangladesch berichtet (FUEHRER et. al., 2010a). Zuvor wurde unter der falschen Annahme, dass es kein *Plasmodium ovale* in Bangladesch gibt, per Mikroskop die Infektion als *Plasmodium malariae* diagnostiziert (STARZENGRUBER et. al., 2010). In Bangladesch herrscht

bis zum heutigen Zeitpunkt ein starker Wissensmangel bei 3 der 5 vorkommenden humanen Malariaarten. Es handelt sich hier um *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi*, da diese Arten bis vor kurzem noch nicht vorhanden waren bzw. bis heute noch nicht entdeckt sein könnten (FUEHRER et. al., 2010a).

1.4.4.1. Krankheitsverlauf

Plasmodium ovale verhält sich klinisch wie *Plasmodium vivax*, beide sind die Verursacher von Malaria tertiana (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1998; WIEDERMANN-SCHMID & SCHEINER, 2004). *Plasmodium vivax*, kann bis zu 24 Merozoiten ausbilden. Bei *Plasmodium ovale* hingegen werden nur 8 bis 12 Merozoiten im Schizonten gebildet (STORCH, 1999). Im Falle einer Infizierung mit *Plasmodium ovale* oder *Plasmodium vivax* beginnen die befallenen Erythrozyten eine Vergrößerung (längliche Verformung) vorzunehmen. Diese ist charakteristisch für diese Arten. Man spricht von einer Schüffner-Tüpfelung in den Erythrozyten (Abb. 9) (LÖFFLER et. al., 2004).

Im Gegensatz zu *Plasmodium falciparum* kann bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* ein neuerliches Auftreten der Krankheit mit hoher Wahrscheinlichkeit vorkommen (sog. Relaps). Malaria tertiana ist aber trotz Rezidiv nicht lebensbedrohlich (TH et. al., 2002).

1.4.5. *Plasmodium knowlesi*

Vermutlich wurde *Plasmodium knowlesi* zufällig von FRANCHINI bereits 1927 entdeckt. Er erkannte, dass im Blut der *Macaca fascicularis* (Javaneraffen oder Langschwanzmakaken) die Parasiten eine andere Morphologie aufwiesen als bisher bekannte Arten, wie z.B. bei *Plasmodium inui* und *Plasmodium cynomolgi* (Abb. 11). Jedoch wurden erst 1931 die Parasiten von *Plasmodium knowlesi* und die damit verbundene Veränderung des Blutes und der Erythrozyten in *Macaca fascicularis* von den Wissenschaftlern KNOWLES und DAS GUPTA beschrieben. 1932 gelang den Forschern der Beweis, dass *Plasmodium knowlesi* nicht nur von Affen zu Affen, sondern auch von Affen zu Menschen übertragen werden kann (COATNEY et. al., 2003). 1965 wurde von der ersten natürlichen Ansteckung eines Reisenden berichtet (CHIN et. al., 1965a). 1967 wurde die Mückenart *Anopheles balabacensis* (*Anopheles leucosphyrus*-Gruppe) für die Übertragung auf den Menschen

nachgewiesen. Dieser Vektor kommt in Gegenden mit Baumbestand in Südostasien vor und ernährte sich ursprünglich blutsaugend von dort beheimateten *Macaca fascicularis* und *Macaca nemestrina* (südlicher Schweinsaffe). Wenn Menschen und Affen sich das Habitat teilen, so ist eine natürliche Infektion des Menschen nicht ausgeschlossen (Abb. 10). *Plasmodium knowlesi* ist in Südostasien, insbesondere in Malaysia auf den Inseln Borneos vertreten (WHITE, 2008).

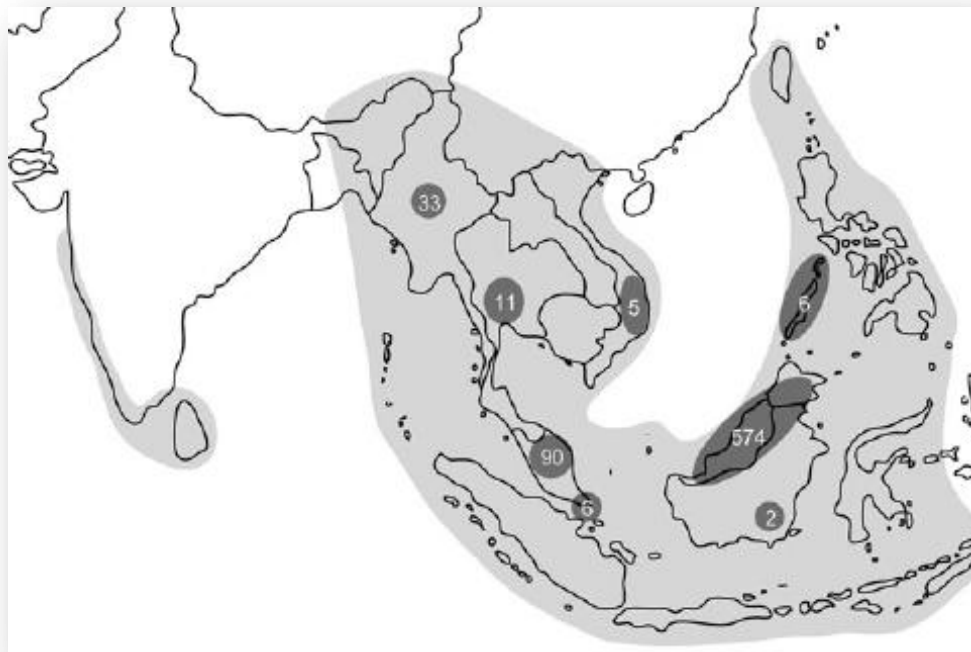


Abb. 10: Die Karte zeigt das Verbreitungsgebiet in Südostasien von *Plasmodium knowlesi* Infektionen des Menschen (lokal und Touristen), die hellgraue Eingrenzung deutet auf die geographische Lage des Vektors *Anopheles leucosphyrys* hin, die dunklen Bereiche zeigen die gefundenen Krankheitsfälle (in Zahlen) (aus COX-SINGH & SINGH, 2008; TANG et. al., 2010)

Oftmals wird *Plasmodium knowlesi* fälschlicherweise als *Plasmodium malariae* diagnostiziert, da sich beide Arten im Mikroskop ähneln (Abb. 8 und Abb. 11). In einer Studie von SINGH et. al. wurde z.B. per Mikroskop die Hälfte der zu untersuchenden Blutproben unkorrekter Weise *Plasmodium malariae* zugeordnet. Eine Nachuntersuchung mit molekularen Verfahren zeigte das fehlerhafte Ergebnis auf. Daher ist eine weitere, exaktere Untersuchung durch moderne Untersuchungsmethoden als notwendig anzusehen (SINGH et. al., 2004).

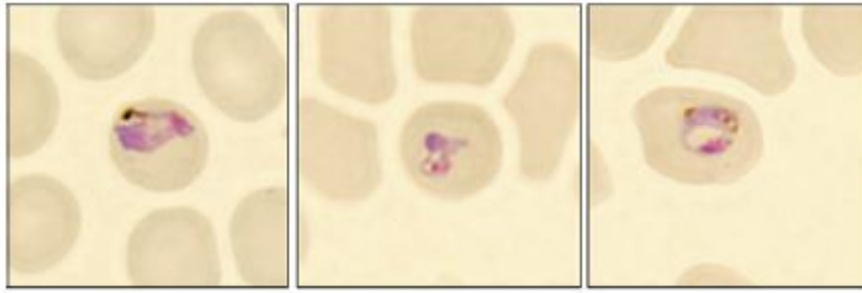


Abb. 11: Die mikroskopischen Aufnahmen von *Plasmodium knowlesi* wurden von Blutaussstrichen eines finnischen Touristen nach der Heimkehr von der westlichen Halbinsel Malaysias angefertigt, Giemsa-Färbung, Originalvergrößerung 1.000fach (aus KANTELE & JOKIRANTA, 2011)

1.4.5.1. Krankheitsverlauf

Auch wenn *Plasmodium knowlesi* und *Plasmodium malariae* sich in ihrer Morphologie ähnlich gestalten, in ihrem Krankheitsverlauf unterscheiden sich die beiden Arten. Bei *Plasmodium malariae* treten alle 72 Stunden Fieberschübe auf. *Plasmodium knowlesi* zeichnet sich durch tägliche Fieberanfälle (auch Quotidian genannt) aus (WHITE, 2008; GROSS, 2009).

1.5. Bangladesch - staatliche Gliederung und Lage des Landes

Bangladesch ist ein Staat in Südasien. Seine natürliche Grenze ist im Süden der Golf von Bengalen, im Südosten liegt Myanmar, den restlichen Teil umschließt Indien. Das arme Land wird noch immer als Entwicklungsland angesehen. Die Hauptstadt von Bangladesch ist Dhaka. Insgesamt gibt es 158,5 Millionen Einwohner (Stand Juli 2011), die auf einer Fläche von 147.569 km² leben. Insgesamt wird das Land von 7 Verwaltungseinheiten (Divisions) (Tab. 2) verwaltet und besteht aus 64 Bezirken (Districts), diese sind wiederum in Subbezirke (Subdistricts) unterteilt (<http://de.wikipedia.org/wiki/Bangladesch>).

Tab. 2: Die 7 Verwaltungseinheiten Bangladeschs (aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Bangladesch>)

Die 7 Verwaltungseinheiten sind:

- Barishal
- Chittagong
- Dhaka
- Khulna
- Rajshahi
- Rangpur
- Sylhet

Die Filterpapiere für die Diplomarbeit stammten aus dem Bezirk Bandarban (Division Chittagong) im Südosten von Bangladesch, die Bezirkshauptstadt ist Bandarban und der Bezirk hat eine gesamte Größe von 4.479 km². Der Verwaltungsbezirk wird wiederum in 7 Subbezirke unterteilt (Tab. 3).

Tab. 3: Die 7 Subbezirke (Upazila) des Bezirkes Bandarban (aus [http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_\(Distrikt\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_(Distrikt)))

Die 7 Subbezirke sind: Alikadam
Bandarban Sadar
Lama
Naikhongchhari
Rowangchhari
Ruma
Thanchi

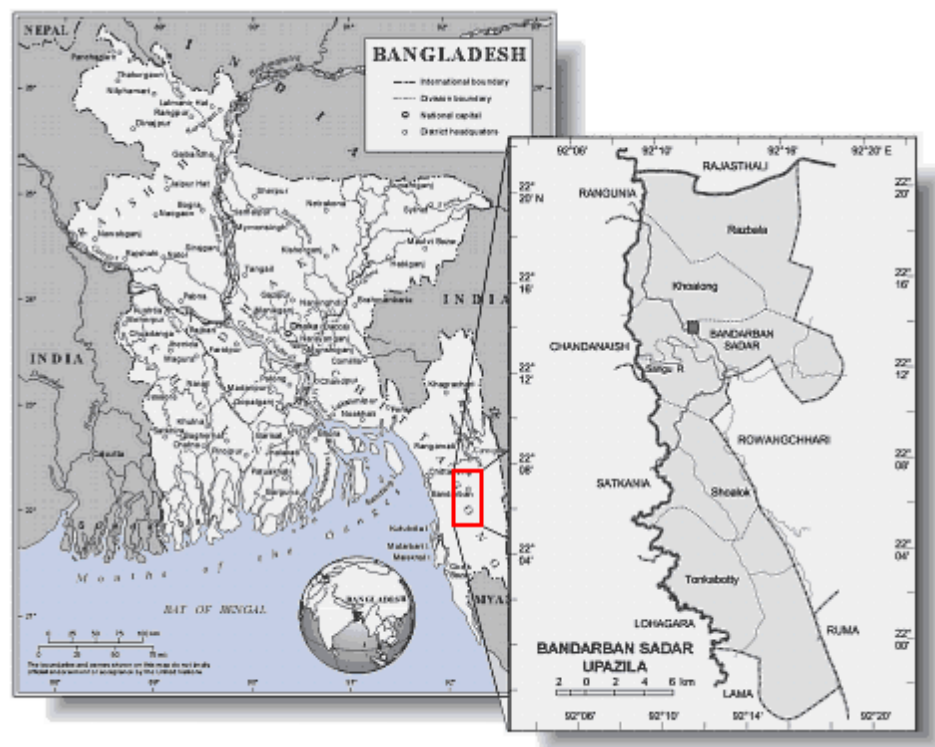


Abb. 12: Grafische Veranschaulichung des Standortes der Außenstelle MARIB in Bandarban, Bangladesch, auf der linken Karte der Staat Bangladesch zu sehen, auf der rechten der Subbezirk Bandarban Sadar (aus <http://www.marib.org/>)

Bandarban (Bezirk) besteht zu zwei Dritteln aus Wäldern und gehört zu den Chittagong Hill Tracts ([http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_\(Distrikt\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_(Distrikt))). In diesem Bezirk befindet sich die MARIB (Malaria Research Initiative Bandarban)

Außenstelle mit Labor und Klinik (Abb. 12). Ärzte und Studenten der Medizinischen Universität, sowie Biologen sind um die Gesundheit der Patienten in dieser Gegend bemüht (<http://www.marib.org/>). Nördlich und östlich von Bezirk Bandarban befindet sich Rangamati. Im Osten erstrecken sich die Provinzen Rakhaing und Chin, beide gehören dem Staat Myanmar an. Im Süden setzt der Fluss Naf eine natürliche Grenze und im Westen erstrecken sich die nationalen Bezirke Chittagong und Cox's Bazar ([http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_\(Distrikt\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_(Distrikt))).

Malaria stellt in Bangladesch ein großes gesundheitliches Problem dar. Seit den 1990er Jahren wird Malaria wieder häufiger diagnostiziert, da 1985 DDT zur Bekämpfung der Malariamücke verboten wurde und keine Malariakontrollen stattfinden, sowie Resistenzen gegen Chloroquin auftreten (HAQUE et. al., 2010; HAQUE et. al., 2009).

Die 13 endemischen Bezirke Bangladeschs befinden sich jeweils im Norden und Osten des Landes und sind mit den Grenzen zu Indien und Myanmar verbunden (Abb. 13). 90 % der Erkrankungen und Sterbefälle durch *Plasmodium* sp. sind aus diesen 3 Hügelbezirken Rangamati, Bandarban und Khagrachari bekannt (HAQUE et. al., 2010). Die bewaldeten und grünen Hügel der Chittagong Hill Tracts (CHT) eignen sich hervorragend für die *Anopheles*-Mücken der Art *Anopheles dirus*. 2001 wurde vom Ministerium für Gesundheit eine Statistik veröffentlicht, die besagt, dass in diesem wenig besiedelten Gebiet 67 % der im Labor bestätigten Krankheitsfälle allein aus dieser Region stammen. Dabei handelt es sich um insgesamt 37.180 Malariafälle (VAN DEN BROEK et. al., 2004).

Von der WHO veröffentlichte Zahlen berichten allein in Bangladesch von fast 80.000 möglichen Infizierungen mit *Plasmodium* sp.. Durch die Mikroskopie konnten ca. 25.200 Fälle erkannt werden. RDTs lieferten fast 39.000 positive Ergebnisse bei Patienten (WHO, 2011). Insgesamt sind ca. 55 Millionen Einwohner Bangladeschs einem Malariarisiko ausgesetzt, alleine ca. 11 Millionen einem hohen Risiko. Die Malariaansteckungen lagen bei ungefähr 570.000 Personen. Die aufgenommenen Fakten zeigen im World Malaria Report 2010, dass alleine in Bangladesch das Blut von 553.787 Patienten per Mikroskopie und RDT untersucht wurde. Davon waren bei beiden Untersuchungsmethoden 63.873 Patienten Malaria positiv. Es konnten 18.242 positive Pf-Fälle und 6.853 positive Pv-Fälle festgestellt werden. Bei 47 Patienten konnte die Todesursache auf Malaria zurück geführt werden (WHO, 2011).

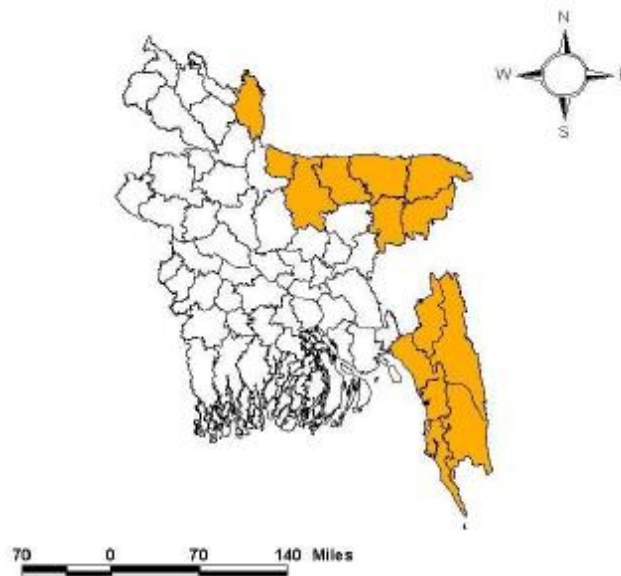


Abb. 13: Karte zeigt die 13 Malaria endemischen Bezirke in Bangladesch, Einteilung erfolgt in 5 hoch endemische Bezirke im Südosten und in 8 weniger endemische im Nordosten (aus Ahmed et. al., 2009)

1.6. Zielsetzung der Diplomarbeit

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (Nested PCR) wurden 1867 Proben von asymptomatischen, fieberfreien Patienten auf Malaria (Gattungs- und Artniveau) untersucht.

Dazu wurden die hoch konservierten Regionen der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA (*SSU rRNA*) für die Diagnose der Malaria benutzt. Bereits kleine Mengen DNA (6 Parasiten/ μ l) waren für den Nachweis ausreichend (SINGH et. al., 1999).

Ziel dieser Diplomarbeit war es, das Vorkommen und Artspektrum von Malariaerregern in der asymptomatischen Bevölkerung zu ermitteln. Weiter wurden die gewonnenen Erkenntnisse mit anderen Untersuchungsmethoden (RDT, Mikroskopie) verglichen. Eine Hypothese war die Annahme, dass die Prävalenz von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* bei den 3 Untersuchungstechniken (RDT, Mikroskopie, PCR) gleiche bis sehr ähnliche Ergebnisse erbringen würden. Andererseits wurde vermutet, dass die Anzahl von Einfach- und Mehrfachinfektionen unterschätzt wird.

2. Material und Methodik

2.1. Material

Die untersuchten Filterpapiere wurden in der Forschungseinrichtung MARIB (Malaria Research Initiative Bandarban) in Bandarban, Bangladesch im Jahre 2007 sowohl während der Regensaison als auch in der Trockensaison gesammelt. Das zur Verfügung gestellte Blut (50 – 100 µl) wurde auf einem Filterpapier vor Ort gesammelt, getrocknet und anschließend an die Medizinische Universität Wien geschickt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden 1867 Filterpapiere auf Malariaerreger untersucht, wobei 1429 Proben von der Regensaison und 438 von der Trockensaison stammten.

2.2. Methodik

Von jeder Person, bzw. deren Erziehungsberechtigten wurde zu Beginn eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie unterschrieben. Die Ethikkommission des internationalen Zentrums für Durchfallerkrankungen und Forschung (Ethical Review Committee of the International Center for Diarrhoeal Disease Research) mit Sitz in Bangladesch genehmigte diese Studie und überprüfte sie.

2.2.1. Auswahl der Studienteilnehmer

Der Bezirk Bandarban umfasst 7 Subbezirke, in welchen zwischen August und Oktober 2007 Blutproben gesammelt wurden.

Die 7 Subbezirke sind:

- Alikadam
- Bandarban Sadar
- Lama
- Naikhongchhari
- Rowangchhari
- Ruma
- Thanchi

In jedem Subbezirk wurden 3 Dörfer und davon je 30 Haushalte zur Untersuchung herangezogen (Household Study). Insgesamt wurden in der Regensaison 21 Dörfer

mit 1435 Personen und in der Trockensaison 8 Dörfer mit 439 Studienteilnehmern untersucht. Zusammen ergab die Studie einen Pool aus 1874 Personen. Diese wurden während der Prävalenzstudie (2007) mittels Mikroskopie und Rapid Diagnostic Tests (RDT) auf asymptomatische Malaria im Südosten von Bangladesch in unserer MARIB Außenstelle untersucht.

2.2.2. Mikroskop

Die Blutausstriche wurden vor Ort in Bangladesch unter dem Mikroskop untersucht. Es wurde 100fach Vergrößerung und Öl-Emulsion verwendet. Die Untersuchung erfolgte in Aufteilung von 200 Feldern um auch geringste Plasmodienparasitämien zu erfassen.

2.2.3. Rapid Diagnostic Test

Es handelt sich hier um einen Malaria Schnelltest, der in wenigen Minuten durchgeführt werden konnte. Malaria Parasiten, bzw. deren spezifische Antigene (Proteine) konnten durch dieses Verfahren im Blut der Studienteilnehmer nachgewiesen werden (WHO, 2013a). Der verwendete RDT (Falci Vax, Zephyr Biomedicals, Goa, Indien) reagierte sensibel für *Plasmodium falciparum* (HRP2) und *Plasmodium vivax* (pLDH).

2.2.4. Molekulare Methode

Die molekular biologisch untersuchten 1867 Filterpapiere wurden von MARIB Mitarbeitern in Bangladesch luftgetrocknet, sowie einzeln in nummerierte Plastikbeutel (mit Pb 07 code + Nummer versehen) verpackt und nach Wien gebracht. Anschließend erfolgten genau beschriebene Arbeitsschritte die in den Standard Operating Procedures mit den Titeln „DNA Purification of *Plasmodium* sp. from Blood Spots on Filter Paper“, sowie „Nested PCR-Analysis of *Plasmodium* Parasites“ zusammengefasst wurden (FUEHRER, 2010b; FUEHRER, 2010c).

2.2.4.1. DNA-Isolierung

Die Lagerung der Filterpapiere erfolgte stets bei Raumtemperatur. Aus dem Filterpapier wurden jeweils kleine Quadrate mit ca. 4 mm Durchmesser mit einem Skalpell ausgestochen. Als Unterlage diente ein dicker Karton. Für jede Blutprobe wurden neue Skalpellklingen und ein neuer Platz auf dem Karton verwendet

(Kontaminationsverhinderung). Die ausgestanzten Blutstropfen wurden jeweils in beschriftete 1,5 ml Röhrchen unter Zugabe von 100 µl 1x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gewaschen. Am nächsten Tag konnten die Wasserbäder, die für die DNA-Isolation benötigt wurden auf 70 °C bzw. 98 °C vorgewärmt werden. Die Röhrchen wurden 2 Minuten bei 13.000 rpm in die Zentrifuge gegeben. Wichtig war es die Röhrchen in der gleichen Richtung aufzustellen, um eine spätere Identifizierung der entstehenden Pellets zu erleichtern. Anschließend erfolgte die Entfernung des Überstandes mit einer Eppendorf Pipette. Je nach Ausprägung der Pellets - welche oft schon als rote Punkte auf einer Unterseite des Röhrchens erkennbar waren - konnte der Überstand fast zur Gänze abgesaugt werden. Für jedes Röhrchen wurde eine neue Spitze verwendet. Neuerliches Zuführen von 100 µl 1x PBS erfolgte. Die Pellets wurden 2 Minuten bei 13.000 rpm in der Zentrifuge pelletiert und anschließend der Überstand entfernt. Die gekühlte InstaGene Matrix Flasche (InstaGeneTM Whole Blood Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) wurde auf einem Magnetrührer 30 Sekunden gemischt. Es wurden jeweils 60 µl InstaGene Matrix in die Röhrchen übertragen. Des weiterem erfolgte ein achtminütiges Wasserbad der Röhrchen bei 70 °C. Anschließend wurden die Samples 15 Sekunden im Vortexer geschüttelt und dann 4 Minuten bei 98 °C im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal und Eppendorf Mastercycler 5333, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Es folgte eine Minute bei 13.000 rpm in der Zentrifuge, um Inhibitoren auf den Boden abzuzentrifugieren. Der Überstand konnte nun in die neuen beschrifteten Röhrchen überführt werden. Es musste darauf geachtet werden, dass möglichst kein Salz mit gebundenen Inhibitoren überführt wurde, sonst könnte sich dies negativ auf die folgenden PCR-Ergebnisse (Polymerase-Kettenreaktion) auswirken. Die Aufreinigung wurde wiederholt um die DNA (Desoxyribonukleinsäure) von Inhibitoren zu befreien. Die erhaltene DNA konnte bei – 20 °C aufbewahrt werden. Bei neuerlichem Bedarf wurde die gewünschte Probe bei Raumtemperatur aufgetaut, 15 Sekunden im Vortexer gemischt und 3 Minuten in der Zentrifuge zentrifugiert, damit das restliche vorhandene Salz (wirkt inhibitorisch) zu Boden sinken konnte. Ein neuerliches einfrieren am Ende des Arbeitsschrittes war möglich, um die Proben bei Bedarf weiter verwenden zu können.

2.2.4.2. Schritte der Nested PCR für *Plasmodium* spp. Arten

Für die Nested PCR (Polymerase-Kettenreaktion) sind mehrere Arbeitsschritte erforderlich. Diese werden in den einzelnen Punkten erläutert.

2.2.4.2.1. Primer – Nested PCR

Die kleine Untereinheit der rRNA (*SSU rRNA*) wird für die Bestimmung der einzelnen humanen Plasmodienarten verwendet. Im Anschluss sind die verwendeten Primer (synthetisiert von der Firma Microsynth AG, Balgach, Schweiz) für die einzelnen Arten aufgelistet (Tab. 4).

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Primer bei Nested PCR, die jeweils angeführten Primer wurden bei NEST 1 Gattungsspezifisch sowie bei NEST 2 Gattungsspezifisch und Artspezifisch verwendet (basierend auf SNOUNOU & SINGH, 2002; SINGH et. al., 2004; SINGH et. al., 1999; CALDERARO et. al., 2007)

NEST 1 Gattungsspezifische Primer: rPLU1 + rPLU5

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

rPLU5: 5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3'

NEST 2 Gattungsspezifische Primer: rPLU3 + rPLU4

rPLU3: 5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3'

rPLU4: 5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3'

NEST 2 *Plasmodium falciparum* (Pf) – Artspezifische Primer: rFAL1 + rFAL2

rFAL1: 5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'

rFAL2: 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'

NEST 2 *Plasmodium knowlesi* (Pk) – Artspezifische Primer: Pmk8 + Pmkr9

Pmk8: 5'-GTT AGC GAG AGC CAC AAA AAA GCG AAT-3'

Pmkr9: 5'-ACT CAA AGT AAC AAA ATC TTC CGT A-3'

NEST 2 *Plasmodium malariae* klassisch (Pm) – Artspezifische Primer: rMAL1 + rMAL2

rMAL1: 5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3'

rMAL2: 5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3'

NEST 2 *Plasmodium ovale* klassisch (PoC) – Artspezifische Primer: rOVA1 + rOVA2

rOVA1: 5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3'

rOVA2: 5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG-3'

NEST 2 *Plasmodium ovale* NP-2002 (PoR) – Artspezifische Primer: rOVA1 + rPLU2

rOVA1: 5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3'

rPLU2: 5'-ATC TAA GAA TTT CAC CTC TGA CAT CTG-3'

NEST 2 *Plasmodium ovale* Variation (PoV) – Artspezifische Primer: rOVA1v + rOVA2v

rOVA1v: 5'-ATC TCC TTT ACT TTT TGT ACT GGA GA-3'

rOVA2v: 5'-GGA AAA GGA CAC TAT AAT GTA TCC TAA TA-3'

NEST 2 *Plasmodium vivax* (Pv) – Artspezifische Primer: rVIV1 + rVIV2

rVIV1: 5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'

rVIV2: 5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'

2.2.4.2.2. Verdünnung Primer

Um die Primer Stammlösung herzustellen, wurden die vom Hersteller gelieferten lyophilisierten Primer entsprechend dem mitgelieferten vorgegebenen Qualitätszertifikat mit nukleasefreiem Wasser zu einer 100 mM Lösung verdünnt.

Anschließend wurden daraus Aliquote vorbereitet, die bei der PCR verwendet wurden. Sowohl die Stammlösung (100 µl) als auch die Primerlösung (10 µl) wurden bei – 20 °C eingefroren.

2.2.4.2.3. Vorbereitung der DNA-Leiter

Die DNA-Leiter (50 Basenpaare (bp)), der Firma Sigma-Aldrich wurde 1:5 verdünnt. Es wurden z.B. 10 µl 5x Green GoTaq® Flexi Puffer und 40 µl DNA-Leiter aliquotiert. Die DNA-Leitern wurden bei – 20 °C gelagert.

2.2.4.2.4. PCR-Analyse

Das GoTaq®PCR Core System (Promega, Madison, WI, USA) beinhaltet:

250u GoTaq® DNA-Polymerase

5x Colorless GoTaq® Flexi Puffer

5x Green GoTaq® Flexi Puffer

MgCl₂ (20 mM)

PCR Nucleotide Mix dNTPs (10 mM)

Bei NEST 1-Reaktionen wurde überwiegend Colorless GoTaq® Flexi Puffer und bei NEST 2-Reaktionen Green GoTaq® Flexi Puffer verwendet. Die unterschiedliche Verwendung der Puffer hatte allerdings keine Auswirkungen auf die Ergebnisse.

a.) NEST 1 PCR

Unter der Sterilbank wurden 0,2 ml PCR Röhrchen (Firma Biozym) für das NEST 1 und 1,5 µl Röhrchen für den Master Mix mit einem wasserfesten Stift beschriftet. Währenddessen wurden 5x Colorless GoTaq® Flexi Puffer oder 5x Green GoTaq® Flexi Puffer, MgCl₂, PCR Nucleotide Mix, Primer (rPLU1/rPLU5), sowie die DNA aufgetaut. Die GoTaq® DNA-Polymerase wurde erst kurz vor Zugabe in den Master Mix aus dem Gefrierschrank genommen und nach Zugabe zum Master Mix wieder ehestmöglich eingefroren. Der Master Mix wurde nach einer Grundformel angesetzt und konnte je nach Probenanzahl variieren (Tab. 5).

Tab. 5: Grundformel Master Mix für 50 µl (45 µl Master Mix + 5 µl DNA)

	Reagenzien
10 µl	5x Colorless GoTaq® Flexi Puffer/ 5x Green GoTaq® Flexi Puffer
4 µl	MgCl ₂ (20 mM)
0,625 µl	PCR Nucleotide Mix (10 mM)
5 µl	Primer A (10 pM/µl)
5 µl	Primer B (10 pM/µl)
0,2 µl	GoTaq® DNA-Polymerase (250 U)
20,175 µl	nukleasefreies Wasser

Je 45 µl des Master Mixes wurden in die Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden jeweils für jeden Arbeitsschritt einzeln geöffnet und geschlossen - um Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurden 5 µl der gewünschten DNA hinzugefügt. Das NEST 1-Produkt wurde anschließend in den Thermocycler (siehe 2.2.4.2.5. Amplifikationsreaktion) eingesetzt wo die Amplifikationen stattfanden.

b.) NEST 2-Reaktionen (Gattungsspezifisch)

Die Arbeitsschritte waren bei der Herstellung der Genuspezifischen NEST 2-Reaktion ähnlich wie bei dem vorher beschriebenen Verfahren. Jedoch wurden statt der DNA das NEST 1-Produkt und die Primer rPLU3/rPLU4 bei 25 µl Reaktionen verwendet. Eine Gattungsspezifische Amplifikation war nötig um eine Aussage zu treffen, ob das Sample Malaria Parasiten enthielt. Die positiven Malariafälle wurden weiter auf Artniveau untersucht.

c.) NEST 2 (Artspezifisch)

Der Master Mix wurde mit 25 µl (22,5 µl Master Mix und 2,5 µl NEST 1-Produkt) angesetzt. Die Primer banden spezifisch für die jeweils zu untersuchende Malariaart. Durch Amplifikation des NEST 2-Produkts konnte eine Aussage über vorhandene asymptomatische Malariaarten getroffen werden. Außer bei *Plasmodium knowlesi*, welches eine höhere Annealingtemperatur benötigte, konnten alle anderen Arten wie bei NEST 1-Reaktionen amplifiziert werden.

2.2.4.2.5. Amplifikationsreaktion

Die folgenden Einstellungen der Thermocycler waren für die Amplifikation der PCR notwendig (Tab. 6).

Tab. 6: Es wird die verwendete Vorlage der Abläufe für die beiden Thermocycler gezeigt, welche für die Amplifikation der PCR notwendig waren

a.) NEST 1 (rPLU1/rPLU5) und die Artspezifischen NEST 2-Reaktionen:

Plasmodium falciparum (Pf) - (rFAL1/rFAL2)

Plasmodium malariae klassisch (Pm) - (rMAL1/rMAL2)

Plasmodium ovale klassisch (PoC) - (rOVA1/rOVA2)

Plasmodium ovale NP-2002 (PoR) - (rOVA1/rPLU2)

Plasmodium ovale Variation (PoV) - (rOVA1v/rOVA2v)

Plasmodium vivax (Pv) - (rVIV1/rVIV2)

Schritt 1: Anfängliche Denaturierung – **95 °C bei 4 min**

Schritt 2: Annealing – **58 °C bei 2 min**

Schritt 3: Extension – **72 °C bei 2 min**

Schritt 4: Denaturierung – **94 °C bei 1 min**

Schritt 5: **Wiederholung der Schritte 2 - 4 bei der Dauer von 25 Zyklen**

Schritt 6: Final annealing – **58 °C bei 2 min**

Schritt 7: Final extension – **72 °C bei 5 min**

Schritt 8: Die Reaktion ist zu Ende wenn die **Temperatur bei 25 °C** liegt

b.) NEST 2 (rPLU3/rPLU4)

Schritt 1: Anfängliche Denaturierung – **95 °C bei 4 min**

Schritt 2: Annealing – **64 °C bei 2 min**

Schritt 3: Extension – **72 °C bei 2 min**

Schritt 4: Denaturierung – **94 °C bei 1 min**

Schritt 5: **Wiederholung der Schritte 2 - 4 bei der Dauer von 30 Zyklen**

Schritt 6: Final annealing – **64 °C bei 2 min**

Schritt 7: Final extension – **72 °C bei 5 min**

Schritt 8: Die Reaktion ist zu Ende wenn die **Temperatur bei 4 °C** liegt

c.) NEST 2 – *Plasmodium knowlesi* (Pk) - (Pmk8/Pmkr9)

Schritt 1: Anfängliche Denaturierung – **95 °C bei 4 min**

Schritt 2: Annealing – **55 °C bei 1 min**

Schritt 3: Extension – **72 °C bei 2 min**

Schritt 4: Denaturierung – **94 °C bei 30 Sekunden**

Schritt 5: **Wiederholung der Schritte 2 - 4 bei einer Dauer von 40 Zyklen**

Schritt 6: Final annealing – **55 °C bei 2 min**

Schritt 7: Final extension – **72 °C bei 10 min**

Schritt 8: Reaktion ist zu Ende wenn die **Temperatur bei 4 °C** liegt

2.2.4.2.6. Gel-Elektrophorese

Ausgangsprodukt war 50x TAE Puffer (Firma Roth), dieser musste vor dem weiteren Gebrauch zuerst im Verhältnis 1:50 verdünnt werden. Eine 1x TAE Lösung wurde hergestellt.

Für die Gel-Elektrophorese wurde ein 2 % Agarosegel verwendet. 2 g Agarose (Firmen Sigma-Aldrich, Biozym, Roth) wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen.

Anschließend wurden 100 ml 1x TAE-Puffer hinzugefügt. In einer Mikrowelle wurde die Agarose ca. 2 Minuten bei voller Leistung erhitzt. Wenn die Agarose flüssig war, wurde sie abgekühlt. Kurz darauf erfolgte die Zugabe von 10 µl 1 % Ethidiumbromid. Durch vorsichtiges Rotieren konnte das Ethidiumbromid gleichmäßig verteilt werden. Die Agarose wurde in eine spezielle Gelform gegossen. Je nach Anzahl der Proben konnten verschiedene Kämme eingesetzt werden. Ebenso konnten je nach Analysebedarf die Kämme doppelt oder einfach in das Gel positioniert werden.

Das Gel wurde für eine Stunde unter Lichtabdunkelung ausgehärtet. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt, das Gel aus seiner Gelform entnommen, die zu untersuchenden Proben, sowie eine Negativkontrolle und die dazu gehörende Positivkontrolle aufgetragen (Abb. 14). Die DNA-Leiter wurde an Position 1 aufgetragen. Die Nummer der Proben, sowie deren Reihenfolge wurden genauestens im Protokollheft notiert, um mögliche Arbeitsfehler ausschließen zu können. Die Gele wurden in das mit 1x TAE Puffer befüllte Elektrophoresegerät (Mupid, Biorad)

gegeben. Je nach Gerät variierte die Spannung von 70 – 90 V bei einer Laufzeit von 30 – 60 Minuten.

2.2.4.2.7. Interpretation der Ergebnisse

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Agarosegel aus der Pufferlösung entnommen und DNA-Stücke unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 14).

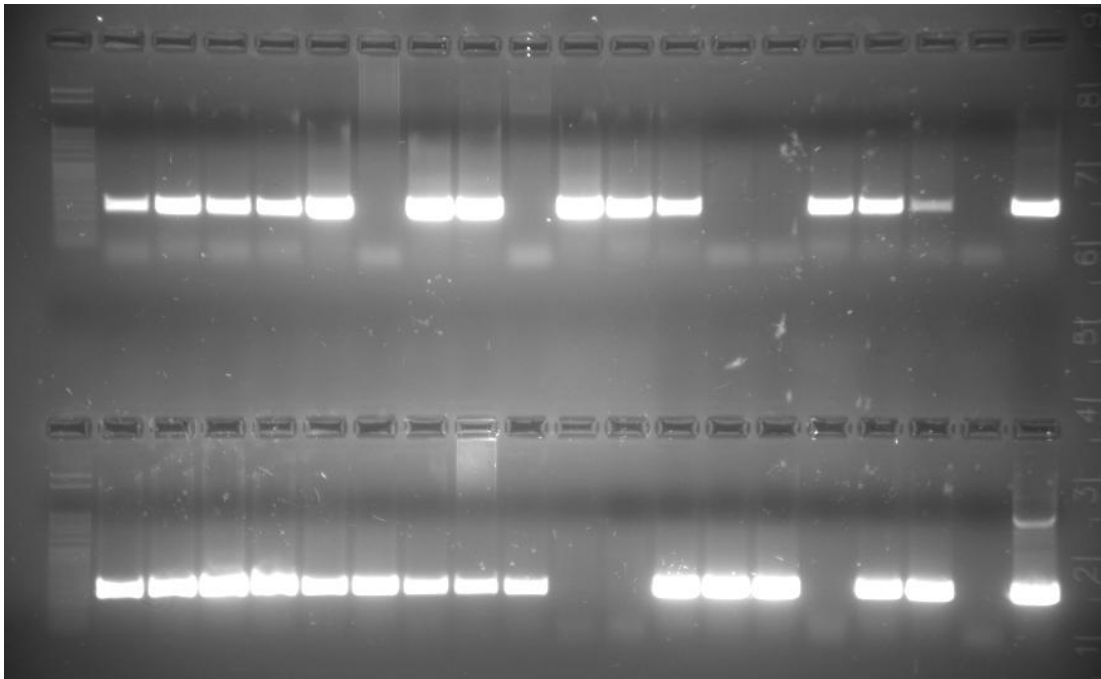


Abb. 14: Abbildung eines Agarosegels, Analyse auf *Plasmodium falciparum*. Links außen DNA-Leiter, gefolgt von 17 DNA-Proben, Negativkontrolle und positiver *Plasmodium falciparum* Kontrolle, Banden stellen jeweils eine positive Testung auf *Plasmodium falciparum* dar, leergebliebene Felder sind negativ.

Tab. 7: Auflistung der Artspezifischen Malaria mit ihren Basenpaaren (bp), nach aufsteigenden Basenpaaren gereiht

Artspezifische Malaria	Basenpaare
Pv	121 bp
Pm	146 bp
Pk	153 bp
Pf	206 bp
PoR	226 bp
rPLU3/4	235 bp
PoC	~ 800 bp

Vor der händischen Auswertung wurden DNA-Leiter, die Nummerierung der Proben, die negative Kontrollprobe sowie, die positive Kontrollprobe auf ihre Richtigkeit überprüft (Tab. 7).

2.2.4.2.8. Auswertung

Die aufgenommenen Rohdaten wurden im Programm Excel (Microsoft, Redmond, Washington, US) in eine Tabelle übertragen. Es wurde eine Gesamtübersichtstabelle mit allen positiven und negativen Ergebnissen aller Durchgänge, sowie für jeden Subbezirk einzelne Tabellen erstellt und zwischen Trocken- und Regensaison unterschieden. Zur Vereinfachung wurden die verschiedenen *Plasmodium ovale* Typen (PoC, PoR) zu *Plasmodium ovale* (Po) zusammengefasst.

Anschließend erfolgte mittels Excel eine grafische Darstellung der ausgewerteten Prozentsätze mittels Balkendiagrammen und Kreisdiagrammen.

Des Weiteren wurden mikroskopische Ergebnisse, RDTs und molekulare Untersuchungsmethoden (PCR) der asymptomatischen Malariafälle gegenübergestellt. Mittels VassarStats (<http://vassarstats.net/>) konnte Sensitivität, Spezifität, sowie deren positive und negative Vorhersagewerte berechnet werden. Folgende Formeln wurden für die statistische Auswertung verwendet:

Vierfeldertafel:

Als Ausgangspunkt für die Ermittlung von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert wurde eine Vierfeldertafel (Tab. 8) verwendet. Diese beruhte auf der Grundlage einer 2 x 2 Kontingenztafel. Grundvoraussetzung für die Verwendung einer Vierfeldertafel war, dass der Erwartungswert der vier Felder mindesten 5 sein musste.

Tab. 8: Darstellung einer allgemeinen Vierfeldertafel

Merkmal	M 1	M 2	Gesamt
M 1	a	b	a + b
M 2	c	d	d + c
gesamt	a + c	b + d	N = a + b + c + d

➤ **Sensitivität:**

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$

➤ **Spezifität:**

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

➤ **Positiver Vorhersagewert:**

$$\text{positiver Vorhersagewert} = \frac{\text{richtig positiv}}{(\text{richtig positiv} + \text{falsch positiv})}$$

➤ **Negativer Vorhersagewert:**

$$\text{negativer Vorhersagewert} = \frac{\text{richtig negativ}}{(\text{falsch negativ} + \text{richtig negativ})}$$

Chi²-Test:

Es handelt sich hier um eine Kreuztabelle, diese wird auch Kontingenztafel genannt. Die Aufstellung erfolgte z.B. in einer 2 x 2 Tabelle (siehe Vierfeldertafel). Mittels Chi²-Test wurde überprüft, ob ein bestimmtes Merkmal bei mindestens zwei Studienteilnehmern identisch vorhanden war. VassarStats (<http://vassarstats.net/>) ermöglichte die Auswertung für die dazugehörige Nullhypothese. Bei der Nullhypothese wurde davon ausgegangen, dass M1 und M2 unabhängig waren. Es stimmten erwartete wie auch beobachtete Häufigkeiten überein. Für eine größere Stückzahl der zu untersuchenden Studienteilnehmer wurde der Chi²-Test verwendet.

Exakter Fisher-Test:

Der Exakter Fisher-Test eignete sich besonders bei einer kleineren zu untersuchenden Anzahl von Studienteilnehmer. Der Erwartungswert musste kleiner 5 sein. Als Ausgangspunkt wurde eine 2 x 2 Kreuztabelle (siehe Vierfeldertafel)

verwendet. Mittels VassarStats (<http://vassarstats.net/>) konnten zwei p-Werte errechnet werden. Es handelte sich um exakte Signifikanz 1-seitig und exakte Signifikanz 2-seitig. Wurden die zu untersuchenden Merkmale gegenseitig negativ beeinflusst, so spricht man von einer einseitigen Wahrscheinlichkeit ($p =$). Im Gegensatz dazu wurde der zweiseitige Test bei einer allgemeinen Abhängigkeit angewendet.

3. Ergebnisse

3.1. Geschlechterverteilung der Studienteilnehmer

Insgesamt wurden 1867 Studienteilnehmer, die keine Malariasymptomatik aufwiesen, mittels PCR auf Malariaerreger untersucht. Das Geschlechterverhältnis war trotz willkürlicher Teilnehmerzahl annähernd gleich verteilt (Abb. 15).

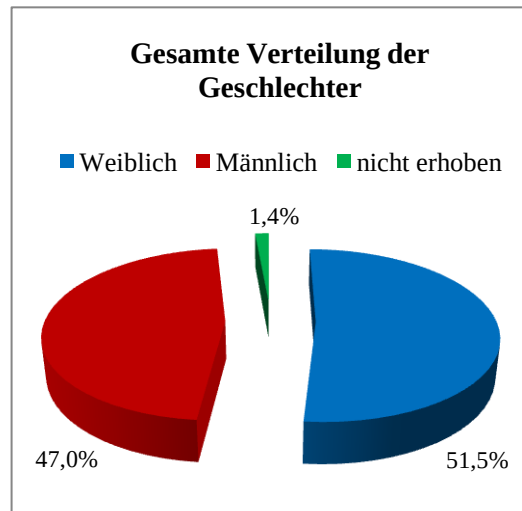


Abb. 15: Gesamtübersicht und prozentuelle Geschlechterverteilung der teilgenommenen Studienteilnehmer (n = 1867)

3.2. Altersvergleich der Studienteilnehmer

Den größten Anteil der Studienteilnehmer mit 27,6 % machten Kinder bis 10 Jahren aus, lediglich 0,1 % waren über 90 Jahre alt (Abb. 16). Studienteilnehmer ab 51 Jahren nahmen weniger an der Untersuchung teil.

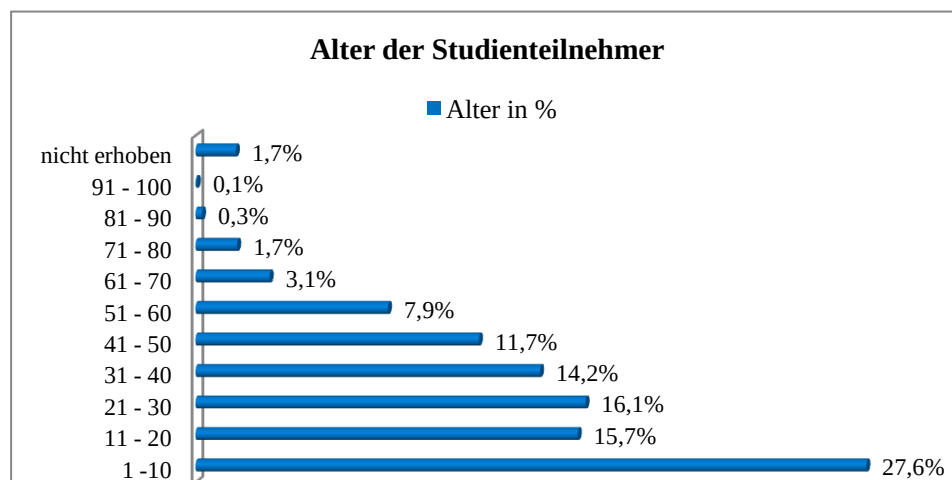


Abb. 16: Prozentuelle Altersverteilung der Studienteilnehmer, in Zehnerschritten aufgeteilt (n = 1867)

3.3. Rapid Diagnostic Test

Ein Schnelltest mittels RDT (Testung auf Falci Vax) wurde im Rahmen einer Studie 2007 von den Mitarbeitern der MARIB Außenstelle in Bangladesch (größtenteils bei Untersuchungen im Felde) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Daten der PCR und denen der Mikroskopie verglichen.

3.3.1. Allgemeine Durchführung des RDT

Von den 1867 untersuchten Studienteilnehmern wurden bei der Studie im Jahre 2007 nur bei 15,3 % der Studienteilnehmer ein RDT zur Erkennung einer möglichen Malariainfektion durchgeführt. Da RDTs vorwiegend im Feld verwendet wurden und Geld kosten. Bei 0,6 % der Studienteilnehmer lag kein Ergebnis des RDT vor.

3.3.2. Detaillierergebnisse des RDT

Von den getesteten Studienteilnehmern hatten 4,5 % eine Monoinfektion, bei 0,1 % der Teilnehmer konnte eine Mehrfachinfektion mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* festgestellt werden (Abb. 17).

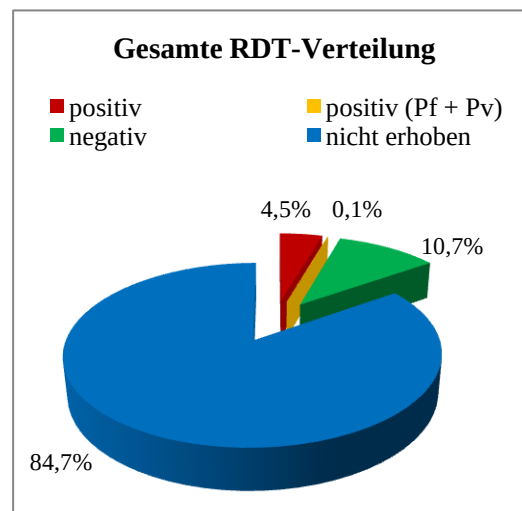


Abb. 17: Allgemeine Auswertung des RDT auf mögliche Malariainfektionen (n = 1867)

In der Regensaison wurde bei 4,8 % der Patienten *Plasmodium falciparum* gefunden, in der Trockensaison konnte nur bei 1,8 % der Patienten *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden (Abb. 18 und Abb. 19).

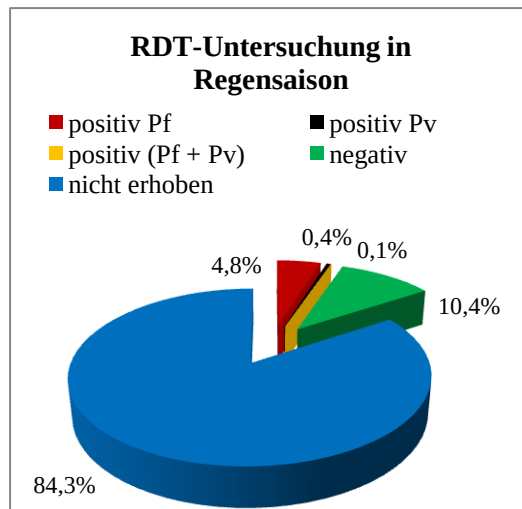


Abb. 18: Detaillierte Auflistung der Malaria-ergebnisse der RDT-Untersuchung im Sommer (n = 1429)

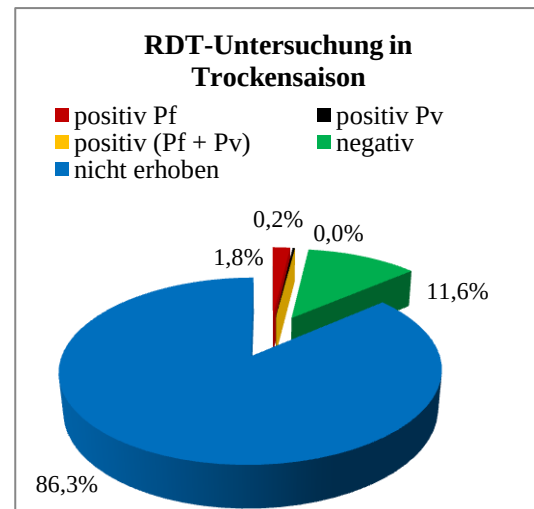


Abb. 19: Detaillierte Auflistung der Malaria-ergebnisse der RDT-Untersuchung im Winter (n = 438)

Tab. 9: Berechnung des Exakter Fisher-Tests, Vergleich der positiven *Plasmodium falciparum* Proben mit denen von *Plasmodium vivax* für die Regen- und Trockensaison (n = 84)

	Regensaison	Trockensaison	gesamt
positiv Pf	69	8	77
positiv Pv	6	1	7
gesamt	75	9	84

Tab. 10: Zu sehen sind die aus den Ergebnissen des Exakter Fisher-Tests resultierenden Signifikanzwerte, sowie der χ^2 -Test nach Pearson

Exakte Signifikanz (2-seitig)	p = 1
χ^2-Test nach Pearson	p = 0,005461

3.3.3. RDT im Vergleich mit Mikroskopie

In der Untersuchung auf Malaria wurde die Mikroskopie im Vergleich mit dem RDT als „Gold“-Standard angesehen. Sowohl in der Regen- und Trockensaison gab es die meisten Übereinstimmungen bei den Auswertungen beider Methoden (Tab. 11 und Tab. 13). In der Regensaison konnte bei der Mikroskopie eine Spezifität von 91,6 % erreicht werden, in der Trockensaison war sie mit 96,2 % höher (Tab. 12 und Tab. 14). In der Trockensaison wurde nur eine Probe in der Mikroskopie als Malaria positiv eingestuft (Tab. 13).

Tab. 11: Mittels einer Vierfeldertafel wurden die Untersuchungsergebnisse der Regensaison von Mikroskopie und RDT gegenüber gestellt, bei der Untersuchung auf Malaria wurde die Mikroskopie als Gold-Standard angesehen (n = 225)

Regensaison	Mikroskopie positiv	Mikroskopie negativ	gesamt
RDT positiv	63	13	76
RDT negativ	8	141	149
gesamt	71	154	225

Tab. 12: Aufgrund der ausgewerteten Vierfeldertafel von Tab. 11 konnte eine Aussage über Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert in der Regensaison getroffen werden

Sensitivität	88,7 %
Spezifität	91,6 %
Positiver Vorhersagewert	82,9 %
Negativer Vorhersagewert	94,6 %

Tab. 13: Mittels einer Vierfeldertafel wurden die Untersuchungsergebnisse bezüglich der auftretenden Malaria in der Trockensaison von Mikroskopie und RDT gegenüber gestellt. Gold-Standard war die Mikroskopie (n = 60)

Trockensaison	Mikroskopie positiv	Mikroskopie negativ	gesamt
RDT positiv	7	2	9
RDT negativ	1	50	51
gesamt	8	52	60

Tab. 14: Dargestellt sind Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert. Diese Werte beziehen sich auf die Ergebnisse der Vierfeldertafel von Tab. 13

Sensitivität	87,5 %
Spezifität	96,2 %
Positiver Vorhersagewert	77,8 %
Negativer Vorhersagewert	98,0 %

3.3.4. RDT im Vergleich mit molekularen Untersuchungsmethoden (PCR)

Als Gold-Standard in der Untersuchung der Malariaproben wurde die PCR betrachtet. 37 Proben konnten durch die PCR als Malaria positiv ausgewertet werden, der RDT zeigte jedoch hier ein negatives Ergebnis (Tab. 15). In der Trockensaison waren die meisten Ergebnisse bei beiden Methoden negativ (Tab. 17). Die Sensitivität war in der Regensaison mit 63,4 % höher als in der Trockensaison, jedoch war in der Trockensaison die Spezifität mit 97,8 % höher als in der Regensaison (Tab. 16 und Tab. 18).

Tab. 15: Vergleich der Untersuchungsmethoden von RDT und PCR, die in der Regensaison verwendet wurden, die PCR wurde bei der Untersuchung auf Malaria als Gold-Standard angesehen (n = 225)

Regensaison	PCR positiv	PCR negativ	gesamt
RDT positiv	64	12	76
RDT negativ	37	112	149
gesamt	101	124	225

Tab. 16: Gegenüberstellung von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert aus den resultierenden Ergebnissen der Regensaison von Tab. 15

Sensitivität	63,4 %
Spezifität	90,3 %
Positiver Vorhersagewert	84,2 %
Negativer Vorhersagewert	75,2 %

Tab. 17: In der Trockensaison wurde mittels RDT und PCR auf Malaria untersucht, Gold-Standard war die PCR (n = 60)

Trockensaison	PCR positiv	PCR negativ	gesamt
RDT positiv	8	1	9
RDT negativ	6	45	51
gesamt	14	46	60

Tab. 18: Es ergaben sich für die Trockensaison für Tab. 17 folgende Werte für Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert

Sensitivität	57,1 %
Spezifität	97,8 %
Positiver Vorhersagewert	88,9 %
Negativer Vorhersagewert	88,2 %

3.4. Vergleich Mikroskopie mit PCR

Die PCR wurde sowohl in der Regen- als auch Trockensaison als Gold-Standard angesehen. In der Regensaison hatten 119 Studienteilnehmer laut PCR und Mikroskopie keine Malaria (Tab. 19). Bei 35 Studienteilnehmern zeigte im Gegensatz zur Mikroskopie das molekulare Verfahren ein positives Resultat. Die Spezifität lag bei dieser Untersuchung bei 99,2 %, der positive Vorhersagewert betrug 98,5 % (Tab. 20).

Tab. 19: Gegenüberstellung von PCR und Mikroskopie in der Regensaison. Verwendet wurde eine Vierfeldertafel, die PCR galt als Gold-Standard (n = 222)

Regensaison	PCR positiv	PCR negativ	gesamt
Mikroskopie positiv	67	1	68
Mikroskopie negativ	35	119	154
gesamt	102	120	222

Tab. 20: Sensitivität, Spezifität, sowie positiver und negativer Vorhersagewert konnten mittels Formel errechnet werden. Grundlage waren die Ergebnisse aus Tab. 19

Sensitivität	65,7 %
Spezifität	99,2 %
Positiver Vorhersagewert	98,5 %
Negativer Vorhersagewert	77,3 %

In der Trockensaison waren die meisten Studienteilnehmer Malaria negativ (Tab. 21). Spezifität und positiver Vorhersagewert betrugen 100,0 % (Tab. 22).

Tab. 21: Für die Trockensaison ergaben sich bei Gegenüberstellung der PCR und Mikroskopie folgende Resultate. Als Gold-Standard wurde die PCR angesehen (n = 60)

Trockensaison	PCR positiv	PCR negativ	gesamt
Mikroskopie positiv	8	0	8
Mikroskopie negativ	6	46	52
gesamt	14	46	60

Tab. 22: Sensitivität, Spezifität, sowie positiver und negativer Vorhersagewert konnten anhand der vorliegenden Vierfeldertafel von Tab. 21 ermittelt werden

Sensitivität	57,1 %
Spezifität	100,0 %
Positiver Vorhersagewert	100,0 %
Negativer Vorhersagewert	88,5 %

3.4.1. Allgemeine Artenverteilung bei Mikroskopie und PCR

In der Regensaison wurde durch die Mikroskopie weder *Plasmodium malariae*, noch *Plasmodium ovale* entdeckt (Tab. 23). Die PCR konnte bei 67 Studienteilnehmern eine gemischte Infektion von *Plasmodium falciparum* mit *Plasmodium vivax* nachweisen. Mittels Mikroskopie konnte diese gemischte Infektion nur bei 3 Studienteilnehmern erkannt werden. Eine auftretende gemischte Infektion in der

Form *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* wurde durch die PCR bei 3 Studienteilnehmern gefunden.

Tab. 23: Gegenüberstellung und Vergleich der in der Regensaison gefundenen Malariaarten bei Mikroskopie und PCR (n = 1429)

Malariaarten	Mikroskopie (%)	PCR (%)
Pf	163 (11,4)	257 (18,0)
Pm	0 (0,0)	8 (0,6)
Po	0 (0,0)	6 (0,4)
Pv	36 (2,5)	59 (4,1)
Pf, Pm	0 (0,0)	17 (1,2)
Pf, Po	0 (0,0)	4 (0,3)
Pf, Pv	3 (0,2)	67 (4,7)
Pm, Pv	0 (0,0)	4 (0,3)
Pf, Pm, Po	0 (0,0)	3 (0,2)
Pf, Pm, Pv	0 (0,0)	8 (0,6)
Pf, Pm, Po, Pv	0 (0,0)	3 (0,2)
allg. pos./ Plasmodium sp.*)	2 (0,1)	4 (0,3)
negativ	1214 (85,0)	989 (69,2)
nicht durchgeführt	11 (0,8)	0 (0,0)
gesamt	1429 (100,0)	1429 (100,0)

*) Bei der Sequenzanalyse wurden die Proben als Gametozytenträger analysiert

Tab. 24: Gegenüberstellung und Vergleich der in der Trockensaison gefundenen Malariaarten bei Mikroskopie und PCR (n = 438)

Malariaarten	Mikroskopie (%)	PCR (%)
Pf	27 (6,2)	68 (15,5)
Pm	0 (0,0)	5 (1,1)
Po	0 (0,0)	1 (0,2)
Pv	7 (1,6)	26 (5,9)
Pf, Pm	0 (0,0)	3 (0,7)
Pf, Pv	2 (0,5)	10 (2,3)
Po, Pv	0 (0,0)	1 (0,2)
Pm, Pv	0 (0,0)	1 (0,2)
Pf, Pm, Pv	0 (0,0)	1 (0,2)
Pf, Po, Pv	0 (0,0)	1 (0,2)
negativ	400 (91,3)	321 (73,3)
nicht durchgeführt	2 (0,5)	0 (0,0)
gesamt	438 (100,0)	438 (100,0)

In der Trockensaison wurde durch die Mikroskopie bei 7 Studienteilnehmern *Plasmodium vivax* gefunden, durch die PCR konnte bei 26 Studienteilnehmern diese

Art nachgewiesen werden (Tab. 24). *Plasmodium malariae* als Monoinfektion konnte nur durch die PCR bei 5 Studienteilnehmern erkannt werden.

3.4.2. Vergleich der verschiedenen Malariaarten in den einzelnen Subbezirken

Durch die Anwendung der PCR konnten in allen 7 Bezirken Malaria nachgewiesen werden (Tab. 25). In Thanchi hatten die meisten Studienteilnehmer Erreger im Blut (100 Personen; 22,7 %), während in Alikadam die wenigsten Studienteilnehmer Malaria positiv waren. Hier konnten mittels PCR nur 22 Studienteilnehmer (5,0 %) als Malaria positiv erkannt werden.

Tab. 25: Mittels PCR wurde ein geografischer Vergleich der einzelnen Subbezirke in der Regensaison durchgeführt (n = 1429)

Regensaison	PCR positiv (%)	PCR negativ (%)	gesamt
Alikadam	22 (5,0)	167 (16,9)	189
Bandarban	79 (18,0)	141 (14,3)	220
Lama	35 (8,0)	185 (18,7)	220
Naikhongchhari	40 (9,1)	142 (14,4)	182
Rowangchhari	92 (20,9)	94 (9,5)	186
Ruma	72 (16,4)	140 (14,2)	212
Thanchi	100 (22,7)	120 (12,1)	220
gesamt	440 (100,0)	989 (100,0)	1429

In der Trockensaison konnten mittels PCR in 3 Bezirken (Bandarban, Rowangchhari und Ruma) Malaria nachgewiesen werden (Tab. 26). Zwischen Regensaison und Trockensaison gab es starke Unterschiede (z.B. Ruma: Sommer 34,0 % vs. Winter 13,4 %).

Tab. 26: Darstellung der Ergebnisse mittels Chi²-Test nach Pearson. Die Durchführung erfolgte mittels PCR, es werden die gefundenen Malariafälle in der Regensaison und Trockensaison gezeigt

	PCR positiv Regensaison (%)	PCR positiv Trockensaison (%)	p
Bandarban	79 (35,9)	81 (29,7)	0,141645
Rowangchhari	92 (49,5)	27 (27,6)	0,000374
Ruma	72 (34,0)	9 (13,4)	0,001253

In Ruma wurde bei 3 Studienteilnehmern eine Vierfachinfektion gefunden. Es handelte sich hier um *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* (Tab. 27). In Bandarban gab es 192 negative Testungen auf Malaria. Es konnten hier die meisten *Plasmodium vivax* Infektionen (18)

festgestellt werden. In Thanchi hatten die meisten Studienteilnehmer (61) *Plasmodium falciparum*.

Tab. 27: Darstellung der Mehrfachinfektionen durch Malaria in den einzelnen Subbezirken in der Regensaison und Trockensaison, die Auswertung erfolgte mittels PCR (n = 1867)

	Bezirk	Malariaarten	PCR (%)
Regensaison	Alikadam	Pf	12 (6,3)
		Pv	4 (2,1)
		Pf, Po	1 (0,5)
		Pf, Pv	4 (2,1)
		Pf, Pm, Po	1 (0,5)
		negativ	167 (88,4)
	Bandarban	Pf	52 (23,6)
		Pm	2 (0,9)
		Pv	5 (2,3)
		Pf, Pm	2 (0,9)
		Pf, Pv	14 (6,4)
		Pf, Pm, Pv	2 (0,9)
		<i>Plasmodium sp.</i> *)	2 (0,9)
		negativ	141 (64,1)
	Lama	Pf	22 (10,0)
		Pm	1 (0,5)
		Pv	4 (1,8)
		Pf, Pm	2 (0,9)
		Pf, Pm, Po	5 (2,3)
		Pf, Pm, Pv	1 (0,5)
		negativ	185 (84,1)
	Naikhongchhari	Pf	18 (9,9)
		Pm	1 (0,5)
		Po	3 (1,6)
		Pv	9 (4,9)
		Pf, Pm	1 (0,5)
		Pf, Pv	7 (3,8)
		Pf, Pm, Pv	1 (0,5)
		negativ	142 (78,0)
	Rowangchhari	Pf	51 (27,4)
		Po	1 (0,5)
		Pv	11 (5,9)
		Pf, Pm	3 (1,6)
		Pf, Po	3 (1,6)
		Pf, Pv	18 (9,7)
		Pm, Pv	3 (1,6)
		Pf, Pm, Po	1 (0,5)
		Pf, Pm, Pv	1 (0,5)
		negativ	94 (50,5)

Trockensaison	Ruma	Pf	41 (19,3)
		Pm	4 (1,9)
		Po	1 (0,5)
		Pv	11 (5,2)
		Pf, Pm	4 (1,9)
		Pf, Pv	5 (2,4)
		Pm, Pv	1 (0,5)
		Pf, Pm, Pv	2 (0,9)
		Pf, Pm, Po, Pv	3 (1,4)
		negativ	140 (66,0)
	Thanchi	Pf	61 (27,7)
		Po	1 (0,5)
		Pv	15 (6,8)
		Pf, Pm	5 (2,3)
		Pf, Pv	15 (6,8)
		Pf, Pv, Pm	1 (0,5)
		<i>Plasmodium</i> sp. *)	2 (0,9)
		negativ	120 (54,5)
	Bandarban	Pf	49 (17,9)
		Pm	4 (1,5)
		Po	1 (0,4)
		Pv	18 (6,6)
		Pf, Pm	3 (1,1)
		Pf, Pv	6 (2,2)
		negativ	192 (70,3)
	Rowangchhari	Pf	15 (15,3)
		Pm	1 (1,0)
		Pv	5 (5,1)
		Pf, Pv	3 (3,1)
		Pm, Pv	1 (1,0)
		Po, Pv	1 (1,0)
		Pf, Pm, Pv	1 (1,0)
		negativ	71 (72,4)
	Ruma	Pf	4 (6,0)
		Pv	3 (4,5)
		Pf, Pv	1 (1,5)
		Pf, Po, Pv	1 (1,5)
		negativ	58 (86,6)

*) Bei der Sequenzanalyse wurden die Proben als Gametozytenträger analysiert

Monoinfektionen mit *Plasmodium falciparum* konnten annähernd mit gleicher Verteilung bei Männern und Frauen gefunden werden (Tab. 28). Bei Männern zwischen 21 bis 30 Jahren kam diese Art häufiger vor. Seltener wurde *Plasmodium ovale* beobachtet. Hier gab es einen Unterschied in der Altersklasse von 11 bis 20 Jahren. Mehr Mädchen hatten *Plasmodium ovale*. Bei Mehrfachinfektionen mit

Plasmodium falciparum und *Plasmodium vivax* gab es die meisten Abweichungen zwischen Männern und Frauen.

Tab. 28: Tabellarische Darstellung von Pf Monoinfektionen, Pv Monoinfektionen, sowie Pf und Pv Mehrfachinfektionen, die Auswertung erfolgte mittels PCR, die Einteilung erfolgte in Zehnerschritte bei der Alterswahl (n = 526)

Alter	Pf Monofälle PCR		Pv Monofälle PCR		Pf und Pv Mehrfachinfektionen PCR	
	Weibl.	Männl.	Weibl.	Männl.	Weibl.	Männl.
1 -10	43	46	14	17	20	28
11 - 20	34	31	9	3	14	15
21 - 30	22	35	6	5	5	6
31 - 40	21	21	7	5	3	16
41 - 50	16	18	7	5	3	7
51 - 60	7	15	2	2	0	3
61 - 70	0	4	1	0	0	2
71 - 80	2	2	0	0	0	0
81 - 90	0	1	0	0	0	0
91 - 100	0	0	0	0	0	0
nicht durchgeführt	2	0	0	1	0	0
gesamt	147	173	46	38	45	77

In der Regensaison konnte bei 3 Studienteilnehmern eine Vierfachinfektion gefunden werden (Tab. 29). Die prädominante Art war sowohl in der Regen- wie auch Trockensaison *Plasmodium falciparum*, gefolgt von *Plasmodium vivax*.

Insgesamt wurde *Plasmodium falciparum* bei 359 Studienteilnehmern in der Regensaison und bei 83 Studienteilnehmern in der Trockensaison nachgewiesen (Tab. 30). Es handelte sich somit um die am häufigsten verbreitetste Art. Gefolgt von *Plasmodium vivax*.

Tab. 29: Gefundene Mono- und Mehrfachinfektionen bei *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* während der Regensaison und Trockensaison, Untersuchung erfolgte mittels PCR (n = 533)

	Malariaarten	PCR (%)
Regensaison	Pf	257 (48,2)
	Pf, Pm	17 (3,2)
	Pf, Po	4 (0,8)
	Pf, Pv	67 (12,6)
	Pf, Pm, Po	3 (0,6)
	Pf, Pm, Pv	8 (1,5)
	Pf, Pm, Po, Pv	3 (0,6)
	Pv	59 (11,1)
	Pm, Pv	4 (0,8)
Trockensaison	Pf	68 (12,8)
	Pf, Pm	3 (0,6)
	Pf, Pv	10 (1,9)
	Pf, Pm, Pv	1 (0,2)
	Pf, Po, Pv	1 (0,2)
	Pv	26 (4,9)
	Po, Pv	1 (0,2)
	Pm, Pv	1 (0,2)

Tab. 30: Artenspektrum der mit PCR festgestellten Malariaarten während der Regensaison (n_{gesamt} = 440) und Trockensaison (n_{gesamt} = 117)

	Malariaart	PCR (%)
Regensaison	Pf	359 (81,6)
	Pm	43 (9,8)
	Po	16 (3,6)
	Pv	141 (32,0)
	allg. pos./ <i>Plasmodium</i> sp.	4 (0,9)
Trockensaison	Pf	83 (70,9)
	Pm	10 (8,5)
	Po	3 (2,6)
	Pv	40 (34,2)

^{*)} Bei der Sequenzanalyse wurden die Proben als Gametozytenträger analysiert

4. Diskussion

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden 1867 asymptomatische, fieberfreie Studienteilnehmer mittels nested PCR auf Malariaerreger (Gattungs- und Artniveau) untersucht. Die Blutproben stammten aus Bangladesch und wurden sowohl in der Trocken- als auch in der Regensaison gesammelt. Bei den zu untersuchenden Arten handelte es sich um: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*. Die Ergebnisse wurden mit den vor Ort üblichen Untersuchungsmethoden (RDT, Mikroskopie) verglichen. RDT und Mikroskopie waren in der Erkennung von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* zuverlässig. Bei den anderen Arten gibt es aber Nachholbedarf in der Diagnosestellung. Zudem konnten bei den herkömmlichen Methoden nur wenige Mischinfektionen erkannt werden, einige Arten (*Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*) wurden übersehen.

Allgemeines

Malaria ist nach wie vor eine sehr ernst zu nehmende Erkrankung. Deshalb wurden durch die WHO im aktuellen World Malaria Report Daten von 104 Malaria endemischen Ländern gesammelt. Es wird vermutet, dass ca. 3,3 Milliarden Menschen der Gefahr ausgesetzt sind, an Malaria zu erkranken. Besonders Kinder und Schwangere sind betroffen (WHO, 2013c).

Rapid Diagnostic Test

Vergleicht man die drei Untersuchungsmethoden anhand der gewonnenen Falci Vax Erkenntnisse, so ist festzustellen, dass der verwendete RDT sensitiv auf Antigene von *Plasmodium falciparum* (HRP2) und *Plasmodium vivax* (pLDH) reagiert. Eine Parasitendichte von 2000 - 5000 Parasiten/µl reicht für den Nachweis von *Plasmodium falciparum* (sensitiver) und *Plasmodium vivax* (weniger sensitiv) aus. Bei einer Parasitendichte von 200 Parasiten/µl kann es zu Abweichungen in den Ergebnissen kommen. Gängige RDTs erlangen mittlerweile bei *Plasmodium falciparum* eine Sensitivität von 95 %. Oftmals werden allerdings positive Proteine durch den RDT noch nachgewiesen, obwohl eine Malariainfektion bereits therapiert ist, da die Antigene noch einige Zeit im Blut verbleiben (WHO, 2009). Dieser Schnelltest ist im Gegensatz zur PCR zeit- und kostengünstig. Er kann leicht und

direkt im Feld angewendet werden und stellt daher für die Ersterkennung von Malaria ein schnelles Hilfsmittel für diese beiden Arten dar. Jedoch können andere Monoinfektionen (*Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*) und Mischinfektionen mit diesem Test nicht erkannt werden.

STARZENGRUBER et. al. (2010) stellten mittels PCR fest, dass fälschlicherweise ein Studienteilnehmer durch den RDT mit *Plasmodium ovale* Erregern als Malaria negativ eingestuft wurde. In einer Studie von SELIMUZZAMAN et. al. konnten bei 262 Studienteilnehmern *Plasmodium falciparum* (83,7 %) und *Plasmodium vivax* (16,2 %) nachgewiesen werden (SELIMUZZAMAN et. al., 2010). Die Ergebnisse von SELIMUZZAMAN et. al. decken sich mit dieser Studie. In der Regen- und Trockensaison konnten mehr *Plasmodium falciparum* Infektionen im Gegensatz zu *Plasmodium vivax* Infektionen nachgewiesen werden. Mischinfektionen mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* wurden nur in einem geringen Ausmaß, oder gar nicht erkannt. Andere Mischformen wurden durch den RDT nicht gefunden.

Mikroskopie

Die Untersuchung mittels Mikroskopie gilt noch immer in manchen Teilen der Welt als Gold-Standard Methode. Sie leistet neben dem RDT einen wichtigen Beitrag zur Erkennung von *Plasmodium* sp. und ist leicht im Feld oder armen Regionen anzuwenden. Es bedarf allerdings einiger Übung und Einarbeitungszeit für die richtige Diagnose der Krankheitserreger. Schizonten, Trophozoiten und Gametozyten müssen richtig erkannt und den einzelnen Arten entsprechend zugeordnet werden. Oft werden vor Ort nicht bekannte Malariaerreger übersehen, da diese bis dato nicht in dieser Region vertreten waren.

So wurde *Plasmodium ovale* fälschlicherweise zuerst als *Plasmodium malariae* diagnostiziert und behandelt. Es erfolgte ein Relaps (STARZENGRUBER et. al. 2010). Nur durch die weitere Auswertung mittels PCR konnte zum ersten Mal 2010 *Plasmodium ovale* in Bangladesch nachgewiesen werden (FUEHRER et. al., 2010a). MAUDE et. al. führten von 1999 bis 2006 eine Studie im Südosten Bangladeschs durch. Es konnte durch die Mikroskopie *Plasmodium falciparum* (11,6 %) als häufigste Art erkannt werden, gefolgt von *Plasmodium vivax* (4,9 %). Mischinfektionen mit beiden Arten kamen bei 0,01 % der Studienteilnehmern vor (MAUDE et. al., 2008). Zum damaligen Zeitpunkt war *Plasmodium ovale* und

Plasmodium malariae in Bangladesch noch nicht bekannt. Diese Studie unterstützt die Ergebnisse dieser Diplomarbeit. Es wurde mittels Mikroskopie in der Regensaison (11,4 %) und Trockensaison (6,2 %) *Plasmodium falciparum* am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von der zweithäufigsten Form *Plasmodium vivax*. Hier hatten in der Regensaison 2,5 % der Studienteilnehmer und in der Trockensaison 1,6 % der Studienteilnehmer diese Art. Mischinfektionen mit beiden Arten konnten sowohl in der Regensaison (0,2 %), wie auch in der Trockensaison (0,5 %) zu einem geringeren Anteil nachgewiesen werden. Andere Arten, sowie andere Mischinfektionen wurden durch die Mikroskopie nicht entdeckt.

PCR

Mittels PCR können bereits durch kleinste Mengen DNA (6 Parasiten/µl) Malariaerreger nachgewiesen werden. Diese Methode ist sehr sensitiv und empfiehlt sich als Ergänzung zu den am häufigsten gebräuchlichen Methoden (RDT, Mikroskopie). Es werden dazu hoch konservierte Regionen der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA (*SSU rRNA*) für die Diagnose der Malaria benutzt (SINGH et. al., 1999). Da es sich um eine ausgereifte Technik handelt, sollte dieses Verfahren als neue Gold-Standard Methode angesehen werden. Diese Methode ist allerdings sehr zeitaufwendig, kostenintensiv, kontaminationsanfällig und wird daher in Entwicklungsländern selten angewendet. Zu den gängigsten Arten *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax*, die durch Mikroskopie und RDT erkannt werden, können mittels PCR noch die Arten *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, und *Plasmodium ovale* nachgewiesen werden. Mischinfektionen werden durch die beiden Untersuchungsmethoden (RDT, Mikroskopie) oft vernachlässigt. Durch die PCR können Mischinfektionen aller Arten viel einfacher und sicherer erkannt werden, welches die korrekte Behandlung von Malariapatienten wesentlich erleichtert.

FUEHRER et. al. untersuchten in ihrer Studie Fieberpatienten. Durch die PCR konnten bei 11,1 % der Studienteilnehmer eine Mischinfektion, die durch *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* verursacht wurde nachgewiesen werden. Bei 1,1 % der Studienteilnehmer konnte *Plasmodium falciparum* mit *Plasmodium malariae* diagnostiziert werden. Eine Mischinfektion bestehend aus *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* wurde bei 1,1 % der Studienteilnehmer erkannt. *Plasmodium falciparum* wurde am häufigsten

gefunden, gefolgt von *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale*. In dieser Studie wurden die Teilnehmer auch mittels Mikroskopie und RDT untersucht, bei beiden Methoden konnte lediglich die Kombination der Erreger von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* nachgewiesen werden (FUEHRER et. al. 2010a). Vergleicht man diese Studie mit den hier erlangten Erkenntnissen, so ist festzustellen, dass in der Regensaison durch die PCR bei 0,2 % der Studienteilnehmern Mischinfektionen in der Reihenfolge *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* nachgewiesen werden konnten. Weitere Mischinfektionen mit *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* konnten nur durch die PCR ermittelt werden. Ebenfalls konnten auch Mischinfektionen mit *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium vivax* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu bisher üblichen Methoden (RDT, Mikroskopie) konnte durch die PCR bei wesentlich mehr asymptomatischen Studienteilnehmern Malaria nachgewiesen werden. Bei *Plasmodium falciparum* handelte es sich bei allen 3 Untersuchungsmethoden (RDT, Mikroskopie, PCR) um die dominanteste Art, gefolgt von *Plasmodium vivax*. *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* wurden nur durch die PCR bestätigt. Jedoch sind beide Arten mittlerweile in Bangladesch gängig vertreten und sollten daher auch durch geübte Mikroskopierer besser erkannt werden. *Plasmodium knowlesi* konnte wie bei FUEHRER et. al. (2010a) nicht nachgewiesen werden. Vermutlich fehlen in Bangladesch die nötigen Zwischenwirte (bestimmte Makakenarten), die eine Übertragung dieser Art auf den Menschen verursachen können.

Trocken- und Regensaison

Malaria ist in Bangladesch in 13 Bezirken heimisch. Diese befinden sich im Norden und Osten des Landes, angrenzend an Indien und Myanmar (HAQUE et. al., 2009). Es wurde bei der Auswertung der Ergebnisse im Rahmen der Diplomarbeit zwischen Trocken- und Regensaison unterschieden. Entgegen der ursprünglichen Erwartungen konnten auch in der Trockensaison viele asymptomatische Malariainfektionen nachgewiesen werden. Laut ABEKU et. al. können Regenfälle allerdings einen positiven Einfluss auf Malariavektoren haben (ABEKU et. al., 2007). Diese Aussage bestätigte sich. In der Regensaison wurden mehr Malariafälle gefunden. Wie bei HAQUE et. al. (2009) konnten auch in den Bezirken die nördlich und östlich zu

Myanmar gelegen sind, höhere Malariainfektionen durch die PCR ermittelt werden. Es handelte sich hier um Bandarban, Rowangchhari, Thanchi und Ruma. Vermutlich trägt die schlechtere Infrastruktur entlang der Grenze eine Rolle dazu bei. Besonders Kinder und Schwangere sind am ehesten von Malariaerregern gefährdet (WHO, 2013c). So sterben an Malaria z.B. in Gambia ein Viertel der Kinder zwischen 1 und 4 Jahren. Bei permanentem Kontakt mit Erregern entwickelt sich Semiimmunität. Es kommt in weiterer Folge bei neuer Infektion zu einem möglichen asymptomatischen Krankheitsverlauf (MARSH & SNOW, 1999; GREENWOOD et. al., 1987). Diese Aussagen werden durch die Studie unterstützt, da es sich um asymptomatische Studienteilnehmer handelte und Malariaerreger gefunden wurden. 27,6 % der Studienteilnehmer waren zwischen 1 und 10 Jahren alt, es handelte sich hier um den größten Altersanteil.

Conclusio

Bei der PCR handelt es sich von allen drei Untersuchungsmethoden (RDT, Mikroskopie, PCR) um das sensitivste Testverfahren. Wie schon oben erwähnt, konnte nachgewiesen werden, dass *Plasmodium falciparum*, gefolgt von *Plasmodium vivax* am häufigsten gefunden wurde. Durch die PCR konnten neue Arten wie *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* nachgewiesen werden. *Plasmodium knowlesi* gilt nach wie vor als nicht endemisch. Es konnten im Gegensatz zu RDT und Mikroskopie vier der fünf humanen Arten, sowie Mischinfektionen dieser Arten gefunden werden. Durch diese molekularbiologische Methode konnten bei wesentlich mehr asymptomatischen Studienteilnehmern Malariaerreger nachgewiesen werden. Deshalb sollte die PCR als Gold-Standard Methode und als Diagnostikverfahren der Wahl angesehen werden. Jedoch ist dies in Entwicklungsländern, bei fehlender Infrastruktur und schlecht bzw. nicht ausgebildeten Laborpersonal und Ärzten nicht möglich. Es handelt sich auch um eine teure und aufwändige Untersuchungsmethode. Hier gilt die Mikroskopie noch immer als Methode der Wahl. Trotzdem sollte auch bei der Mikroskopie mehr Augenmerk auf weniger häufig vorkommende Arten gelegt werden, da diese stark vernachlässigt werden. Es besteht ein hoher Nachholbedarf bei der Erkennung nicht häufig vorkommender Malariaerreger bzw. bei der Erkennung von Mischinfektionen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Prävalenzstudie wurden 1867 Blutproben von asymptomatischen, fieberfreien Studienteilnehmern aus Bangladesch mit molekularen Diagnostikverfahren auf den Befall mit Malariaerregern untersucht. Für den Nachweis und die Klassifizierung von Plasmodien wurden hoch konservierte Regionen der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA (SSU *rRNA*) verwendet. Hierfür wurde eine nested PCR verwendet mit der zuerst mit einer gattungsspezifischen Analyse das Vorhandensein von Malariaerregern untersucht wurde. Positive Plasmodienproben wurden anschließend auf Artniveau bestimmt: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*. Bei dieser Technik sind bereits kleine Mengen von DNA (6 Parasiten/µl) für den Nachweis ausreichend.

Die gewonnenen PCR-Ergebnisse wurden mit bisher üblichen Untersuchungsmethoden (Mikroskopie und RDT) verglichen, um einen besseren Einblick bezüglich Übereinstimmungen (Sensitivität, Spezifität) der verschiedenen Untersuchungsmethoden zu erlangen.

Bis zu Beginn dieser Prävalenzstudie galten *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* als die dominanten und einzigen bekannten Arten in Bangladesch, wo hingegen das Wissen über die Verbreitung von *Plasmodium malariae* in diesem Land gering war und *Plasmodium ovale* sowie *Plasmodium knowlesi* nicht bekannt waren. Dies beruht auf der Tatsache, dass frühere Studien oft auf bestimmte RDTs basierten mit denen ausschließlich *Plasmodium vivax* und *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden können. Durch das fehlende Wissen wurden auch bei der Mikroskopie seltenere Erreger falsch klassifiziert.

Plasmodium falciparum und *Plasmodium vivax* wurden, wie erwartet, in allen drei Untersuchungsmethoden am häufigsten gefunden. Hier gab es die meisten Übereinstimmungen bei Vergleichen der Ergebnisse von RDT, Mikroskopie und PCR. Mit der PCR konnten sowohl *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* als auch Mehrfachinfektionen ermittelt werden. Diese konnten allerdings durch Mikroskopie und RDT nicht in diesem Ausmaß erkannt werden. Von daher empfiehlt sich in Zukunft aufgrund der höheren Sensitivität, sowie Spezifität, die

PCR als Gold-Standard in der Malariadiagnostik in Betracht zu ziehen und Mikroskopierer, Ärzte und Laboranten auf das Vorhandensein der selteneren Malariaarten, sowie von Mischinfektionen aufmerksam zu machen.

5.1. Abstract

Within this prevalence study 1867 blood samples of asymptomatic, afebrile Bangladeshi study participants were examined for the presence of malaria pathogens with molecular diagnostic tools. We used highly conserved regions of the small subunit ribosomal RNA gene (*SSU rRNA*) for the detection and classification of plasmodian parasites. Therefore a nested PCR was used. First all samples were analyzed for the presence of malaria parasites (genus-level). Afterwards those samples giving positive results for *Plasmodium* sp. were classified to species level: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium vivax*. At this technique only small amounts of DNA (6 parasites/ μ l) are necessary to give positive results.

The resulting PCR-results were further compared with standardized techniques (microscopy and RDTs) to compare the levels of sensitivity and specificity.

Until recently (start of the prevalence study) only *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* were the only malaria species known to be present and dominant in Bangladesh. The knowledge about *Plasmodium malariae* was very limited and neither *Plasmodium ovale* nor *Plasmodium knowlesi* had ever been reported from this country. This is a result of the circumstance that most previously studies based on specific RDTs which can only detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. With the resulting lack of knowledge about the other malaria parasites these were also missed at microscopic analysis.

As expected *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* were the predominant species at all three diagnostic devices (RDT, microscopy and PCR). Furthermore the presence of *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and mixed infections were observed. However, at microscopy and RDTs these results were not documented. These results lead to the suggestion that PCR (higher sensitivity and specificity) should be used as gold-standard for malaria diagnostics. Furthermore microscopists,

doctors and laboratory staff should be informed and aware about the presence of rare malaria species and mixed infections.

6. Literaturverzeichnis

Bücher und Papers

ABEKU T. A. (2007): Response to malaria epidemics in Africa. *Emerging infectious diseases* 13 (5): 681 – 686

In: MOLINEAUX L., WERNSDORFER W. H., . MCGREGOR I. (1988): The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. *Malaria: principles and practice of malariology*. Volume 2: 913 - 998.

AHMED S. M., HAQUE R., HAQUE U., HOSSAIN A. (2009): Knowledge on the transmission, prevention and treatment of malaria among two endemic populations of Bangladesh and their health-seeking behaviour. *Malaria journal* 8 (1): 173

BAIRD J. K., PURUNOMO, MASBAR S. (1990): *Plasmodium ovale* in Indonesia. *Southeast Asia Journal of Tropical Medicine and Public Health* 21: 541 - 544

In: WIN T. T., LIN K., MIZUNO S., ZHOU M., LIU Q., FERREIRA M. U., TANTULAR I. S., KOJIMA S., ISHII A., KAWAMOTO F. (2002): Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Tropical Medicine & International Health* 7 (3): 231 - 239

BANGS M. J., PURUNOMO, ANTHONY R. L. et. al. (1992): *Plasmodium ovale* in the highlands of Irian Jaya, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 86: 307 - 308

In: WIN T. T., LIN K., MIZUNO S., ZHOU M., LIU Q., FERREIRA M. U., TANTULAR I. S., KOJIMA S., ISHII A., KAWAMOTO F. (2002): Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Tropical Medicine & International Health* 7 (3): 231 - 239

BRIET O., VOUNATSOU P., GUNAWARDENA D., GALAPPATHTHY G., AMERASINGHE P. (2008): Temporal correlation between malaria and rainfall in Sri Lanka. *Malaria Journal* 7 (1): 77

In: HAQUE U., HASHIZUME M., GLASS G. E., DEWAN A. M., OVERGAARD H. J., YAMAMOTO T. (2010): The Role of Climate Variability in the Spread of Malaria in Bangladeshi Highlands. PloS one 5 (12): e14341

CALDERARO A., PICCOLO G., PERANDIN F., GORRINI C., PERUZZI S., ZUELLI C., RICCI L., MANCA N., DETTORI G., CHEZZI C., SNOUNOU G. (2007). Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. Journal of clinical microbiology 45 (5): 1624 - 1627

CAMPBELL N. (2000): Biologie. 2. Korrigierter Nachdruck. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 1 – 1440

CHIN W., CONTACOS P. G., COLLINS W. E., JETER M. H., ALPERT E. (1968a): Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 17 (3): 355 - 358
In: KANTELE A., JOKIRANTA T. S. (2011): Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clinical Infectious Diseases 52 (11): 1356 – 1362

CHIN W., CONTACOS P. G., COLLINS W. E., JETER M. H., ALPERT E. (1968b): Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 17 (3): 355 - 358
In: WHITE N. J. (2008): *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clinical infectious diseases. 46 (2): 172 - 173

CHIN W., CONTACOS P. G., COATNEY G. R., KIMBALL H. R. (1965a): A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. Science 149 (3686): 865
In: KANTELE A., JOKIRANTA T. S. (2011): Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clinical Infectious Diseases 52 (11): 1356 – 1362

CHIN W., CONTACOS P. G., COATNEY G. R., KIMBALL H. R. (1965b): A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science* 149 (3686): 865

In: SINGH B., SUNG L. K., MATUSOP A., RADHAKRISHNAN A., SHAMSUL S. S. G., COX-SINGH J., THOMAS A., CONWAY, D. J. (2004): A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* 363 (9414): 1017 - 1024

COATNEY G. R., COLLINS W. E., WARREN M., CONTACOS P. G. (2003): CD-ROM. The primate malarias [original book published 1971]. Division of Parasitic Disease, producers. Version 1.0. Atlanta. GA: CDC. 2003: 1 - 366

COLLINS W. E., JEFFERY G. M. (2005): *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews* 18 (3): 570 - 581

COOK G., ZUMLA A. (2003): Manson's Tropical Diseases. 21. Auflage. Saunders Verlag. London: 1 – 1864

COX-SINGH J., SINGH B. (2008): *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance. *Trends in parasitology* 24 (9): 406 - 410

In: KANTELE A., JOKIRANTA T. S. (2011): Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Infectious Diseases* 52 (11): 1356 – 1362

DÖNGES J. (1988): Parasitologie. Mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen. 2. Überarb. und erw. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart: 1 – 350

FONG Y. L., CADIGAN F. C., COATNEY G. R. (1971): A presumptive case of naturally occurring *Plasmodium knowlesi* malaria in man in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 65 (6): 839 - 840

In: SINGH B., SUNG L. K., MATUSOP A., RADHAKRISHNAN A., SHAMSUL S. S. G., COX-SINGH J., THOMAS A., CONWAY, D. J. (2004): A large focus of

naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. The Lancet 363 (9414): 1017 - 1024

FUEHRER H. P., STARZENGRUBER P., SWOBODA P., KHAN W. A., MATT J., LEY B., THRIEMER K., HAQUE R., YUNUS E. B., HOSSAIN S. M., WALOCHNIK J., NOEDL H. (2010a): Indigenous *Plasmodium ovale* malaria in Bangladesh. The American journal of tropical medicine and hygiene 83 (1): 75 - 78

GARNHAM P. C. C. (1966): XI Human quartan malaria parasite. Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell Scientific Publications. Oxford: 257 - 284

In: ZHOU M., LIU Q., WONGSRICHANALAI C., SUWONKERD W., PANART K., PRAJAKWONG S., PENSIRI A., KIMURA M., MATSUOKA H., FERREIRA M. U., ISOMURA S., KAWAMOTO F. (1998): High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. Tropical Medicine & International Health 3 (4): 304 - 312

GREENWOOD B. M., BRADLEY A. K., GREENWOOD A. M., BYASS P., JAMMEH K., MARSH K., TULLOCH S., OLDFIELD F. S. J, HAYES R. (1987): Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81 (3): 478 - 486

In: COOK G., ZUMLA A. (2003): Manson's Tropical Diseases. 21. Auflage. Saunders Verlag. London: 1 – 1864

HAQUE U., HASHIZUME M., GLASS G. E., DEWAN A. M., OVERGAARD H. J., YAMAMOTO T. (2010): The Role of Climate Variability in the Spread of Malaria in Bangladeshi Highlands. PloS one 5 (12): e14341

HAQUE U., AHMED S. M., HOSSAIN S., HUDA M., HOSSAIN A., ALEM M. S., MONDAL D., KHAN W. A., KHALEQUZZAMAN M., HAQUE R. (2009): Malaria Prevalence in Endemic Districts of Bangladesh. PLoS One 4 (8): e6737

HAWORTH J. (1988a): The global distribution of malaria and the present control effort. Malaria: principles and practice of malariology. Volume 2 (eds WERNSDORFER W. H. & MCGREGOR I.). Churchill Livingstone. Edinburgh: 1379 – 1420

In: WIN T. T., LIN K., MIZUNO S., ZHOU M., LIU Q., FERREIRA M. U., TANTULAR I. S., KOJIMA S., ISHII A., KAWAMOTO F. (2002): Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Tropical Medicine & International Health 7 (3): 231 - 239

HAWORTH J. (1988b): The global distribution of malaria and the present control effort. Malaria: principles and practice of malariology. Volume 2 (eds WERNSDORFER W. H. & MCGREGOR I.). Churchill Livingstone. Edinburgh: 1379 – 1420

In: ZHOU M., LIU Q., WONGSRICHANALAI C., SUWONKERD W., PANART K., PRAJAKWONG S., PENSIRI A., KIMURA M., MATSUOKA H., FERREIRA M. U., ISOMURA S., KAWAMOTO F. (1998): High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. Tropical Medicine & International Health 3 (4): 304 - 312

HOMBHANGE F. W. (1998): *Plasmodium ovale* species in Papua New Guinea - lest we forget. PNG Med J 41 (3 - 4): 116 - 118

In: MARATHE A., DATE V., SHAH H. N., TRIPATHI J. R. (2006): *Plasmodium ovale* - a case report from Gujarat. Journal of Vector Borne Diseases 43 (4): 206 - 208

JAMBULINGAM P., MOHAPATRA S. S., DAS L. K., DAS P. K., RAJAGOPALAN P. K. (1989): Detection of *Plasmodium ovale* in Koraput district, Orissa state. The Indian journal of medical research 89: 115 - 116

In: MARATHE A., DATE V., SHAH H. N., TRIPATHI J. R. (2006): *Plasmodium ovale* - a case report from Gujarat. Journal of Vector Borne Diseases 43 (4): 206 - 208

KANTELE A., JOKIRANTA T. S. (2011): Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clinical Infectious Diseases 52 (11): 1356 – 1362

KAWAMOTO F., LIU Q., FERREIRA M. U., TANTULAR I. S. (1999): How Prevalant are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia? Parasitology Today 15 (10): 422 - 426

In: STARZENGRUBER P., FUEHRER H. P., SWOBODA P., KHAN W. A., YUNUS E. B., HOSSAIN S. M., WALOCHNIK J., NOEDL. H. (2010): The first case of *Plasmodium ovale* malaria from Bangladesh. BMJ Case Reports 2010: doi: 10.1136/bcr.03.2010.2865

MARATHE A., DATE V., SHAH H. N., TRIPATHI J. R. (2006): *Plasmodium ovale* - a case report from Gujarat. Journal of Vector Borne Diseases 43 (4): 206 - 208

MARSH K., SNOW R. W. (1999): Malaria transmission and morbidity. Parassitologia 41 (1 - 3): 241 - 246

In: COOK G., ZUMLA A. (2003): Manson's Tropical Diseases. 21. Auflage. Saunders Verlag. London: 1 – 1864

MAUDE R. J., DONDORP A. M., FAIZ M. A., YUNUS E. B., SAMAD R., HOSSAIN A., RAHMAN M. R. (2008): Malaria in southeast Bangladesh: A descriptive study. Bangladesh Medical Research Council Bulletin 34 (3): 87 - 89

McPHERSON R. A., PINCUS M. R. (2007): Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21 edition. Saunders Verlag. New Delhi: 1 - 1472

MEHLHORN H., PIEKARSKI G. (1998): Grundriss der Parasitenkunde. 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart: 1 – 516

MENDIS K., SINA B. J., MARCHESINI P., CARTER R. (2001): The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene 64 (1): 97 - 106

MISHRA B., MIRDHA B. R., SAMANTRAY J. C. (1999): *Plasmodium ovale* malaria in Delhi. Indian journal of pediatrics 66 (1): 143 - 144

In: MARATHE A., DATE V., SHAH H. N., TRIPATHI J. R. (2006): *Plasmodium ovale* - a case report from Gujarat. Journal of Vector Borne Diseases 43 (4): 206 - 208

MOLINEAUX L. (1988): The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. Malaria: Principles and Practice of Malariology. Vol. 2 (eds WERNSDORFER W. H., MCGREGOR I.). Churchill Livingstone. Edinburgh: 913 - 998

In: WIN T. T., LIN K., MIZUNO S., ZHOU M., LIU Q., FERREIRA M. U., TANTULAR I. S., KOJIMA S., ISHII A., KAWAMOTO F. (2002): Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Tropical Medicine & International Health 7 (3): 231 - 239

MOUCHET J. (2000): Airport malaria: a rare disease still poorly understood. Euro surveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 5 (7): 75 - 76

MUKHERJEA A. K., CHATTERJEE P. K., PAUL S. C. (1966): A case of *Plasmodium ovale* infection. Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine 14 (3): 88 - 89

In: MARATHE A., DATE V., SHAH H. N., TRIPATHI J. R. (2006): *Plasmodium ovale* - a case report from Gujarat. Journal of Vector Borne Diseases 43 (4): 206 - 208

RAHMAN W., CHOTIVANICH K., SILAMUT K., TANOMSING N., HOSSAIN A., FAIZ M. A., DONDORP A. M., MAUDE R. J. (2010): *Plasmodium malariae* in Bangladesh. Trans R Soc Trop Med Hyg. 104 (1): 78 – 80

SELIMUZZAMAN S. M., ISLAM S. J., NAHAR Z., DAS R., RAHMAN M. A. (2010): Malarigen malaria Pf/Pv antigen rapid test: a simple and effective tool for diagnosis of malaria in the far-flung hilly areas of Bangladesh. Mymensingh medical journal: MMJ 19 (1): 94

SINGH B., SUNG L. K., MATUSOP A., RADHAKRISHNAN A., SHAMSUL S. S. G., COX-SINGH J., THOMAS A., CONWAY, D. J. (2004): A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. The Lancet 363 (9414): 1017 - 1024

SINGH B., BOBOGARE A., COX-SINGH J., SNOUNOU G., ABDULLAH M. S., RAHMAN H. A. (1999): A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. The American journal of tropical medicine and hygiene 60 (4): 687 - 692

SNOUNOU G., SINGH B. (2002): Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. Methods in molecular medicine 72: 189 - 203

STARZENGRUBER P., FUEHRER H. P., SWOBODA P., KHAN W. A., YUNUS E. B., HOSSAIN S. M., WALOCHNIK J., NOEDL. H. (2010): The first case of *Plasmodium ovale* malaria from Bangladesh. BMJ Case Reports 2010: doi: 10.1136/bcr.03.2010.2865

STEPHENS J. W. W. (1922): A new malaria parasite of man. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 16: 383 - 386

In: MARATHE A., DATE V., SHAH H. N., TRIPATHI J. R. (2006): *Plasmodium ovale* - a case report from Gujarat. Journal of Vector Borne Diseases 43 (4): 206 - 208

STORCH V., WELSCH U. (1999): Kükenthal Zoologisches Praktikum. 23. Auflage. Spektrum Verlag. Heidelberg: 1 - 508

SUTHERLAND C. J., TANOMSING N., NOLDER D., OGUIKE M., JENNISON C., PUKRITTAYAKAMEE S., DOLECEK C., HIEN T. T., DO ROSÁRIO V. E., AREZ A. P. et. al. (2010): Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. Journal of Infectious Diseases 201 (10): 1544 - 1550

TANG T. H., SALAS A., ALI-TAMMAM M., MARTINEZ M., LANZA M., ARROYO E., RUBIO J. (2010): First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malaria Journal* 9 (1): 219

In: KANTELE A., JOKIRANTA T. S. (2011): Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Infectious Diseases* 52 (11): 1356 – 1362

TANGIN A., KOMICHI Y., WAGATSUMA Y., RASHIDUL H., WATAYA Y., KIM H. S. (2008): Detection of malaria parasites in mosquitoes from the malaria-endemic area of Chakaria, Bangladesh. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31 (4): 703 - 708

VAN DEN BROEK I. V. F., VAN DER WARDT S., TALUKDER L., CHAKMA S., BROCKMAN A., NAIR S., ANDERSON T. C. (2004): Drug resistance in *Plasmodium falciparum* from the Chittagong Hill Tracts, Bangladesh. *Tropical Medicine & International Health* 9 (6): 680 - 687

WESTHEIDE W., RIEGER R. (1996): *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart: 1 – 909

WHITE N. J. (2008): *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical infectious diseases*. 46 (2): 172 - 173

WONGSRICHANALAI C., BARCUS M. J., MUTH S., SUTAMIHARDJA A., WERNSDORFER W. H. (2007): A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77 (Suppl 6): 119 - 127

In: STARZENGRUBER P., FUEHRER H. P., SWOBODA P., KHAN W. A., YUNUS E. B., HOSSAIN S. M., WALOCHNIK J., NOEDL H. (2010): The first case of *Plasmodium ovale* malaria from Bangladesh. *BMJ Case Reports* 2010: doi: 10.1136/bcr.03.2010.2865

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2009): Malaria Rapid Diagnostic Test Performance – Results of WHO product testing of malaria RDTs. Round 2: 1 - 46

WIN T. T., LIN K., MIZUNO S., ZHOU M., LIU Q., FERREIRA M. U., TANTULAR I. S., KOJIMA S., ISHII A., KAWAMOTO F. (2002): Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Tropical Medicine & International Health 7 (3): 231 - 239

ZHOU M., LIU Q., WONGSRICHANALAI C., SUWONKERD W., PANART K., PRAJAKWONG S., PENSIRI A., KIMURA M., MATSUOKA H., FERREIRA M. U., ISOMURA S., KAWAMOTO F. (1998): High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. Tropical Medicine & International Health 3 (4): 304 – 312

www-Dokumente

Alle www-Dokumente wurden am 8.9.2013 einer Kontrolle unterzogen.

ADAM D., DOERR H. W., LINK H., LODE H. (2004): Die Infektiologie. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg: 1 – 1486. Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=g3XnhMhq6ggC&pg=PA737&dq=plasmodium+falciparum+schizonten&hl=de&sa=X&ei=hf4RUoCPFYiphAeLkIG4CQ&ved=0CDcQ6AEwAQ#v=onepage&q=plasmodium%20falciparum%20schizonten&f=false>. Abgerufen am: 19.8.2013

BANGLADESCH (2011): Verfügbar auf: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bangladesch>. Abgerufen am 19.8.2011

BANDARBAN - DISTRIKT (2011): Verfügbar auf: [http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_\(Distrikt\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_(Distrikt)). Abgerufen am 19.8.2011

BANKLER H. W. (2001): Innere Medizin. Sonderausgabe. Georg Thieme Verlag. Stuttgart: 1 – 1790. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=5d3Z_GTFjEYC&pg=PA1302&dq=plasmodium+malariae&hl=de&sa=X&ei=uogXUt6nD8aO4AT

slIG4Aw&ved=0CEMQ6AEwAw#v=onepage&q=plasmodium%20malariae&f=false. Abgerufen am: 23.8.2013

CHEESBROUGH M. (2005): District Laboratory Practice in Tropical Countries. Part 1. Second Edition. Cambridge University Press. New York: 1 – 462. Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=TmpUuu8lyAAC&pg=PA240&dq=plasmodium+ovale&hl=de&sa=X&ei=A9IXUoaONbOy7Aby2oHwDw&ved=0CEMQ6AEwAw#v=onepage&q=plasmodium%20ovale&f=false>. Abgerufen am 23.8.2013

DARAI G., HANDERMANN M., SONNTAG H. - G., TIDONA C. A., ZÖLLER L. (2009): Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. 3. Auflage. Springer Medizin Verlag. Heidelberg: 1 – 921. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=Q_pohChXpQ4C&printsec=frontcover&hl=de#v=onepage&q=malaria&f=false. Abgerufen am: 19.8.2013

DIESFELD H. J., FALKENHORST G., RAZUM O., HAMPEL D. (Hrsg.) (2001): Gesundheitsversorgung in Entwicklungsländern: Medizinisches Handeln aus bevölkerungsbezogener Perspektive. 2. Auflage. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg: 1 – 469. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=zE_X64ogQe4C&pg=PA168&dq=asymptomatisch+malaria&hl=de&sa=X&ei=73fST8SfHIX3sgagzIXFDw&redir_esc=y#v=onepage&q=asymptomatisch%20malaria&f=false. Abgerufen am 8.6.2012

EICHENLAUB D., KAROW J., KELLER F., KITTLER R., SCHÄFER J. H. (1984): Algide Malaria eine verkannte, tödliche Erkrankung. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 6: 167 – 173. Verfügbar auf: http://www.landesmuseum.at/pdf_frei_remote/MOGTP_6_0167-0173.pdf. Abgerufen am 9.6.2012

GANTEN D., RUCKPAUL K. (1999): Immunsystem und Infektiologie. Handbuch der Molekularen Medizin. Springer Verlag. Berlin: 1 – 428. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=e1HqIwoDH_oC&printsec=frontcover&hl=de#v=onepage&q&f=false. Abgerufen am: 23.8.2013

GOEBBEL H., WAGNER J., LOHMANN F. W. (1991): Innere Medizin mit Repetitorium. Walter de Gruyter Verlag. Berlin: 1 – 1232: Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=e-hSOB9GiN4C&printsec=frontcover&hl=de#v=onepage&q&f=false>. Abgerufen am: 23.8.2013

GROSS U. (2009): Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 2. Auflage. Thieme Verlag. Stuttgart: 1 – 528. Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=wd-6RfQYS1gC&pg=PA437&dq=plasmodium+malaria&hl=de&sa=X&ei=neAXUu-YHsmg4gTioYHgDg&ved=0CHMQ6AEwCQ#v=onepage&q=plasmodium%20malaria&f=false>. Abgerufen am: 24.8.2013

HEIZMANN W. R., DÖLLER P. C., KROPP S., BLEICH S. (1999): Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie. Vorbereitung auf das 1. Staatsexamen. 2. Auflage. Schattauer Verlag. Stuttgart: 1 – 318. Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=UnMYIphAL9wC&pg=PA152&dq=plasmodium+vivax+verbreitung&hl=de&sa=X&ei=n0wSUTXkKZO1hAeB3oC4Ag&ved=0CDwQ6AEwAA#v=onepage&q=plasmodium%20vivax%20verbreitung&f=false>. Abgerufen am: 19.8.2013

LÖFFLER H., RASTETTER J., HAFERLACH T. (2004): Atlas der klinischen Hämatologie. 6. Auflage. Springer Verlag. Heidelberg: 1 – 432: Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=EowhCDhpMIYC&printsec=frontcover&hl=de#v=onepage&q&f=false>. Abgerufen am: 23.8.2013

MARIB - MALARIA RESEARCH INITIATIVE BANDARBAN (2011): Verfügbar auf: <http://www.marib.org/>. Abgerufen am 5.10.2011

MEHLHORN H. (2012): Die Parasiten des Menschen. Erkrankungen erkennen und vorbeugen. 7. Auflage. Springer Verlag. Berlin: 1 – 324. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=75odDhpNyRoC&pg=PA79&dq=plasmodium+malariae+inkubationszeit&hl=de&sa=X&ei=Y5sXUs_OCI_o4QTAioG4Cg&ved=0CD0Q6AEwAg#v=onepage&q=plasmodium%20malariae%20inkubationszeit&f=false. Abgerufen am: 23.8.2013

ROBERT KOCH INSTITUT (2013): Malaria RKI-Ratgeber für Ärzte. Verfügbar auf: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html#doc2392924bodyText5. Abgerufen am 19.8.2013

ROLLINSON D., HAY S. I., PRICE R., BAIRD J. K. (2013): The Epidemiology of *Plasmodium vivax*: History, Hiatus and Hubris, Part B. Academic Press. San Diego: 1 - 304. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=TPKw3jj1T0oC&printsec=frontcover&hl=de&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. Abgerufen am: 19.8.2013

TH C., SIBINGA S., DODD R. Y. (2002): Transmissible Diseases and Blood Transfusion. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 1 – 218. Verfügbar auf: http://books.google.at/books?id=L_HEbrRAFoQC&pg=PA58&dq=plasmodium+ovale&hl=de&sa=X&ei=s9cXUrSsOI704QSS44HQA&ved=0CEsQ6AEwBA#v=onepage&q=plasmodium%20ovale&f=false. Abgerufen am: 23.8.2013

VASSARSTATS (2013): Verfügbar auf: <http://vassarstats.net/>. Abgerufen am: 01.07.2013

WIEDERMANN-SCHMIDT U., SCHEINER O. (2004): Pathophysiologie von Protozoenerkrankungen. Facultas Verlag. Wien: 1 – 310. Verfügbar auf: <http://books.google.at/books?id=iPaozYSbHOsC&pg=PA70&dq=plasmodium+ovale&hl=de&sa=X&ei=4cgXUoXiBcKG4gSaqoDADA&ved=0CFIQ6AEwBQ#v=onepage&q=plasmodium%20ovale&f=false>. Abgerufen am: 23.8.2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013a): What is a Malaria Rapid Diagnostic Test? Verfügbar auf: http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/whatis/malaria_rdt.html. Abgerufen am: 8.7.2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013b): Country profiles 2012. Verfügbar auf: <http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/en/index.html>. Abgerufen am: 5.8.2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013c): World Malaria Report 2012. Verfügbar auf: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html. Abgerufen am: 5.8.2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011): RDT's - What is malaria. Verfügbar auf: <http://www.wpro.who.int/sites/rdt/whatis/malaria.htm>. Abgerufen am: 5.10.2011

Arbeitsanleitungen

FUEHRER H. P. (2010b): Standard Operating Procedures - DNA Purification of *Plasmodium* sp. from Blood Spots on Filter Paper

FUEHRER H. P. (2010c): Standard Operating Procedures - Nested PCR-Analysis of *Plasmodium* Parasites

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung einer geschlechtsreifen erwachsenen *Anopheles* sp. in Ruheposition (aus DÖNGES, 1988)

Abb. 2: Entwicklungszyklus der Gattung *Plasmodium* (Gamogonie, Sporogonie und Schizogonie) (aus CAMPBELL, 2000)

Abb. 3: HAQUE et. al. untersuchten mittels RDT die Verteilung von *Plasmodium falciparum* in Malaria endemischen Gebieten in Bangladesch. *Plasmodium falciparum* wurde in 11 der 13 untersuchten Bezirken nachgewiesen, das Vorkommen reichte von 0,13 % bis 15,7 % (aus HAQUE et. al., 2009)

Abb. 4: Blutausstriche einer *Plasmodium falciparum* Infektion, Giemsa-Färbung, Originalgröße unter Mikroskop 1.000fache Vergrößerung (aus KANTELE & JOKIRANTA, 2011)

Abb. 5: Hell gefärbt ist die geschätzte Malariaverteilung von *Plasmodium vivax* zu Mitte des 17. Jahrhunderts bis Anfang des 20. Jahrhunderts zu sehen, dunkel gefärbt ist die Situation Ende des 20. Jahrhunderts dargestellt (aus MENDIS et. al., 2001)

Abb. 6: *Plasmodium vivax* wurde von HAQUE et. al. in 10 der 13 endemischen Bezirken Bangladeschs nachgewiesen, *Plasmodium vivax* wurde in 0,13 % bis 1,2 % der Untersuchungen gefunden (aus HAQUE et. al., 2009)

Abb. 7: Durch *Plasmodium malariae* infizierte Erythrozyten eines Patienten, 1.000fache Vergrößerung. A) Trophozoiten, B + E) Trophozoiten mit umgebenden Rosetten, C + D) Schizonten, F) Zwei Trophozoiten die ein Band bilden (aus RAHMAN et. al., 2010)

Abb. 8: Mikroskopische Aufnahme dünner Ausstriche eines mit *Plasmodium malariae* infizierten Patienten, Giemsa Technik, Originalvergrößerung 1.000fach (aus KANTELE & JOKIRANTA, 2011)

Abb. 9: Darstellung von befallenen Erythrozyten mit *Plasmodium ovale* in einem Schimpanse, die infizierten Erythrozyten sind durch ihre längliche Form deutlich zu erkennen (aus COLLINS & JEFFERY, 2005)

Abb. 10: Die Karte zeigt das Verbreitungsgebiet in Südostasien von *Plasmodium knowlesi* Infektionen des Menschen (lokal und Touristen) mit *Plasmodium knowlesi*, die hellgraue Eingrenzung deutet auf die geographische Lage des Vektors *Anopheles leucosphyrus* hin, die dunklen Bereiche zeigen die gefundenen Krankheitsfälle (in Zahlen) (aus COX-SINGH & SINGH, 2008; TANG et. al., 2010)

Abb. 11: Die mikroskopischen Aufnahmen von *Plasmodium knowlesi* wurden von Blutaussstrichen eines finnischen Touristen nach der Heimkehr von der westlichen Halbinsel Malaysias angefertigt, Giemsa-Färbung, Originalvergrößerung 1.000fach (aus KANTELE & JOKIRANTA, 2011)

Abb. 12: Grafische Veranschaulichung des Standortes der Außenstelle MARIB in Bandarban, Bangladesch, auf der linken Karte der Staat Bangladesch zu sehen, auf der rechten der Subbezirk Bandarban Sadar (aus <http://www.marib.org/>)

Abb. 13: Karte zeigt die 13 Malaria endemischen Bezirke in Bangladesch, Einteilung erfolgt in 5 hoch endemische Bezirke im Südosten und in 8 weniger endemische im Nordosten (aus Ahmed et. al., 2009)

Abb. 14: Abbildung eines Agarosegels, Analyse auf *Plasmodium falciparum*. Links außen DNA-Leiter, gefolgt von 17 DNA-Proben, Negativkontrolle und positiver *Plasmodium falciparum* Kontrolle, Banden stellen jeweils eine positive Testung auf *Plasmodium falciparum* dar, leergebliebene Felder sind negativ.

Abb. 15: Gesamtübersicht und prozentuelle Geschlechterverteilung der teilgenommenen Studienteilnehmer (n = 1867)

Abb. 16: Prozentuelle Altersverteilung der Studienteilnehmer, in Zehnerschritten aufgeteilt (n = 1867)

Abb. 17: Allgemeine Auswertung des RDT auf mögliche Malariainfektionen (n = 1867)

Abb. 18: Detaillierte Auflistung der Malariaergebnisse der RDT-Untersuchung im Sommer (n = 1429)

Abb. 19: Detaillierte Auflistung der Malariaergebnisse der RDT-Untersuchung im Winter (n = 438)

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Systematische Ordnung der Malariaerreger (nach DÖNGES, 1988)

Tab. 2: Die 7 Verwaltungseinheiten Bangladeschs (aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Bangladesch>)

Tab. 3: Die 7 Subbezirke (Upazila) des Bezirkes Bandarban (aus [http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_\(Distrikt\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Bandarban_(Distrikt)))

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Primer bei Nested PCR, die jeweils angeführten Primer wurden bei NEST 1 Gattungsspezifisch sowie bei NEST 2 Gattungsspezifisch und Artspezifisch verwendet (basierend auf SNOUNOU & SINGH, 2002; SINGH et. al., 2004; SINGH et. al., 1999; CALDERARO et. al., 2007)

Tab. 5: Grundformel Master Mix für 50 µl (45 µl Master Mix + 5 µl DNA)

Tab. 6: Es wird die verwendete Vorlage der Abläufe für die beiden Thermocycler gezeigt, welche für die Amplifikation der PCR notwendig waren

Tab. 7: Auflistung der Artspezifischen Malaria mit ihren Basenpaaren (bp), nach aufsteigenden Basenpaaren gereiht

Tab. 8: Darstellung einer allgemeinen Vierfeldertafel

Tab. 9: Berechnung des Exakter Fisher-Tests, Vergleich der positiven *Plasmodium falciparum* Proben mit denen von *Plasmodium vivax* für die Regen- und Trockensaison (n = 84)

Tab. 10: Zu sehen sind die aus den Ergebnissen des Exakter Fisher-Tests resultierenden Signifikanzwerte, sowie der Chi²-Test nach Pearson

Tab. 11: Mittels einer Vierfeldertafel wurden die Untersuchungsergebnisse der Regensaison von Mikroskopie und RDT gegenüber gestellt, bei der Untersuchung auf Malaria wurde die Mikroskopie als Gold-Standard angesehen (n = 225)

Tab. 12: Aufgrund der ausgewerteten Vierfeldertafel von Tab. 11 konnte eine Aussage über Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert in der Regensaison getroffen werden

Tab. 13: Mittels einer Vierfeldertafel wurden die Untersuchungsergebnisse bezüglich der auftretenden Malaria in der Trockensaison von Mikroskopie und RDT gegenüber gestellt. Gold-Standard war die Mikroskopie (n = 60)

Tab. 14: Dargestellt sind Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert. Diese Werte beziehen sich auf die Ergebnisse der Vierfeldertafel von Tab. 13

Tab. 15: Vergleich der Untersuchungsmethoden von RDT und PCR die in der Regensaison verwendet wurden, die PCR wurde bei der Untersuchung auf Malaria als Gold-Standard angesehen (n = 225)

Tab. 16: Gegenüberstellung von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert aus den resultierenden Ergebnissen der Regensaison von Tab. 15

Tab. 17: In der Trockensaison wurde mittels RDT und PCR auf Malaria untersucht, Gold-Standard war die PCR (n = 60)

Tab. 18: Es ergaben sich für die Trockensaison für Tab. 17 folgende Werte für Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert

Tab. 19: Gegenüberstellung von PCR und Mikroskopie in der Regensaison. Verwendet wurde eine Vierfeldertafel, die PCR galt als Gold-Standard (n = 222)

Tab. 20: Sensitivität, Spezifität, sowie positiver und negativer Vorhersagewert konnten mittels Formel errechnet werden. Grundlage waren die Ergebnisse aus Tab. 19

Tab. 21: Für die Trockensaison ergaben sich bei Gegenüberstellung der PCR und Mikroskopie folgende Resultate. Als Gold-Standard wurde die PCR angesehen (n = 60)

Tab. 22: Sensitivität, Spezifität, sowie positiver und negativer Vorhersagewert konnten anhand der vorliegenden Vierfeldertafel von Tab. 21 ermittelt werden

Tab. 23: Gegenüberstellung und Vergleich der in der Regensaison gefundenen Malariaarten bei Mikroskopie und PCR (n = 1429)

Tab. 24: Gegenüberstellung und Vergleich der in der Trockensaison gefundenen Malariaarten bei Mikroskopie und PCR (n = 438)

Tab. 25: Mittels PCR wurde ein geografischer Vergleich der einzelnen Subbezirke in der Regensaison durchgeführt (n = 1429)

Tab. 26: Darstellung der Ergebnisse mittels χ^2 -Test nach Pearson. Die Durchführung erfolgte mittels PCR, es werden die gefundenen Malariafälle in der Regensaison und Trockensaison gezeigt

Tab. 27: Darstellung der Mehrfachinfektionen durch Malaria in den einzelnen Subbezirken in der Regensaison und Trockensaison, die Auswertung erfolgte mittels PCR (n = 1867)

Tab. 28: Tabellarische Darstellung von Pf Monoinfektionen, Pv Monoinfektionen, sowie Pf und Pv Mehrfachinfektionen, die Auswertung erfolgte mittels PCR, die Einteilung erfolgte in Zehnerschritte bei der Alterswahl (n = 526)

Tab. 29: Gefundene Mono- und Mehrfachinfektionen bei *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* während der Regensaison und Trockensaison, Untersuchung erfolgte mittels PCR (n = 533)

Tab. 30: Artenspektrum der mit PCR festgestellten Malariaarten während der Regensaison (n_{gesamt} = 440) und Trockensaison (n_{gesamt} = 117)

Datenblatt zur Erfassung asymptomatiser Malariafälle

[illegible]

Datenblatt zur Erfassung asymptomatischer Fälle bei Wiederholungen

[illegible]

10. Lebenslauf



VERENA HABLER

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Geboren:	12.07.1978, in Wien
Nationalität:	Österreich
Familienstand:	ledig

SCHULISCHE UND UNIVERSITÄRE AUSBILDUNGEN

11/2010	Kongressteilnahme in Graz bei Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie (ÖGTP). Postervortrag mit dem Thema „ <i>Molecular confirmation of high prevalence of asymptomatic malaria in Bangladesh</i> “ Gewinnerin des „Student Travel Grant“
02/2010 – 10/2013	Beginn der Diplomarbeit an der Medizinischen Universität, 1090 Wien, Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Exp. Tropenmedizin und Feldforschung, Malaria Research Initiative Bandarban (MARIB), Bangladesch Zu behandelndes Thema: „ <i>Die molekulare Bestätigung der hohen Prävalenz von asymptomatischer Malaria in Bangladesch</i> “
02/2010	„Beginn“ 2. Abschnitt Zoologie, Spezifikation „ <i>Anatomie und Morphologie</i> “, Abschluss 1. Abschnitt Biologie
03/2002	Studentin der Biologie, Universität Wien, 1090 Wien
10/1998 – 02/2002	Studentin der Veterinärmedizin, 1210 Wien
06/1998	Reife- und Diplomprüfungszeugnis
1995 – 1998	AUL d. HAK III d. Wr. Kaufmannschaft, 1080 Wien
06/1995	Jahres- und Abschlusszeugnis
1992 – 1995	HAS I d. Wr. Kaufmannschaft, 1010 Wien
1988 – 1992	private Hauptschule, 1040 Wien
1984 – 1988	private Volksschule, 1180 Wien

TÄTIGKEITEN NEBEN SCHULE/ STUDIUM

-
- 01/2013 – lfd. **Allianz Elementar Versicherungs AG**
Außendienst
- 02/2010 – 10/2013 **Diplomarbeit, Inst. Spez. Prophylaxe und Tropenmedizin, Medizinische Universität, 1090 Wien**
Diplomandin
- Molekularbiologische Methoden
 - DNS-Isolierung und Aufreinigung aus Blutproben (Filterpapier und Whole Blood)
 - Div. PCR-Techniken (direct PCR, nested PCR)
 - Gel-Elektrophorese
 - Eigenständige Planung der Versuchsreihen und Dokumentation
 - Schriftliche Fertigstellung der Diplomarbeit
- 07/2010 – 12/2010 **mit „Forschungsbeihilfe für Diplomanden“ an Med. Uni, 1090 Wien angestellt (40h/Woche)**
Diplomandin (siehe oben)
- 12/2008 – 06/2010 **Wr. Riesenrad, Fotoshop, 1020 Wien**
Geringfügige Beschäftigung
- Inkassotätigkeit
 - Durchführung und Verkauf der Besucherfotos
- 06/2008 – 09/2008 **Firma Impacts, 1030 Wien**
Vollzeit und Teilzeit
- EM, Catering und Seefestspiele Mörbisch
 - Inkassotätigkeit
- 03/2006 – 06/2008 **Landgut Cobenzl, 1190 Wien**
Teilzeit und geringfügige Beschäftigung
- Kinder- und Gruppenbetreuung
 - Planung und Durchführung der Programme
 - Inkassotätigkeit
- 2005 & 2006 **Pfarrheuriger Mayer, 1190 Wien**
- Weinmesse, Verkostung der Weine an Kunden
- 12/2000 – 03/2002 **Obi Bau- und Heimwerkermarkt, 2700 Wr. Neustadt**
Geringfügige Beschäftigung
- Inkassotätigkeit
 - Betreuung der Kunden
 - Ablagetätigkeit der anfallenden Belege
- 2000 – 2001 **Dr.med.vet. Beatrix Leitold, 2601 Sollenau**
Gelegentliche Aushilfe
- Aushilfe als Ordinationsassistentin und während Operationen
- 08/1994 – 01/2006 **Allianz Elementar Versicherungs AG (früher Elementar Vers.), Generaldirektion, 1010 Wien und 2700 Wr. Neustadt**

Anfangs Feriapraxis, später kaufmännische Angestellte

- Persönliche und telefonische Kundenbetreuung in der Filiale
- Schriftverkehr
- Abwicklung von versicherungstechnischen Angelegenheiten (KFZ, Schaden, grüne Karten, Terminvereinbarungen, Mahnungen etc.)

ZUSÄTZLICHE ERWORBENE FÄHIGKEITEN IM STUDIUM

- Im Zuge der Diplomarbeit: molekularbiologische Methoden (DNS-Isolierung und Aufreinigung, diverse PCR-Techniken z.B. direct PCR, nested PCR), Gel-Elektrophorese
- PP: Submikroskopische Anatomie und Präparationstechnik (REM, TEM Erfahrung)
- PP: Spez. Techniken in der Elektronenmikroskopie und Ultrastrukturforschung, Aufgabengebiet: Nachweis von Schwermetallen in Tieren und Pflanzen
- Medizinische Parasitologie – Praktisches Training und Seminar (Med. Uni)

CO-AUTORENSCHAFTEN WÄHREND DES STUDIUMS

- FUEHRER H. P., FALLY M. A., HABLER V. E., STARZENGRUBER P., SWOBODA P., NOEDL H. (2011): Novel nested Direct PCR technique for malaria diagnosis from filter paper samples. *Journal of Clinical Microbiology* 49 (4): 1628 - 1630
- FUEHRER H. P., HABLER V. E., FALLY M. A., HARL J., STARZENGRUBER P., SWOBODA P., BLOESCHL I., KHAN W. A., NOEDL H. (2012): *Plasmodium ovale* in Bangladesh: genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in southern Asia. *International Journal for Parasitology* 42 (7): 693 – 699
- STARZENGRUBER P., FUEHRER H. P., LEY B., THRIEMER K., SWOBODA P., HABLER V. E., JUNG M., KHAN W. A., HAQUE R., NOEDL H. (2013): High prevalence of asymptomatic malaria in southeastern Bangladesh. - In Review

11. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Doz. DDr. Harald Nödl, Frau Univ.-Prof. Dr. Christine Fellner und Herrn Univ.-Prof. Dr. Josef Weisgram bedanken.

Ein ganz großes Danke geht an Dr. Mag. Hans-Peter Führer, einen langjährigen Studienkollegen und Freund. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Mag. Lisa Glenk bedanken. Eine gute Freundin und Studienkollegin. Sie stand vor allem auch in schweren Zeiten immer zur Seite. Danke für dein offenes Ohr!

Während meines Lebens und Studiums sind mir viele Menschen begegnet. Die einen haben einen kleinen Beitrag zu meinem Studium beigetragen, die anderen einen größeren. Einige wurden Freunde. Ich möchte mich bei all diesen Menschen allgemein bedanken, dass sie mich begleitet haben.

Danke an meine Familie und an meine vielen geliebten Tiere, die mich immer wieder inspiriert und Kraft gegeben haben.

Das Beste kommt bekanntlich immer zum Schluss. Ohne meine Eltern Inge und Günther Habler, wäre all dieser Aufwand nicht möglich gewesen. Vielen, vielen Dank, dass ihr all die langen Jahre durchgehalten habt und nicht an mir und mit mir verzweifelt seid. Wir haben es gemeinsam geschafft. Es ist vollbracht! Ihr seid wunderbar!