

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Abteilungsdirektor: Prof. Dr. med. T. Löscher
an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Aufbau und Evaluation eines NANP19-
Circumsporozoitenprotein-Antikörper ELISA Tests
zum Nachweis von *Plasmodium falciparum*
Infektionen bei nichtimmunen Reisenden.**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
Michael Knappik
aus Nürnberg
2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr.med Thomas Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Tomas Jelinek

Dekan: Prof. Dr.med. Dr. hc. Max Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung.....	5
1.1 Definition der Malaria	5
1.2 Epidemiologie.....	5
1.3 Der Vektor	6
1.4 Zyklus der Malariaparasiten	6
1.5 Klinik der Malaria.....	8
1.6 Malaria bei Reisenden	11
1.6.1 Importierte Malaria	11
1.6.2 Reisen in Endemiegebiete.....	14
1.6.3 Malariaphylaxe	15
1.7 Antikörper gegen Circumsporozoiten.....	17
2 Problemstellung und Zielsetzung	19
3 Material und Methodik	22
3.1 Entwicklung eines CS-ELISA Tests.....	22
3.1.1 Material	22
3.1.2 Methodik.....	25
3.2 Evaluation des CS-Antikörper-ELISA-Tests	30
3.3 CS-Antikörper Prävalenz bei Reisenden	31
4 Ergebnisse.....	36
4.1 Entwicklung eines CS-Antikörper-ELISA-Tests	36
4.2 Evaluation des CS-Antikörper-ELISA-Tests	37
4.2.1 Patienten mit Malaria tropica (<i>Plasmodium falciparum</i>).....	37
4.2.2 Patienten mit Malaria tertiana (<i>Plasmodium vivax</i>).....	39
4.2.3 Patienten mit anderen tropenspezifischen Erkrankungen	39
4.2.4 Personen, die sich noch nie in einem Malariagebiet aufgehalten haben	39
4.2.5 Patienten mit hoch positiven Rheumafaktor, die sich noch nie in Malariagebiet aufgehalten haben	40
4.3 CS-Antikörper Prävalenz bei Reisenden	41
4.3.1 Serokonversion	41
4.3.2 Demographische Daten der Serokonverter	42
4.3.3 Reisedaten der Serokonverter	44

5 Diskussion.....	47
5.1 Entwicklung eines CS-Antikörper-ELISA-Tests	47
5.2 Evaluation des CS-Antikörper ELISA-Tests	48
5.3 CS-Antikörper-Prävalenz bei Reisenden	52
5.4 Schlussfolgerung	58
6 Zusammenfassung	62
7 Abkürzungen	65
8 Literatur	66
9 Danksagung.....	72

1 Einleitung

1.1 Definition der Malaria

Die Malaria ist eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion und gilt als die bedeutendste durch Parasiten verursachte Tropenkrankheit. Die humanpathogenen Arten sind *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, Erreger der Malaria tertiana und *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana. Neuerdings zählt auch *Plasmodium knowlesi*, ein Parasit der bei Primaten Malaria verursacht zu den humanpathogenen Spezies (White 2008). Alle Formen werden durch weibliche Stechmücken der Gattung Anopheles übertragen. Die weltweit meisten Infektionen und die schwersten klinischen Verläufen werden durch *Plasmodium falciparum* verursacht.

1.2 Epidemiologie

Nach Angaben der WHO leben rund 40% der Weltbevölkerung – das sind mehr als 2,4 Milliarden Menschen - in Malariagebieten. Die weltweite Inzidenz wurde von der WHO für das Jahr 2008 auf 190 -311 Millionen Fälle geschätzt, die der Todesfälle auf 700.000 -1,03 Millionen (WHO 2009). Anderen Daten zu Folge ist die tatsächliche Malaria Inzidenz jedoch noch deutlich höher und liegt bei 300 - 500 Millionen Infektionen pro Jahr (Snow, Guerra et al. 2005). Die Malaria ist in 101 Ländern endemisch, in 92 Ländern kommt *Plasmodium falciparum* vor. Am stärksten betroffen ist das tropische Afrika wo schätzungsweise 90% aller Malariaerkrankungen und die große Mehrheit der tödlichen Verläufe auftreten. Weitere Betroffene Regionen sind Südostasien, der indische Subkontinent, Teile von Süd- und Mittelamerika sowie Gebiete im Südpazifik (Greenwood and Mutabingwa 2002).

1.3 Der Vektor

Mücken der Gattung *Anopheles* gehören zur Familie der Culicidae, die weltweit mehr als 3000 Stechmückenarten umfasst. Es sind etwa 400 Arten der Gattung *Anopheles* bekannt, wovon jedoch nur ca. 80 in der Lage sind die Malaria auf den Menschen zu übertragen. *Anopheles gambiae* stellt dabei den effektivsten Malariavektor dar. Die *Anopheles*-Mücke braucht als Brutplatz eine feuchtwarmer Umgebung (mindestens 16° C Durchschnittstemperatur) in der Regel unterhalb von 2000 m. Wie die meisten anderen Arten stechen die *Anopheles*-Weibchen bevorzugt in der Dämmerung oder nachts (Löscher 2010).

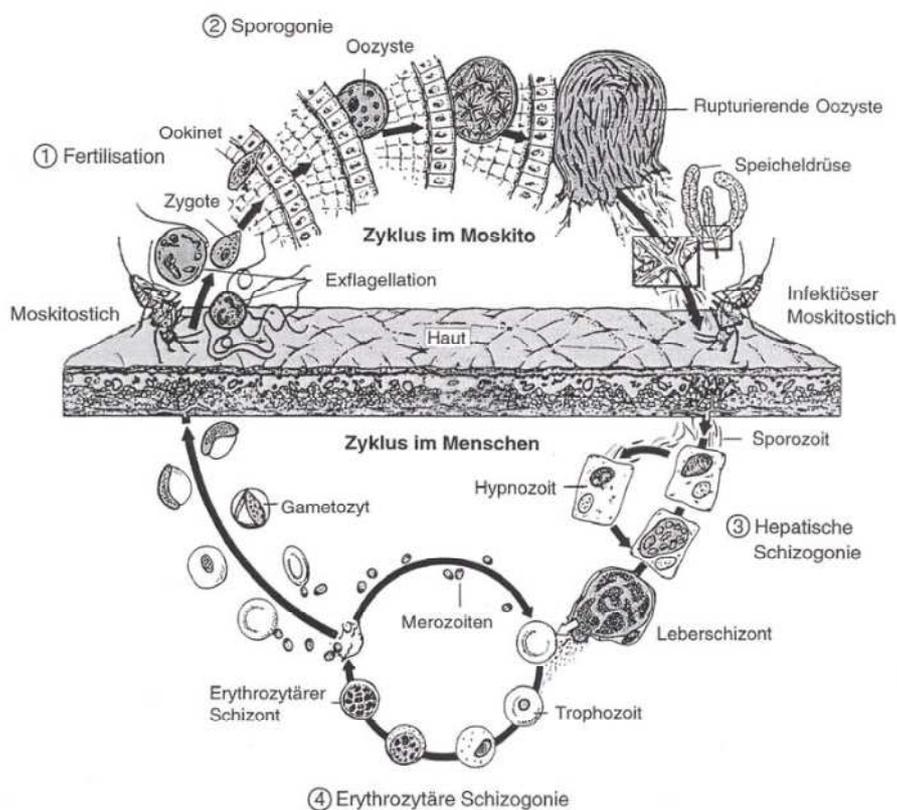
1.4 Zyklus der Malariaparasiten

Der Lebenszyklus von Plasmodien unterteilt sich in einen sexuellen Zyklus in der *Anopheles*-Mücke (Sporogonie) und einen asexuellen Zyklus im Menschen (Schizogonie). Aus parasitologischer Sicht, ist die *Anopheles*-Mücke der Hauptwirt, da hier die geschlechtliche Vermehrung stattfindet. Mikrogametozyten (männlich) und Makrogametozyten (weiblich) werden bei der Blutmahlzeit der Überträgermücke aufgenommen und bilden Gameten (Gamogonie). Dabei werden im Magen der Mücke die Makrogametozyten aus den Erythrozyten freigesetzt und formen sich zu Makrogameten um. Die Mikrogametozyten teilen sich und reifen zu Mikrogameten heran. Die männlichen Mikrogameten befruchten nun die weiblichen Makrogameten und formen eine Zygote. Diese wandelt sich in 18 -24 Stunden in eine bewegliche Ookinete, welche die Magen- bzw. Darmwand durchdringt, sich einkapselt und damit zur Oozyste wird. Aus ihr entstehen in 1 -2 Wochen mehr als 10.000 Sporozoiten, die in die Speicheldrüse der *Anopheles*-Mücke wandern. Beim Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke, werden diese während der Blutmahlzeit mit dem Speichel in die subkutanen Kapillaren des Menschen injiziert. Normalerweise sind es nur etwa 10, manchmal aber auch bis zu 100 Sporozoiten die übertragen werden. Sie dringen bereits 15 -60 Minuten nach dem Stich, durch gefensterte Membranen der Leberendothelzelle in den Disse'schen Raum ein und binden an die Rezeptoren der Leberzellen. Ein Großteil der

Sporozoiten-Antigene wird dabei mit in die Hepatozyten eingeschleust. In den befallenen Hepatozyten kommt es zur so genannten prä- oder exoerythrozytären Schizogonie. Aus den Sporozoiten bilden sich durch Zellteilung 30.000 -50.000 Merozoiten. Bei *Plasmodium falciparum* dauert die Reifung zum Leberschizonten in der Regel 5 -15 Tage.

Abbildung 1: Der Zyklus des Malariaparasiten (Knobloch J. 1996, Tropen- und Reisemedizin)

Entwicklungszyklus von Plasmodium



Bei Infektionen mit *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* können sich Sporozoiten auch in Hypnozoiten umwandeln, die über Monate und Jahre ruhen und dann aufgrund eines unbekanntes Auslösers zu Rückfällen führen können. Am Ende der exoerythrozytären Schizogonie werden die Merozoiten aus der befallenen Leberzelle freigesetzt und befallen aktiv, innerhalb von wenigen Sekunden Erythrozyten, womit die erythrozytäre Schizogonie beginnt. Die

intraerythrozytäre Wachstumsform wird Trophozoit genannt, und ist aufgrund ihres lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes auch als Ringform bekannt. Aus einem Trophozoiten entsteht bei *Plasmodium falciparum* nach etwa 48h ein mehrkerniger Schizont. Nach Zerstörung des Erythrozyten werden (bei *Plasmodium falciparum*) 8 -32 Merozoiten freigesetzt, welche erneut Erythrozyten befallen können. Während *Plasmodium vivax* vor allem jüngere Erythrozyten befällt, kann *Plasmodium falciparum* alle reifen Erythrozyten befallen, weshalb es bei Malaria tropica zu deutlich höheren Parasitämien kommt. Auch der Mehrfachbefall von Erythrozyten wird nur bei *Plasmodium falciparum* beobachtet. Nach mehreren Zyklen durchlaufen nicht alle Parasiten die asexuelle Vermehrung, sondern differenzieren zu männlichen Mikrogametozyten und weiblichen Makrogametozyten. Bei *Plasmodium falciparum* beträgt hierfür die Dauer ungefähr 10 Tage. Werden diese dann durch eine weibliche Anopheles-Mücke aufgenommen, so schließt sich der Kreislauf wieder (Knobloch 2003).

1.5 Klinik der Malaria

In der Regel treten schwere Verläufe mit Beteiligung unterschiedlicher Organsysteme und Todesfälle nur bei der Malaria tropica auf. Die klinischen Symptome der Malaria werden durch die Vermehrung der asexuellen erythrozytären Schizonten, durch deren Zerstörung und durch die Freisetzung von pyrogenen Stoffen hervorgerufen (Barnwell 1998). Der klinische Verlauf hängt stark von der schon vorhandenen Immunität der erkrankten Person ab. Den höchsten Immunitätsgrad besitzen Erwachsene, die in einem hyper- bis holoendemischen Malariagebiet aufgewachsen sind. Eine vollständige (sterile) Immunität wird nicht erreicht, sondern nur Teil- bzw. Semiimmunität. Der Krankheitsverlauf ist bei Nichtimmunen, wie z.B. europäischen Reisenden, ohne rechtzeitige antiparasitäre Therapie schwer. Die Malaria tropica verläuft nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 7 -14 Tagen initial meist uncharakteristisch. Dabei ist die Inkubationszeit abhängig von Immunstatus, Chemoprophylaxe und subtherapeutischer Chemotherapie. Besonders unter dem Einfluss einer Chemoprophylaxe kann die Inkubationszeit verlängert sein und Wochen bis Monate betragen. Die Erkrankung beginnt

häufig mit grippeähnlichen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen, allgemeinem Unwohlsein sowie anfangs subfebrilen Temperaturen. Die Patienten entwickeln im weiteren Verlauf Fieber und Schüttelfrost, wobei eine Periodizität bei Malaria tropica, insbesondere zu Beginn der Erkrankung, eher die Ausnahme darstellt. Bei der semiimmunen Bevölkerung in hochendemischen Gebieten verläuft die Malaria tropica häufig subfebril oder sogar afebril. Es treten auch weniger charakteristische Symptome wie z.B. Übelkeit, Diarrhö oder trockner Husten auf. Bei der körperlichen Untersuchung besteht bei längerem Verlauf oft eine Spleno-, seltener eine Hepatomegalie, zum Teil ein Ikterus. Hohes Fieber ist meist von Tachykardie und Tachypnoe begleitet. Im Blutbild kann es zu einer normozytären normochromen Anämie kommen. Eine der Hauptursachen der Anämie ist die Hämolyse durch rupturierende, infizierte Erythrozyten. Deswegen ist ein hoher Parasitenbefall in der Regel mit einer schweren Anämie assoziiert. Allgemeine Hämolysezeichen, wie Erhöhung der Laktatdehydrogenase und Verminderung des Haptoglobins im Serum, sind regelmäßig nachweisbar. Es kann sowohl Leukopenie als auch Leukozytose auftreten, des Weiteren ist eine Thrombozytopenie charakteristisch. In der klinischen Chemie sind häufig eine Hyperbilirubinämie, eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins und eine leichte Transaminasenerhöhung auffällig. Der Blutzuckerspiegel ist in der Regel erniedrigt. Bei der Malaria tropica kann es, im Gegensatz zu den anderen Malariaformen, unbehandelt zu sehr hohen Parasitämien kommen. Neben der Parasitendichte führen vor allem Zythoadhärenzphänomene wie Sequestration und Rosettenbildung (Scholander, Treutiger et al. 1996) (Wahlgren, Fernandez et al. 1994) zur Ausbildung einer schweren Malaria. Es kommt zur Anheftung parasitierter Erythrozyten, die sich mittels Rezeptoren tragender Vorstülpungen der Membran, den sog. Knobs, an die Endothelzellen der postkapillaren Venolen von inneren Organen, wie z.B. Herz, Plazenta, Niere und Gehirn, anlagern (Aikawa, Iseki et al. 1990).

Kriterien einer schweren und komplizierten Malaria sind (WHO 2000):

- zerebraler Krampfanfälle

- Bewusstseinsintrübung
- schwere normozytäre Anämie (Hämoglobin < 8 g/dl)
- Niereninsuffizienz (Kreatinin >3 mg/dl und/oder Urin-Ausscheidung < 400 ml/ 24h)
- respiratorische Insuffizienz
- schwere Hypoglykämie (BZ < 40 mg/dl)
- Kreislaufschock
- disseminierte intravasale Gerinnung
- schwere metabolische Azidose (pH arteriell < 7,25)
- Makrohämaturie
- Transaminasenwerterhöhung auf über das Dreifache
- Ikterus, Bilirubin > 3 mg
- Hyperparasitämie (> 5 % der Erythrozyten von Plasmodien befallen oder > 100.000 Plasmodien/µl Blut)

Die zerebrale Malaria stellt die schwerste Verlaufsform der Malaria tropica dar. Auch bei rasch einsetzender intensiver Therapie verläuft ein großer Teil der Fälle tödlich. Sie verursacht ca. 80% der malariabedingten Todesfälle. Störungen des Bewusstseins bis hin zum Koma sind charakteristisch.

Eine weitere Komplikation ist das akute Nierenversagen, das in der Hälfte der Fälle bis zur Dialysepflichtigkeit führt. Im Herzen, in der Lunge, in den Nieren, im Gastrointestinaltrakt, im Gehirn, in der Plazenta und an anderen Organen können Veränderungen durch Störung der oben beschriebenen Mikrozirkulation auftreten. Man findet durch infizierte Erythrozyten partiell verstopfte Kapillaren, Hämorrhagien als Folge von Gefäßwandschädigungen, sowie durch entzündliche Prozesse Nekroseherde an obturierten Gefäßen. Die Prognose der schweren Malaria tropica hängt vorwiegend vom Ausmaß der Organkomplikationen ab. (Löscher 2010; Warell 2002)

1.6 Malaria bei Reisenden

1.6.1 Importierte Malaria

In den letzten Jahren wurden dem Robert Koch-Institut jährlich, mit abnehmender Tendenz, durchschnittlich etwa 600 Fälle von importierter Malaria gemeldet. Im Jahr 2009 wurden 523 Fälle gemeldet, die Zahl lag damit auf dem Niveau der beiden Jahre davor. Das Infektionsland wurde für 341 Fälle angegeben. Der weitaus größte Teil (92%) der Malariaerkrankungen wurden- wie auch in den Vorjahren aus afrikanischen Ländern importiert.

Tabelle 1: Ursprungsregionen der 2009 nach Deutschland importierten Malaria-Fälle (RKI, Epidemiologisches Bulletin 38/2010)

Kontinent	Anzahl	Anteil
Afrika	313	92%
Asien	20	6%
Amerika	6	2%
Australien/Ozeanien	2	1%
Europa	0	0%
Summe	341	100%

Besonders viele Malariaerkrankungen traten bei Reisen in westafrikanische Länder auf (Tab. 2).

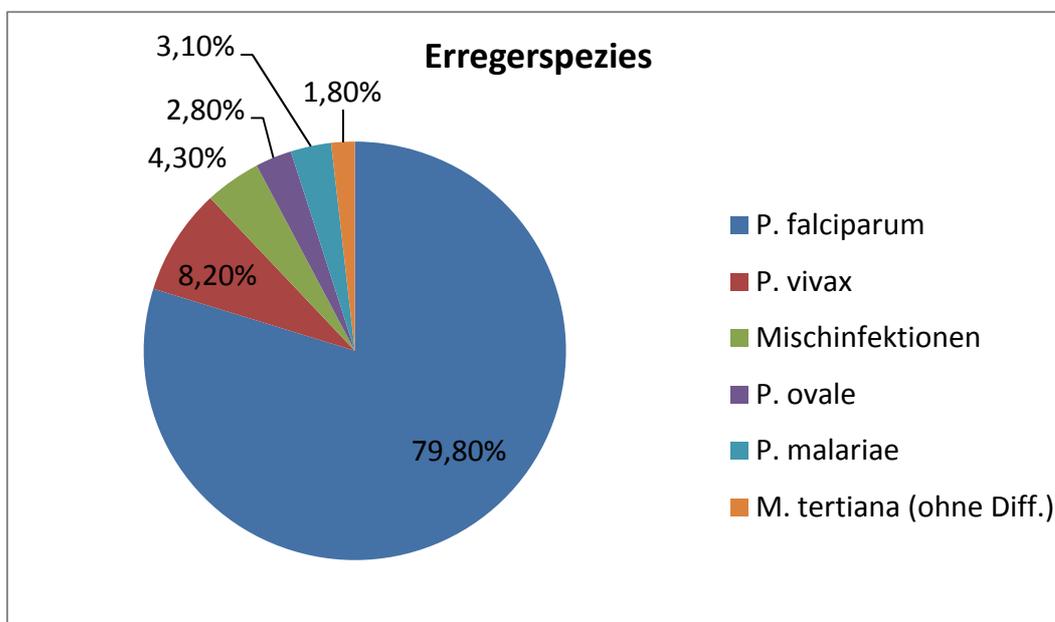
Tabelle 2: Ursprungsländer der 2009 nach Deutschland importierten Malaria-Fälle (RKI, Epidemiologisches Bulletin 38/2010)

Infektionsland	Nennung	Anteil
Ghana	72	21%
Nigeria	58	17%
Kamerun	27	8%
Westafrika ohne Länder- zuordnung	27	8%
Togo	26	8%
Elfenbeinküste	13	4%
Benin	9	3%
Uganda	8	2%
Kongo	7	2%
Kenia	6	2%
Mosambik	6	2%
Indien	6	2%
Andere	76	22%
Summe	402	100%

Erwachsene im Alter zwischen 25 und 39 Jahren wiesen die höchsten Inzidenzen auf. Insgesamt erkrankten wesentlich mehr Männer an Malaria als Frauen. In einigen Altersgruppen erkrankten sogar mehr als doppelt so viele Männer wie Frauen. Diese Unterschiede sind vermutlich auf das unterschiedliche Reise- bzw. Präventionsverhalten zurückzuführen.

Der Anteil der Patienten deutscher Herkunft betrug im Jahr 2009 bei den an Malaria tropica Erkrankten 33%. Wie in den Vorjahren auch waren vor allem ausländische Bürger, wie Immigranten oder ausländische Touristen in Deutschland betroffen. Bei 510 Erkrankten wurde die Meldung unter Angabe der Plasmodienspezies gemacht. Bei den mit Abstand meisten Erkrankungen handelte es sich um eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* (Siehe Abbildung 2)(RKI 2010).

Abbildung 2: 2009 in Deutschland gemeldete Malaria-Erkrankungen nach Erregerspezies (RKI, Epidemiologisches Bulletin 38/2010)



1.6.2 Reisen in Endemiegebiete

Reisen in tropische Länder nehmen an Beliebtheit immer weiter zu. Nach Angaben der World Tourism Organisation (WTO) verzeichnete die Region Afrika 2005 einen Zuwachs von 10% bei internationalen Ankünften. Insbesondere Afrika südlich der Sahara (+13%) verzeichnet dabei einen überdurchschnittlichen Besucherzuwachs, in einigen Ländern wie z.B. Kenia (+26%) fiel der Anstieg noch größer aus. Nach Prognosen der WTO ist für die Region Afrika auch in den nächsten Jahren mit einem überdurchschnittlichen Wachstum zu rechnen (Tabelle 3) (United Nations World Tourism Organization 2007). Reisende setzten sich dabei vielen tropenspezifischen Krankheitsrisiken aus, insbesondere mückenübertragene Infektionskrankheiten nehmen dabei eine herausragende Stellung ein.

Tabelle 3: Anzahl und Prognosen internationaler Reisen (modifiziert nach World Tourism Organization 2007)

Jahr	INTERNATIONALE REISENDE (MILLIONEN)			MARKTANTEIL (%)		DURCHSCHNITTL. JÄHRL. WACHSTUMSRATE (%)
	1995	2010	2020*	1995	2020*	1995 -2020
Afrika	20	49	77	3,6	5,0	5,5
Amerika	110	151	282	19,3	18,1	3,8
Ostasien / Pazifik	81	193	397	14,4	25,4	6,5
Europa	336	472	717	59,8	45,9	3,1
Mittlerer Osten	14	60	69	2,2	4,4	6,7
Süd Asien	4	11	19	0,7	1,2	6,2
Welt	565	935	1561	100	100	4,1

* Prognose WTO

1.6.3 Malariaphylaxe

Die komplexe Situation der Malariaübertragung in verschiedenen endemischen Gebieten erfordert differenzierte Empfehlungen zum Schutz vor der Malaria. International variieren die Empfehlungen hinsichtlich Malariaphylaxe. In Deutschland werden Empfehlungen für Reisende bezüglich Malariavorbeugung von der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) ausgesprochen. Diese Empfehlungen stützen sich auf Daten der Malaria-Prävalenz im Reiseland, dem Anteil von Malaria tropica an allen Malariaerkrankungen, der Inzidenz bei Reisenden in den vergangenen Jahren und der Resistenzlage im Reiseland (Abbildung 3) (DTG 2010).

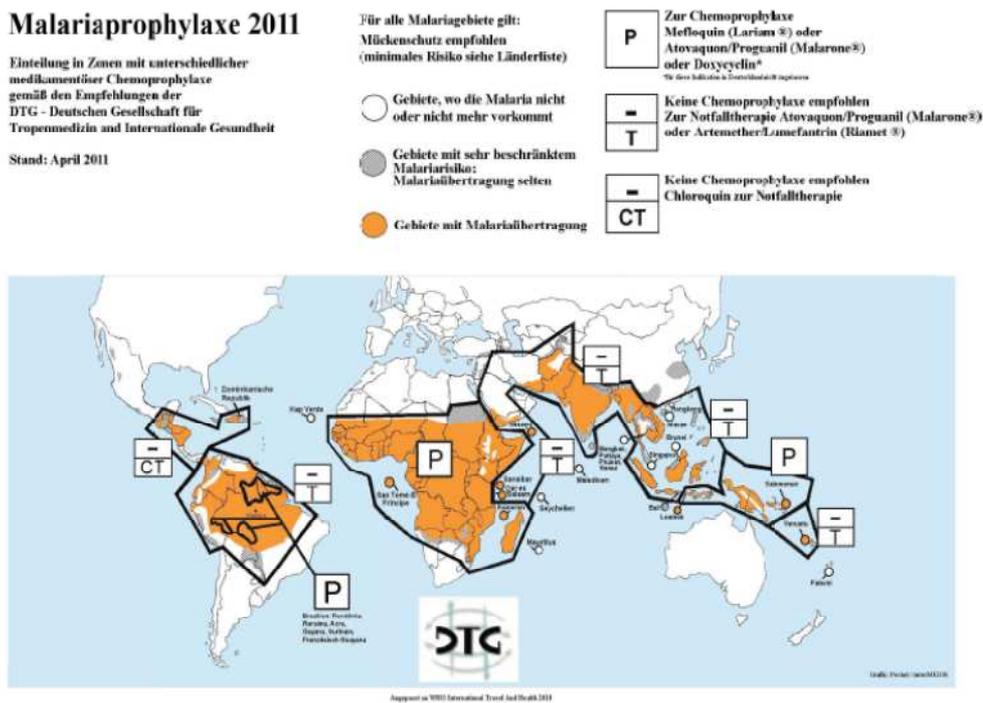


Abbildung 3: DTG:Empfehlungen zur Malariavorbeugung. (2011)

Der Malariaschutz besteht aus mehreren Komponenten:

Einerseits kann das Malariarisiko, mit einer konsequenten Expositionsprophylaxe, also dem Schutz vor dem Stich der Anophelesmücke, verringert werden. Der Schutz mittels physikalischer und chemischer Maßnahmen vor den Überträgermücken ist nahezu risikofrei. Er hat heute in Anbetracht medikamentöser Resistenzen und Nebenwirkungen einen hohen Stellenwert. Hierbei handelt es sich um einen echten Infektionsschutz, da der Erreger nicht in den Organismus gelangt.

Andererseits stehen Medikamente für eine Chemoprophylaxe in Hochrisikogebieten zur Verfügung. Mit diesen Substanzen kann bei regelmäßiger Einnahme eine Blutkonzentration erzielt werden, die den Ausbruch der Krankheit nach erfolgter Infektion unterdrückt.

Darüber hinaus steht mit der Notfallmedikation eine weitere Maßnahme gegen die Malaria zur Verfügung. Sie wird in Gebieten mit mittlerem oder geringem Malariarisiko eingesetzt, wenn bei Fieber innerhalb von 24 Stunden kein Arzt erreichbar ist. Diese Strategie wird empfohlen, wenn das Infektionsrisiko kleiner ist als das Risiko schwerer Medikamentennebenwirkungen. Das Risiko für schwerwiegende Mefloquin-Nebenwirkungen, die zu einer Hospitalisierung führen wird auf zwischen 1/6.000 (Croft and World 1996) und 1/20.000 (Macpherson D 1997) geschätzt.

1.7 Antikörper gegen Sporozoiten

Kommt es nach einem Stich der weiblichen Anophelesmücke zu einer Infektion mit Sporozoiten von *Plasmodium falciparum*, so befinden sich diese nur ca. 15-60 Minuten im Blutkreislauf, bevor sie in die Leberparenchymzellen eindringen (Sinden 2002). Trotz der relativ kurzen Verweildauer im Blutkreislauf lösen Sporozoiten eine Immunantwort aus, die spezies- und stadienspezifisch ist (Nardin, Nussenzweig et al. 1979; Cochrane 1980; Zavala, Gwadz et al. 1982). Im Vordergrund dieser Immunantwort steht die Bildung von Antikörpern gegen das immundominante Oberflächenprotein der Sporozoiten, das Circumsporozoitenprotein (CSP). Es bedeckt die komplette Oberfläche der Sporozoiten und wird in großen Mengen, während der gleitenden Bewegung des Sporozoiten, sezerniert. Es wurde auch auf der Plasmamembran von Merozoiten und im Zytoplasma von infizierten Hepatozyten nachgewiesen (Garcia, Puentes et al. 2006).

CSP besteht neben verschiedenen variablen Regionen aus einem repetitiven Tandem der Aminosäuren Asparagin-Alanin-Asparagin-Prolin (NANP) (Zavala, Tam et al. 1985) (Nussenzweig and Nussenzweig 1985). Diese Protein-Sequenz ist spezifisch für jede Plasmodien-Spezies und hochgradig konserviert für Isolate der gleichen Spezies (Zavala, Masuda et al. 1985). Sie lässt sich konstant auch bei sonst genetisch variablen Isolaten aus unterschiedlichen geographischen Regionen nachweisen. Das CSP von *Plasmodium falciparum* enthält 37 repetitive NANP-Tandems (Dame, Williams et al. 1984).

Diese repetitive CSP-Sequenz wurde sowohl gentechnisch (Young, Hockmeyer et al. 1985) als auch peptidchemisch synthetisiert (Ballou, Rothbard et al. 1985; Zavala, Tam et al. 1985) und in immunologischen Testverfahren wie IFA (immunofluorescence assay) und ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis von CSP-Antikörpern eingesetzt (Del Giudice, Biro et al. 1986; Esposito, Lombardi et al. 1986). NANP-Peptide von unterschiedlicher Länge wurden in ELISA-Tests und in kommerziellen ELISA-Kits verwendet (z.B. NANP 3, NANP 40, NANP 50) (Zavala, Tam et al. 1986; Campbell, Brandling-Bennett et al. 1987; Esposito, Fabrizi et al. 1990)

In diversen Studien, sowohl bei der einheimischen Bevölkerung in endemischen Gebieten (Hoffman, Wistar et al. 1986; Del Giudice, Engers et al. 1987; Snow, Shenton et al. 1989; Del Giudice, Lambert et al. 1990; Mendis, Del Giudice et al. 1992) als auch bei nicht-immunen Reisenden (Webster, Boudreau et al. 1987; Jelinek, Löscher et al. 1996; Bwire, Slooman et al. 1998; Cobelens, Verhave et al. 1998; Jelinek, Bluml et al. 1998), konnte gezeigt werden, dass gegen dieses NANP-Peptide des CSP gerichtete Antikörper zuverlässige serologische Marker zum Nachweis einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* sind.

Der Vorteil, im Vergleich zu anderen serologischen Nachweisverfahren einer Plasmodien-Infektion ist, dass sich CSP-Antikörper auch dann entwickeln, wenn es nicht zu einer klinisch manifesten Malariaerkrankung kommt. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn ein Reisender unter Chemoprophylaxe durch den Stich eines Vektors infiziert wird, die Schizogonie aber aufgrund der Medikamentenwirkung verhindert bzw. supprimiert wird. CSP-Antikörper ELISA's werden daher in epidemiologischen Studien verwendet, um die Intensität der Malariaübertragung, unabhängig von klinischen Erkrankungen abzuschätzen (Druihe, Pradier et al. 1986).

Gegen CSP gerichtete Antikörper können das Eindringen von Sporozoiten in die Leberzellen verhindern. Allerdings erwiesen sich auf der repetitiven NANP-Sequenz des CSP beruhende Impfstoffe nicht als effektiv (Nussenzweig 1985). Die einzige bisher in Feldversuchen wirksame Malaria-Vakzine basiert auf einem Cocktail verschiedener T-Zellepitope des CSP, die in Hefezellen mit dem Hepatitis B Oberflächenprotein ko-exprimiert und mit einem potenten T-Zell-Adjuvant (AS01 oder AS02) appliziert werden (Bejon, Lusingu et al. 2008).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Malaria ist auch heute noch weltweit die bedeutendste parasitologische Erkrankung. Reisen in tropische Länder werden immer beliebter und so setzen sich jedes Jahr mehr und mehr nicht-immune Reisende einem Malariainfektionsrisiko aus, wodurch die reisemedizinische Beratung bezüglich Expositionsprophylaxe und Malariachemoprophylaxe auch zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein Großteil der Daten hinsichtlich des Infektionsrisikos wird aufgrund von Meldedaten zu Malariaerkrankungen der einheimischen Bevölkerung in Endemiegebieten oder durch Daten zur importierten Malaria gewonnen. Das Risiko für deutsche Urlaubsreisende sich sowohl mit *Plasmodium falciparum* zu infizieren, als auch an Malaria tropica zu erkranken unterscheidet sich jedoch aufgrund von mehreren Faktoren sowohl von der einheimischen Bevölkerung als auch von der Mehrzahl der Patienten, die in Deutschland an Malaria erkranken.

Im Vergleich zur einheimischen Bevölkerung in Malariagebieten verfügen Urlaubsreisende normalerweise nicht über eine erworbene Semiimmunität. Daher führen Infektionen bei Reisenden ohne Malariachemoprophylaxe in der Regel zu einer manifesten klinischen Erkrankung, während sie beim Semiimmunen zum Teil subklinisch verläuft.

Das Infektionsrisiko ist bei Touristen durch Expositionsprophylaxe wie z.B. Repellentien, imprägnierten Moskitonetzen/Kleidungsstücken, dem Schlafen in klimatisierten Räumen etc. im Vergleich zur einheimischen Bevölkerung reduziert. An vielen tropischen Reisezielen herrscht auch gerade während der Trockenzeit die touristische Hochsaison, also zu einer Jahreszeit wo normalerweise ein geringeres Transmissionsrisiko besteht.

Das in Deutschland an Malaria erkrankte Patientenkollektiv unterscheidet sich hinsichtlich Immunstatus, Reisebedingungen und protektiven Maßnahmen auch in den meisten Fällen vom durchschnittlichen Urlauber. So treten deutlich mehr als die Hälfte der in Deutschland gemeldeten Malaria-Erkrankungen bei ausländischen Patienten, wie Immigranten oder ausländischen Touristen auf, deren Infektionsrisiko sich aufgrund der bereits genannten Faktoren abweicht.

Daher sind Rückschlüsse von Melderegistern der importierten Malaria auf das tatsächliche Infektionsrisiko bei deutschen Reisenden nur begrenzt aussagefähig. Um das tatsächliche Infektionsrisiko für Reisende in Malariagebiete zu bestimmen, wurden ELISA-Tests zum Nachweis von CSP-Antikörper entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass CSP-Antikörper-Titer eng mit entomologischen Infektionsraten in endemischen Gebieten korrelieren (Esposito, Lombardi et al. 1988). Der Nachweis von CSP-Antikörpern bietet sich somit als Marker an, um das tatsächliche Infektionsrisiko für Reisende in Malariaregionen abzuschätzen.

Die meisten in Studien bisher eingesetzten CS-Protein-ELISA-Tests verwendeten Antigene mit einer hohen Zahl an repetitiven Aminosäure-Tandems (NANP40-NANP50). Diese aus 160 bzw. 200 Aminosäurepaaren bestehenden, relativ großen Proteine sind in der synthetischen Herstellung sehr aufwändig und daher auch kostenintensiv.

Die Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. änderte im Jahr 2001 erstmals die Empfehlungen für die Malariaphylaxe grundlegend. Während zuvor eine regelmäßige Chemoprophylaxe für alle Gebiete mit Malariatransmission empfohlen wurde, wurde die Chemoprophylaxe ab 2001 nur noch für Gebiete mit hohem Maliarisiko empfohlen. Für die übrigen Regionen mit niedrigem Risiko wurde eine notfallmäßige Selbstbehandlung propagandiert.

Eine Zielsetzung dieser Dissertation war es daher einen Test zu entwickeln, mit dessen Hilfe man das tatsächliche Maliarisiko für nichtimmune Reisende bestimmen konnte.

- Der erste Teil dieser Dissertation bestand in dem Aufbau eines CSP-AK-ELISA-Tests. Hierzu wurden drei CSP-Antigene mit unterschiedlich langen Aminosäuren-Peptiden (NANP5, NANP19 und NANP50) verwendet und hinsichtlich Extinktionsintensität bei unterschiedlichen Beschichtungskonzentrationen verglichen.
- Im zweiten Arbeitsschritt wurde der so erstellte NANP19-CSP-AK-ELISA im Bezug auf Sensitivität, Spezifität und möglichen Kreuzreaktionen evaluiert.
- Im dritten Teil dieser Dissertation wurde die Prävalenz von CSP-Antikörpern bei 1.903 Reisenden, vor und nach einem Aufenthalt in Malaria-Endemiegebieten untersucht und das Infektionsrisiko für *Plasmodium falciparum* hinsichtlich demographischer Faktoren, Reisedauer und Reise-land ausgewertet.

3 Material und Methodik

3.1 Entwicklung eines CSP-ELISA Tests

3.1.1 Material

3.1.1.1 Antigen

Antigene:

- NANP5: MRGSHHHHHHGS-(NANP)5RSM* (M*=Homoserin)
(synthetisiert von MWG-Biotech, Ebersberg)
- NANP19: MRGSHHHHHHGS-(NANP)19RSM* (M*=Homoserin)
(synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Hoffmann la Roche, Schweiz)
- NANP50: MRGSHHHHHHGS-(NANP)50RSM* (M*=Homoserin)
(synthetisiert von Hoffmann la Roche, Schweiz, zur Verfügung gestellt vom
Tropeninstitut Basel)

3.1.1.2 Materialien und Chemikalien

Folgende Materialien und Geräte wurden verwendet:

- ELISA Platten mit je 96 kobaltbestrahlten Vertiefungen
(Firma Dynatech microtiter plates / Immulon II flat bottom plates)
- Spektrophotometer Spectra Rainbow ELISA-Platten Reader
(Firma Tecan)
- Software 7.17 Firma Tecan
- Handwaschgerät für ELISA-Platten

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Der Phosphatpuffer (PBS; phosphate buffered saline) pH 7,2 als Bestandteil verschiedener im Test verwendeter Lösungen in folgender Zusammensetzung:

- Natriumchlorid (NaCl) 72,0 g
(Fa. Merck 1.06404.1000)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) 14,8 g
(Fa. Merck 1.0686.500)
- Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) 4,3 g
(Fa. Merck 1.04873.1000)
- aufgefüllt mit Aqua dest. 10 Liter

Die Waschlösung (pH 7,2) bestehend aus:

- Polyoxyethylensorbitanmonolaurat Tween 20 1 ml
(Fa. Merck-Schuchardt Art. No. 8822184)
- PBS-Puffer 10 Liter

Der Post-Coating-Puffer bestehend aus:

- PBS
- 5% Milchpulver

Der Inkubationspuffer bestehend aus:

- PBS
- 0,5% Milchpulver

Die Konjugatlösung wird hergestellt aus:

- Goat Anti-human IgG (H+L) Horse-Reddish-Peroxidase Conjugated 5 µl
(Firma ICN Biomedicals, Inc.) (Antikörperkonzentration: 2,9 mg/ml)
- Inkubationspuffer 80 ml

Dies entspricht einer 1:16.000 Verdünnungsstufe.

Die Gebrauchs-Substratlösung (pH 5,0) wird hergestellt aus:

1 Liter Substrat-Stammlösung I bestehend aus:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 46,0 g
(Fa. Merck 6346)
- Aqua dest.: 5 Liter

10 ml Substrat-Stammlösung II bestehend aus:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 18,9 g
(Fa. Merck 1.0686.500)
- Aqua dest 5 Liter

Eine Tablette (10 mg) O-Phenylendlamin (Firma Sigma P-8287) wird zur Herstellung der verwendeten Substratlösung in 60 ml Gebrauchs-Substratlösung aufgelöst.

Als Stopplösung wurde eine 8 mol (entspricht 46%) Schwefelsäure verwendet (Firma Merck 1.9072 1000).

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Auswahl des Antigens und der Beschichtungskonzentration

Die drei Antigene NANP5, NANP19 und NANP50 wurden hinsichtlich ihrer Antigenität und Extinktionsintensität im ELISA verglichen. Mittels Verdünnungsreihen wurde die optimale Beschichtungskonzentration ermittelt. Hierzu wurden ELISA-Platten mit den drei unterschiedlichen Antigenen beschichtet. Für jedes Antigen wurden drei Beschichtungskonzentrationen (2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml) getestet. Es wurde für jedes Antigen und für jede Beschichtungskonzentration eine Standardkurve mit den Verdünnungsstufen der Serumproben Faktor 100, Faktor 33, Faktor 10 und Faktor 1 erstellt (siehe 3.1.2.8) und der ELISA mittels des unten beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Um den Einfluss versuchsspezifischer Varianz zu minimieren, wurde jede so erzeugte Standardkurve zehnmal auf zehn verschiedenen ELISA-Platten durchgeführt und der geometrische Mittelwert bestimmt.

3.1.2.2 Herstellung der NANP19 Antigenlösung

Die NANP19 Antigenlösung (Dobeli, Andres et al. 1998) wird mit einem Proteingehalt von 5 mg/ml hergestellt. (1 ml PBS-Puffer und 5 mg NANP19). Hinsichtlich Extensionsintensität und Materialverbrauch wurde mittels Verdünnungsreihe die optimale Beschichtungskonzentration ermittelt. Zur Beschichtung wurde eine Proteinkonzentration von 5 µg/ml verwendet.

3.1.2.3 Beschichtung der Mikrotiter-Platten

Um eine Peptidkonzentration von 5 µg/ml zu erreichen, werden 1 µl Antigenlösung mit 1 ml PBS-Puffer verdünnt. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten werden 100 µl dieser Verdünnung pro Napf pipettiert. Es wird dabei nur die erste Reihe (für die Standardkurve; mit S gekennzeichnet) und jeweils zwei von drei Vertiefungen die für die Proben bestimmt sind inkubiert (mit x gekennzeichnet). Die dritte Vertiefung wird nicht mit dem Antigen beschichtet. Somit kann eine

eventuell auftretende, unspezifische Bindung von Immunglobulinen im Testserum identifiziert werden.

Abbildung 4: Beschichtung der ELISA-Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	X	X		X	X		X	X		X	X	
C	X	X		X	X		X	X		X	X	
D	X	X		X	X		X	X		X	X	
E	X	X		X	X		X	X		X	X	
F	X	X		X	X		X	X		X	X	
G	X	X		X	X		X	X		X	X	
H	X	X		X	X		X	X		X	X	

Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt, bevor sie über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert wird. Als nächstes wird die ELISA-Platte mit Hilfe des Handwaschgerätes und der Waschlösung fünfmal sorgfältig gespült.

3.1.2.4 Postcoating

In jede Vertiefung werden 200 µl Postcoatingpuffer pipettiert und die ELISA-Platte für eine Stunde bei 37° C im Brutschrank belassen, ehe sie mit der Waschlösung fünfmal gewaschen wird. Hierdurch werden ungebundene Stellen in den Vertiefungen benetzt.

3.1.2.5 Inkubation

- Das zu untersuchende Serum wird mit dem Inkubationspuffer im Verhältnis 1:250 verdünnt; in diesem Fall 5 µl Serum mit 1.250 µl Inkubationspuffer.
- Die Positiv-Kontrolle besteht aus einem Pool von Antikörper-positiven Seren von Patienten mit nachgewiesener *Plasmodium falciparum* Infektion.
- Die Negativ-Kontrolle besteht aus einem Pool von Antikörper-negativen Seren von Personen die sich niemals in einem Malaria-Endemiegebiet aufgehalten haben.
- Die Konzentrationen der Patientenseren werden schließlich als Antikörpereinheiten (AKE), das heißt als Vielfaches der normalen Aktivität, also als Faktor des negativen Serumpools ausgedrückt.
- Faktor 100: Positiv-Pool: IKP 1:250 (5 µl Positiv Pool :1.250 µl IKP)
- Faktor 33: Faktor 100 : IKP 1:2 (200 µl Faktor 100: 400 µl IKP)
- Faktor 10: Faktor 100 : IKP 1:9 (100 µl Faktor 100: 900 µl IKP)
- Faktor 1: Negativ-Pool: IKP 1:250(5 µl Negativ Pool :1.250 µl IKP)
- Leerwert: IKP (100 µl IKP)

Sowohl die Serum- als auch die Standardverdünnung werden gut gemischt und anschließend 100 µl/ Napf appliziert (siehe Schema). Danach werden die ELISA-Platten für eine Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Abbildung 5: Standardkurve und Serumproben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	33	33	10	10	1	1	L	L	L	L
B	1	1	1	8	8	8	15	15	15	22	22	22
C	2	2	2	9	9	9	16	16	16	23	23	23
D	3	3	3	10	10	10	17	17	17	24	24	24
E	4	4	4	11	11	11	18	18	18	25	25	25
F	5	5	5	12	12	12	19	19	19	26	26	26
G	6	6	6	13	13	13	20	20	20	27	27	27
H	7	7	7	14	14	14	21	21	21	28	28	28

100 = Faktor 100

10 = Faktor 10

1 = Serumverdünnung 1

33 = Faktor 33

1 = Faktor 1

2 = Serumverdünnung 2

L = Leerwert

28 = Serumverdünnung 28

3.1.2.6 Konjugat

Als Konjugat wird Anti-human IgG (h+l) goat der Firma ICN Biomedicals verwendet. Eine Konjugatlösung der Verdünnungsstufe 1:16.000 bestehend aus 80 ml Inkubationspuffer und 5 µl Konjugat werden hergestellt. Die Mikrotiterplatten werden wie beschrieben, gewaschen. Pro Vertiefung werden 100 µl appliziert. Die Platte wird nun wieder für eine Stunde bei 37° C in den Brutschrank gegeben.

3.1.2.7 Substrat

Die Substratlösung wird aus 50 ml Gebrauchslösung und einer Tablette OPD hergestellt. Kurz vor Gebrauch werden 10 µl H₂O₂ hinzu gegeben. Die Mikrotiterplatten werden gründlich ausgewaschen und mit Aqua dest. gespült. In jede Vertiefung werden 100 µl Substratlösung pipettiert. Nun werden die ELISA-Platten im Dunklen bei Raumtemperatur für exakt 10 Minuten inkubiert. Der Vorgang wird mit 25 µl Stopplösung (Schwefelsäure)/ Vertiefung angehalten.

3.1.2.8 Ablesung und Standardkurven

Der Absorptionsindex wird mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Für die Erstellung der Standardkurve wurde ein Poolserum von Patienten mit hoher CSP-Antikörperkonzentration so verdünnt, dass Standardseren mit der 100-, 33- und 10-fachen Aktivität eines negativen Poolserums erhalten wurden (Felgner 1978). Der Grenzwert dieses Tests liegt bei 3 AKE, definiert durch ein Konfidenzintervall von 95 % aus einem Panel von Serumproben gesunder Personen, die sich noch nie in einem Malariagebiet aufgehalten haben.

3.2 Evaluation des CSP-Antikörper-ELISA-Tests

Zur Evaluation des NANP19- ELISA-Tests wurden Seren von Patienten verwendet die sich zwischen 1997 und 2001 in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München vorstellten. Hierbei lassen sich vier verschiedene Gruppen unterscheiden.

- Die erste Gruppe bestand aus 118 nicht-immunen Patienten mit symptomatischer *Malaria tropica* Erkrankung und labortechnisch nachweislicher *Plasmodium falciparum* Infektion. Die Diagnose dieser Patienten wurde mikroskopisch mittels Ausstrich und Dicker Tropfen bestätigt. Die Seren wurden zwischen 1 bis 90 Tagen nach dem Auftreten von Symptomen gewonnen.
- Die zweite Gruppe bestand aus 68 europäischen Patienten die nachweislich an verschiedenen Tropenkrankheiten litten. Die Diagnosen dieser Patienten wurde abhängig von der jeweiligen Erkrankung entweder mikroskopisch oder serologisch bestätigt:
 - Malaria tertiana (Ausschließlich: *Plasmodium vivax*) n = 22
 - Invasive Amoebiasis n = 10
 - Schistosomiasis n = 10
 - Dengue Fieber n = 10
 - Leishmaniose n = 7
 - Lymphatische Filariose n = 6
 - Chagas n = 3
- Die dritte Gruppe bestand aus 117 deutschen Patienten, die sich niemals im Malariagebiet aufgehalten haben und sich zum Zweck einer Tropentauglichkeitsuntersuchung vorstellten.
- Die vierte Gruppe bestand ebenfalls aus 50 deutschen Patienten die sich niemals in Malariagebiet aufgehalten haben und die zusätzlich einen nachweisbar hochpositiven Rheumafaktor besaßen.

Sämtliche Diagnosen wurden entweder mikroskopisch bzw. serologisch bestätigt.

3.3 CSP-Antikörper Prävalenz bei Reisenden

Seren von insgesamt 1.925 Personen wurden sowohl vor als auch nach ihrer Reise in Malaria-Endemiegebiete gewonnen. Die Serumproben stammen aus zwei großen internationalen Multi-Center-Studien (Mal 30010 und Mal 30011). Ziel dieser Studien war es die Sicherheit und Wirksamkeit von Medikamenten, die zur Malariachemoprophylaxe eingesetzt werden, zu vergleichen.

- MAL 30010
 - Vergleich von Atovaquon-Proguanil mit Mefloquin
- MAL 30011:
 - Vergleich von Atovaquon-Proguanil mit Chloroquin-Proguanil

Mal 30010 (April - September 1999)

Für Mal 30010 (Overbosch, Schilthuis et al. 2001) wurden 976 Probanden an insgesamt 15 Tropen- und Reisemedizinischen Instituten in den Niederlanden, Deutschland, Großbritannien, Kanada und Südafrika rekrutiert. Die Probanden erhielten in dieser randomisierten Doppelblindstudie entweder Atovaquon-Proguanil oder Mefloquin zur Malariachemoprophylaxe für ihre Reise.

Einschlusskriterien waren: Mindestalter von drei Jahren, ein Körpergewicht von mindestens 11 kg und eine Reise in ein Gebiet das für *Plasmodium falciparum* endemisch war von maximal 28 Tagen.

Ausschlusskriterien waren: Bekannte Allergie gegen Atovaquon, Proguanil oder Mefloquin, eine medizinische Vorgeschichte von Krampfanfällen, psychiatrische Erkrankungen, generalisierte Psoriasis, Alkoholismus, renale, hepatische oder kardiale Erkrankungen, schwere hämatologische oder neurologische Erkrankungen, Schwangerschaft, Stillzeit, eine Malariaerkrankung in den letzten 12 Mona-

ten oder eine Reise in ein Malariagebiet in den letzten 60 Tagen. Serumproben wurden sowohl vor der Reise als auch 28 Tage nach Ende der Reise abgenommen. In keiner der beiden Gruppen trat eine bestätigte Malariaerkrankung auf. Von insgesamt 931 Probanden lagen gepaarte Serumproben vor.

Weitere demographische Daten finden sich in Tabelle 4. Weitere Daten zu Reise-land und Reisedauer in Tabelle 5.

Mal 30011 (April - Oktober 1999)

Für Mal 30011 (Hogh, Clarke et al. 2000) wurden insgesamt 1.083 Probanden an insgesamt 21 Reisemedizinischen Instituten in Dänemark, Großbritannien, Frankreich, Deutschland, den Niederlanden, Südafrika und Kanada im Rahmen einer Malaria Chemoprophylaxe-Studie gewonnen. Die Probanden erhielten in dieser randomisierten Doppelblindstudie entweder Atovaquon-Proguanil oder Chloroquin-Proguanil zur Malariachemoprophylaxe für ihre Reise.

Einschlusskriterien waren: Mindestalter von 12 Jahren, ein Körpergewicht von mindestens 50 kg und eine Reise in ein Gebiet das für *Plasmodium falciparum* endemisch war für maximal 28 Tagen.

Ausschlusskriterien waren: Bekannte Allergie gegen Atovaquon, Proguanil oder Chloroquin, eine medizinische Vorgeschichte von Krampfanfällen, psychiatrische Erkrankungen, generalisierte Psoriasis, Alkoholismus, renale, hepatische oder kardiale Erkrankungen, schwere hämatologische oder neurologische Erkrankungen, Schwangerschaft, Stillzeit, eine Malariaerkrankung in den letzten 12 Monaten oder eine Reise in ein Malariagebiet in den letzten 60 Tagen. Serumproben wurden sowohl vor der Reise, als auch 28 Tage nach Ende der Reise abgenommen. Von insgesamt 972 Probanden lagen gepaarte Serumproben vor. Drei der Studienteilnehmer erkrankten nach ihrer Rückkehr aus Mali, Nigeria und Uganda an Malaria tropica.

Weitere demographische Daten finden sich in Tabelle 4. Weitere Daten bzgl. Reiseland und Reisedauer in Tabelle 5.

Tabelle 4: Demographische Daten der Studien 30010 und 30011

Quelle: (Overbosch, Schilthuis et al. 2001) (Hogh, Clarke et al. 2000)

Studiennummer Medikamentengruppe	30010 Atovaquon/ Proguanil	30010 Mefloquin	30011 Atovaquon/ Proguanil	30011 Chloroquin/ Proguanil	Insgesamt
N					
Insgesamt	493	483	511	511	1998
Paarweise Serumproben *	469	462	484	488	1903
Alter					
Durchschnitt	33,0	33,6	36,0	35,0	34,4
Range	4 -79	5 -80	13 -72	13 -74	4 -80
Geschlecht N (%)					
Männlich	249 (53%)	261 (56%)	237 (49%)	262 (54%)	1.009 (53%)
Weiblich	220 (47%)	201 (44%)	247 (51%)	226 (46%)	894 (47%)
Ethnische Gruppe N (%) +					
Kaukasisch	445 (90%)	430 (89%)	496 (97%)	486 (95%)	1.857 (93%)
Schwarz	31 (6%)	34 (7%)	6 (1%)	12 (2%)	83 (4%)
Asiatisch	11 (2%)	14 (3%)	3 (1%)	7 (1%)	35 (2%)
Andere	6 (1%)	5 (1%)	6 (1%)	6 (1%)	23 (1%)
Größe (Durchschnitt)	174	173	173	174	174
Gewicht (Durchschnitt)	72.0	71.2	71.4	72.3	71.7
Malariaerkrankung in der Vorgeschichte					
N (%)	22 (5%)	20 (4%)	9 (2%)	7 (1%)	58 (3%)
Vor x Jahren Durchschnitt(Range)	8 (1 -40)	10 (1 -50)	13 (2 -60)	11 (2 -30)	10 (1 -60)

* Von Insgesamt 1.903 der insgesamt 1.998 Studienteilnehmer lagen paarweise Serumproben vor.

+ aufgrund von Rundung, ergibt die Addition teilweise nicht 100 %

Tabelle 5: Reiseziele und Reisedauer der Studienteilnehmer 30010 und 30011

Studien- nummer Medikam. Gruppe	30010 Atovaquon/ Proguanil	30010 Mefloquin	30011 Atovaquon/ Proguanil	30011 Chloroquin/ Proguanil	Insgesamt
N	469	462	484	488	1903
Reiseziel N (%)					
Ostafrika	176 (38%)	162 (35%)	128 (26%)	148 (30%)	614 (32%)
Westafrika	111 (24%)	111 (24%)	84 (17%)	96 (20%)	402 (21%)
Südliches Afrika	75 (16%)	69 (15%)	65 (13%)	63 (13%)	272 (15%)
Zentralafrika	18 (4%)	14 (3%)	14 (3%)	10 (2%)	56 (3%)
Südamerika	29 (6%)	32 (7%)	48 (10%)	40 (8%)	149 (8%)
Andere Reiseziele	60 (13%)	74 (16%)	145 (30%)	131 (27%)	410 (21%)
Reisedauer					
Durchschnitt (Tage)	18,8	18,6	16,9	17,6	18,0

Die geographische Aufteilung des Reiseziels „Afrika“ erfolgte in die vier unterschiedlichen UN-Subregionen *Ostafrika*, *Westafrika*, *Zentralafrika* und *Südliches Afrika* (Abb. 5). Die Destination *Andere Reiseziele* setzt sich vorwiegend aus den Endemiegebieten in Asien und zu einem kleineren Teil aus Ozeanien und Mittelamerika zusammen.

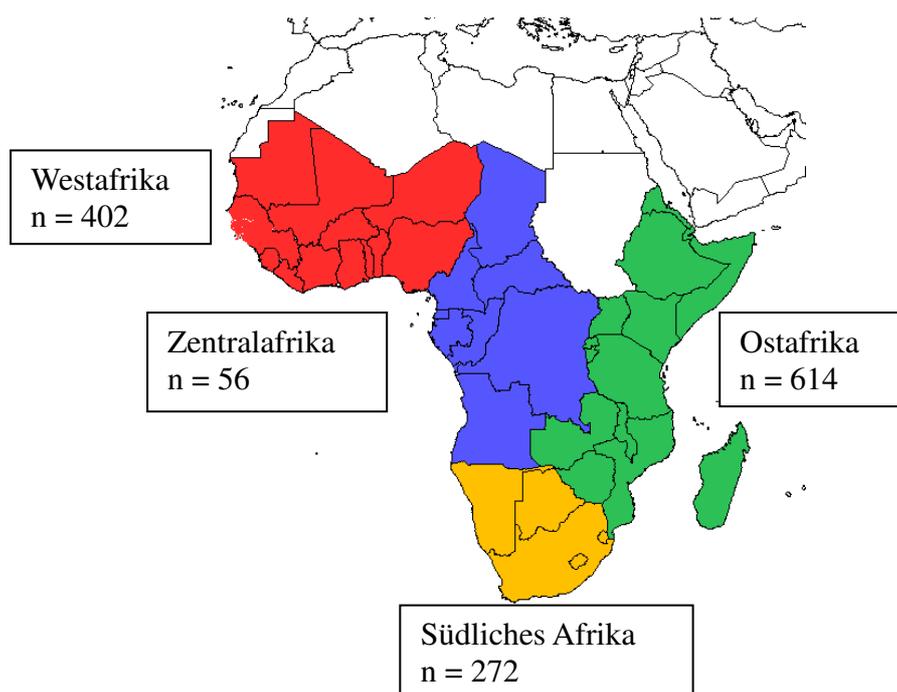


Abbildung 6: Unterteilung der Reiseziele der Studienteilnehmer 30010 und 30011 in der Region Afrika

4 Ergebnisse

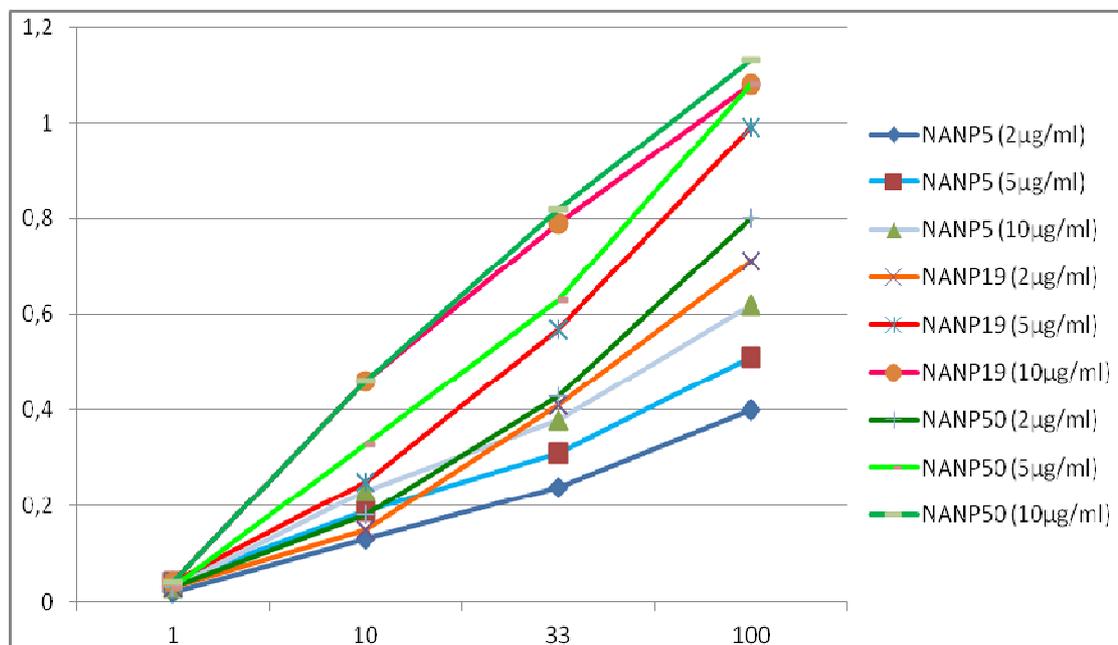
4.1 Entwicklung eines CSP-Antikörper-ELISA-Tests (Checker board Titration).

Die arithmetischen Mittelwerte der Extinktionswerte der Antigene NANP5, NANP19 und NANP50 für die jeweiligen Beschichtungskonzentrationen 2µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml sind in Tabelle 6 dargestellt. Die sich daraus ergebenden Standardkurven sind in Abbildung 7 abgebildet.

Tabelle 6: Mittelwerte der Extinktionswerte im CSP-ELISA bei verschiedenen Konzentrationen der Antigene NANP5, NANP19 und NANP50

Faktor	NANP5			NANP19			NANP50		
	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
1	0,02	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04
10	0,13	0,19	0,23	0,15	0,25	0,46	0,18	0,33	0,46
33	0,24	0,31	0,38	0,41	0,57	0,79	0,43	0,63	0,82
100	0,4	0,51	0,62	0,71	0,99	1,08	0,8	1,08	1,13

Abbildung 7: Standardkurven der jeweiligen Antigene und Beschichtungskonzentrationen



4.2 Evaluation des CSP-Antikörper-ELISA-Tests

Aufgrund der Ergebnisse der Checker board Titration (s.4.1) wurde NANP19 als Antigen für den CSP-AK-ELISA in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Als Cut-off-Wert für die Messung von CSP-Antikörpern wurde drei Antikörper-einheiten (U) definiert (siehe 3.1.2.8).

4.2.1 Patienten mit Malaria tropica (*Plasmodium falciparum*)

Von den insgesamt 118 Patienten die an einer Malaria tropica erkrankten fiel der CSP-Antikörpertest mit NANP19-Antigen bei 80 Patienten positiv aus. Da zwischen Antigenkontakt und der Bildung von spezifischen Antikörpern, insbesondere bei dem hier untersuchten IgG, Tage und Wochen vergehen können, wurden die 118 Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt.

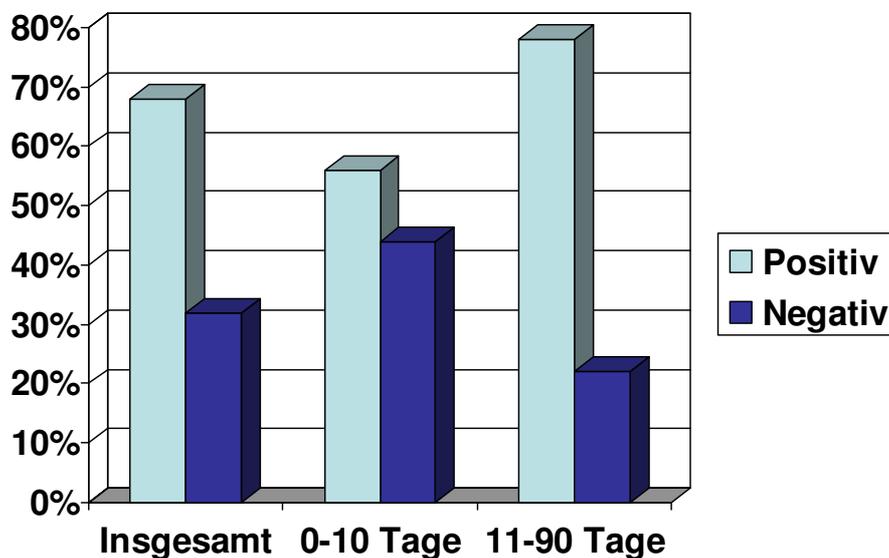
- Bei den Patienten der ersten Gruppe wurde die Blutabnahme innerhalb der ersten zehn Tage nach Auftreten der Malariasymptomatik durchgeführt. Diese Gruppe bestand aus 55 Patienten. Bei 31 dieser Patienten konnten positive CS-Antikörpertiter nachgewiesen werden.
- Bei den Patienten der zweiten Gruppe wurde die Blutabnahme zwischen den Tagen 11 und 90 nach Symptombeginn durchgeführt. In dieser Gruppe konnten bei 49 der 63 Patienten positive Antikörpertiter nachgewiesen werden.

Siehe auch Tabelle 7 und Abbildung 8:

Tabelle 7: Häufigkeit von NANP19-Antikörpern bei Patienten mit Malaria tropica (Gruppe 1 und 2)

	Insgesamt	Gruppe 1 (Tag 0 -10)	Gruppe 2 (Tag11 -90)
N	118	55	63
≥ 3 U (positiv)	80	31	49
%	68%	56%	78%
< 3 U (negativ)	38	24	14
Arith. Mittel der positiven Seren	20,3 U	14,4 U	24 U
Maximum der positiven Seren	285,5 U	78,0 U	285,5 U
Minimum der positiven Seren	3,0 U	3,3 U	3,0 U
Median der positiven Seren	7,1 U	6,5 U	7,4 U

Abbildung 8: Patienten mit Malaria tropica (frühe und späte Blutentnahme)



4.2.2 Patienten mit Malaria tertiana (*Plasmodium vivax*)

Von den insgesamt 22 Patienten bei denen mikroskopisch eine Infektion mit *Plasmodium vivax* nachgewiesen wurde reagierten zwei positiv (9,1%).

4.2.3 Patienten mit anderen tropenspezifischen Erkrankungen

Von den sechs Patienten mit lymphatischer Filariose reagierten zwei Seren positiv (33,3%). Es gab keine positiven Reaktionen bei den Patienten mit invasiver Amöbiasis, Dengue-Fieber, Chagas, Leishmaniose und Schistosomiasis.

4.2.4 Personen, die sich noch nie in einem Malariagebiet aufgehalten haben

Von den 117 Personen die sich niemals in Malariagebieten aufgehalten haben reagierte ein Serum (0,85%) im ELISA-Test positiv. Der Mittelwert der Patienten aus der Kontrollgruppe lag bei 0,86 U (Median: 0,8 U Range: 0 -3,5 U).

4.2.5 Patienten mit hoch positiven Rheumafaktor, die sich noch nie in Malariagebiet aufgehalten haben

Alle 50 Patienten mit Rheumafaktoren reagierten negativ (Mittelwert 0,95 U).

Tabelle 8: Kreuzreaktionen

	Insgesamt	Positiv	Negativ	Pos. %	Neg. %
P. vivax	22	2	20	9%	91%
Amöbiasis	10	0	10	0%	100%
Chagas	3	0	3	0%	100%
Dengue	10	0	10	0%	100%
Filariose	6	2	4	33%	67%
Leishmaniose	7	0	7	0%	100%
Schistosomiasis	10	0	10	0%	100%
Rheumafaktor	50	0	50	0%	100%
Kontrollgruppe	117	1	116	0,85%	99,15%

4.3 CSP-Antikörper Prävalenz bei Reisenden

4.3.1 Serokonversion

Von 1.903 Reisenden die bzgl. der Prävalenz von CSP-Antikörpern untersucht wurden hatten 66 (3,5%) positive Antikörpertiter nachdem sie von ihrer Reise zurückkehrten. Trotzdem konnte eine Serokonversion nur in 18 der 1.903 Proben (0,95%) festgestellt werden. Der Mittelwert der Antikörpertiter in der Gruppe der Serokonverter lag bei 1,6 U vor der Reise und 5,9 U nach der Reise. Die restlichen 48 der 1.903 Teilnehmer (2,5%) hatten bereits CS-Antikörper vor Beginn der Reise.

Tabelle 9: Prävalenz von Circumsporoziten-Antikörpern

	N	%
Reisende insgesamt	1.903	100
negativ ($U < 3$)	1.837	96,5
positiv ($U \geq 3$)	66	3,5
Serokonverter	18	0,95

4.3.2 Demographische Daten der Serokonverter

Die Gruppe der Serokonverter bestand zu 72% aus männlichen und zu 28% aus weiblichen Teilnehmern. Im Vergleich dazu waren in der gesamten Studienpopulation 53% männlich und 47% weiblich (Tab. 10, Abb. 8).

Tabelle 10: Geschlechtsverteilung

	N	%	SC	SC%	OR (95% CI)	P-Value (χ^2)
Männlich	1009	53%	13	72%	2,32 (0,9 -6,3)	0,15
Weiblich	894	47%	5	28%	0,43 (0,2 -1,2)	0,15
Insgesamt	1903	100%	18	100%		

CI 95% Konfidenz-Intervall der OR

Fischer-Exact-Test, zweiseitig

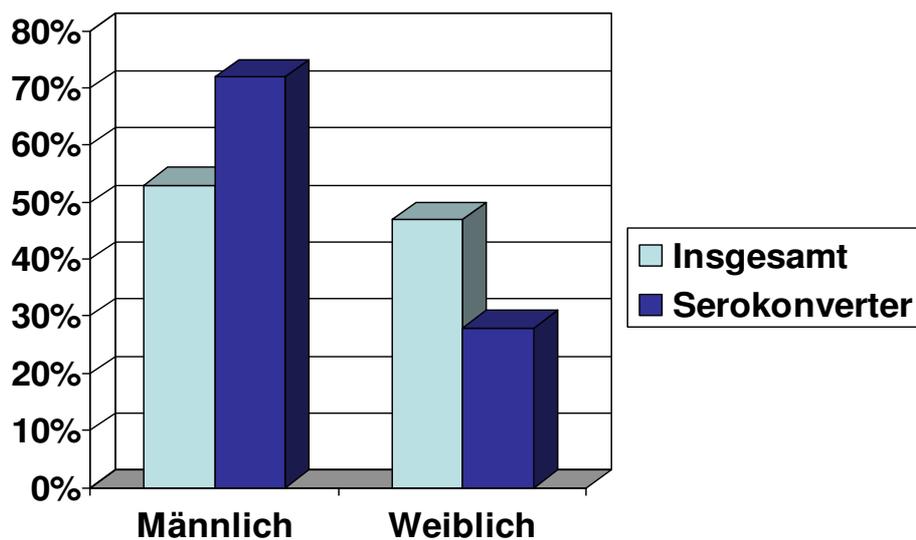


Abbildung 9: Geschlechtsverteilung

Das Durchschnittsalter in der Gruppe der Serokonverter lag bei 31 Jahren (Median 25 Jahre, Range 8 -72), das Durchschnittsalter in der Studienpopulation lag bei 34,5 Jahren (Median 31, Range 5 -80) (Tab.11).

Tabelle 11: Altersverteilung

Altersgruppe	Reisende insgesamt	Serokonverter	OR (95% CI)	P-Value (χ^2)
0 -17	82	1	1,31 (0,2 -7,8)	0,55
18 -30	832	11	2,04 (0,8 -5,1)	0,16
31 -45	546	3	0,49 (0,2 -1,6)	0,31
46 -65	406	2	0,46 (0,1 -1,8)	0,39
> 65	37	1	3,02 (0,5 -18,4)	0,30

CI 95% Konfidenz-Intervall der OR
Fischer-Exact-Test, zweiseitig

4.3.3 Reisedaten der Serokonverter

Die Reisedauer der Serokonverter lag bei durchschnittlich 17 Tagen (Median: 16 Tage; Range: 5 -38). Im Vergleich lag die durchschnittliche Reisedauer bei allen Reisenden bei 18 Tagen (Median: 17; Range: 2 -38).

Tabelle 12: Reisedauer

Reisedauer in Tagen	Reisende Insgesamt	Serokonverter	OR (95% CI)	P-Value (χ^2)
0 -7	142	1	0,73 (0,1 -4,3)	1,0
8 -14	411	3	0,72 (0,2 -2,3)	0,78
15 -21	663	10	2,36 (1,0 -5,8)	0,08
22 -28	687	2	0,30 (0,08 -1,16)	0,12
29 -38	124	2	1,81 (0,46 -7,15)	0,33

CI 95% Konfidenz-Intervall der OR
Fischer-Exact-Test, zweiseitig

Die meisten Serokonverter (n = 15 bzw. 83%) bereisten Malaria-Endemiegebiete in Afrika: *Ostafrika* n = 7 (39%), *Westafrika* n =6 (33%), *südliches Afrika* n =2 (11%). Drei Serokonverter (17%) bereisten „*Andere Reiseziele*“. Keiner der Reisenden nach Südamerika oder Zentralafrika serokonvertierte (Tab. 13, Abb. 9).

Tabelle 13: Reiseziele

Reiseziel	Reisende	%	Sero- konverter	% der SC	OR	P-Value (χ^2)
Ostafrika	614	32,3	7	38,8	1,34 (0,5 -3,4)	0,61
Westafrika	402	21,1	6	33,3	1,88 (0,7 -4,9)	0,24
Zentral- Afrika	56	2,9	0	0	n.a.	n.a.
Südliches Afrika	272	14,3	2	11,1	0,75 (0,2 -2,9)	1,0
Südamerika	149	7,8	0	0	n.a.	n.a.
Andere Reiseziele	410	21,5	3	16,6	0,73 (0,2 -2,4)	0,78
Insgesamt	1.903	100	18	100		

CI 95% Konfidenz-Intervall der OR

Fischer-Exact-Test, zweiseitig

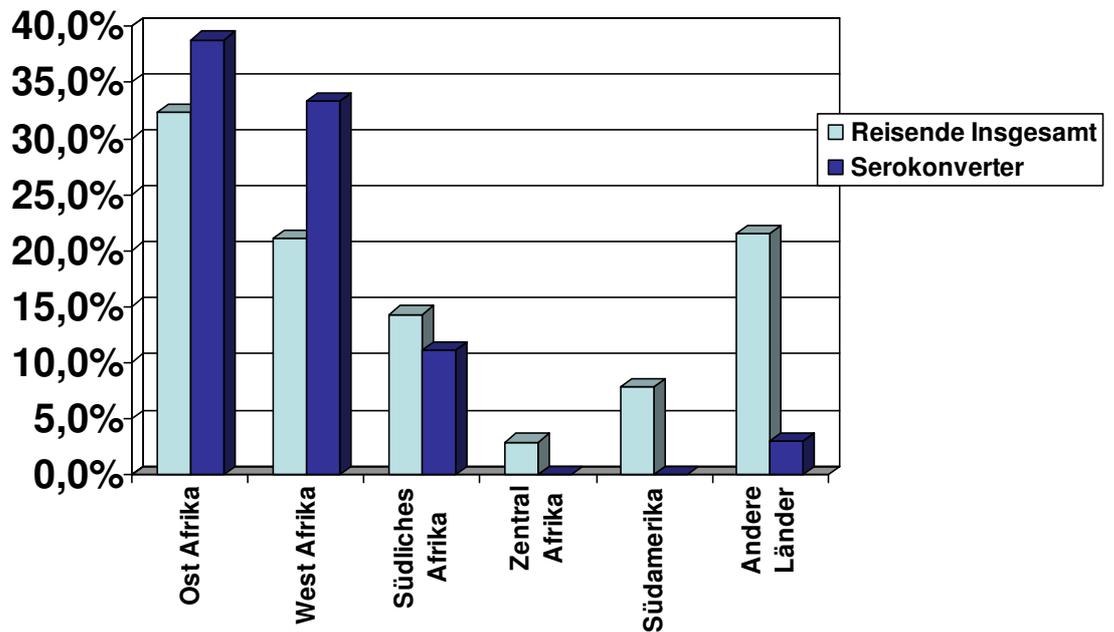


Abbildung 10: Reiseziele

Die Infektionsrate wurde hochgerechnet für 1.000 Reisende, die sich einen Monat in den jeweiligen Endemiegebieten aufhalten (Tab.14).

Tabelle 14: Infektionsrisiko/ 1000 PM

	Personen-Monate (PM)	Serokonverter n	Serokonverter/ 1000 PM	Infektionsrate
Ostafrika	387,8	7	18,1	1,81%
Westafrika	244,0	6	24,6	2,46%
Zentralafrika	36,0	0	0	0%
Südliches Afrika	132,8	2	15,1	1,51%
Südamerika	77,6	0	0	0%
Andere Reiseziele	260,9	3	11,5	1,15%
Insgesamt	1139,1	18	15,8	1,58%

5 Diskussion

5.1 Entwicklung eines CSP-Antikörper-ELISA-Tests

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem einen ELISA-Test zum Nachweis von CSP-Antikörpern zu entwickeln. Die ELISA-Technik zum Nachweis von CSP-Antikörpern (mit NANP50 als Antigen) wurde hierzu im Tropeninstitut Basel erlernt und anschließend im Tropeninstitut München etabliert. Es wurden drei unterschiedlich lange CSP-Proteine (NANP5, NANP19 und NANP50) in verschiedenen Beschichtungskonzentrationen miteinander verglichen. (Tabelle 6, Abbildung 7).

Hierbei war auffällig, dass die Standardkurven für NANP5 in allen Beschichtungskonzentrationen unter den Kurven für NANP19 und NANP50 lagen. Dieses Ergebnis korreliert gut mit einer früheren Vergleichsstudie von CSP-AK-ELISA's mit unterschiedlich langen NANP-Antigenen (Del Giudice, Douglas et al. 1989) Auch bei dieser Studie waren Extinktionswerte und Signifikanz eines verwendeten NANP3-Antigens deutlich geringer im Vergleich zu NANP-Proteinen mit höherer Anzahl an Repetitionen. Auch bei höheren Beschichtungskonzentrationen hatte die Standardkurve eine vergleichsweise geringe Steigung. Dies führt dazu, dass auch bei steigenden Antikörperkonzentrationen im Serum es nur zu einer geringen Zunahme der Extinktionswerte kommt. Dies ist insbesondere im Bereich des Cut-offs nachteilig, da bei geringer Titerhöhe nicht eindeutig zwischen positiven und negativen Seren unterschieden werden kann.

Die Extinktionswerte zwischen den Antigenen NANP19 und NANP50 unterschieden sich jedoch nur gering, auch die Standardkurven nahmen einen ähnlichen Verlauf. Hinsichtlich der Beschichtungskonzentrationen zeigten die Versuchsreihen mit 5 µg/ml eine höhere Extinktion als die Versuche mit 2 µg/ml.

Eine weitere Erhöhung der Beschichtungskonzentration auf 10 µg/ml brachte jedoch nur noch eine geringere Steigerung der Extinktionswerte, so dass von einer gewissen Sättigung auszugehen ist.

In der Zusammenschau der beschriebenen Versuchsreihen, wurde entschieden NANP19 als Antigen für den CSP-AK-ELISA in einer Konzentration von 5 µg/ml zu verwenden.

5.2 Evaluation des CSP-Antikörper ELISA-Tests

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der etablierte CSP-AK-ELISA hinsichtlich Sensitivität und Spezifität evaluiert. Als cut-off Wert wurde ein Wert von > 3 AKE (Antikörpereinheiten oder Units) definiert, als 95% Konfidenzintervall eines Panels von Serumproben gesunder Personen, die sich noch nie in einem Malariagebiet aufgehalten haben.

Um die Sensitivität des Tests zu ermitteln wurden Serumproben von 118 nicht-immunen *Malaria tropica* Patienten untersucht. Bei 80 Serumproben konnten AKE > 3 U nachgewiesen werden, dies entspricht einer Sensitivität von 68%. Nach Antigenkontakt gebildete Antikörper können in immunologischen Testverfahren erst nach einer gewissen Latenzzeit nachgewiesen werden. So eignet sich der serologische Nachweis von Merozoiten-Antikörper auch nicht zum Nachweis eines akut erkrankten Patienten, da diese Antikörper erst nach einer Latenzzeit von frühestens einer Woche nach Symptombeginn nachweisbar sind. Auch treten verschiedene Antikörperklassen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Bei dem hier durchgeführten Test wurden gegen NANP19 gerichtete Antikörper der Klasse IgG nachgewiesen. Die Sensitivität von immunologischen Testverfahren erreicht also erst nach einer gewissen Latenzzeit ihr Maximum. Die Inkubationszeit von *Plasmodium falciparum* beträgt mindestens 6 Tage, was erklärt dass gegen NANP19 gerichtete Antikörper bereits am Tag 0 nach Symptombeginn nachweisbar sind. Um die von der Latenzzeit abhängige Sensitivität zu demonstrieren, wurden die 118 Serumproben, abhängig von der Zeit zwischen Symptombeginn und Blutabnahme in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Sensitivität des Tests in Gruppe 1 (während den ersten zehn Tagen nach Auftreten der Symptome) lag bei 56% (31 von 55 Proben waren positiv) und in Gruppe 2 (11- 90 Tage nach Symptombeginn) bei 78% (49 von 63 Proben waren positiv). Die Sensitivität war damit in Gruppe 2

signifikant besser als in Gruppe 1 ($p = 0,018$ Fisher Exact Test). Daher sollte zur optimalen Verwendung des Tests bei asymptomatischen Rückkehrern aus endemischen Gebieten die Blutabnahme in einem Zeitfenster von 11-90 Tagen nach Rückkehr durchgeführt werden.

Um die Spezifität des Tests zu ermitteln, wurden Seren von 117 Personen, die sich noch nie in Endemiegebieten aufhielten, untersucht. Nur eine von 117 Proben der Kontrollgruppe reagierte positiv für Circumsporozoiten-Antikörper (3,5 U), dies ergibt eine Spezifität von 99,15%.

Um mögliche Kreuzreaktionen mit anderen tropenspezifischen Erkrankungen auszuschließen, wurden Seren von Patienten mit Malaria tertiana (nur *Plasmodium vivax*), invasive Amöbiasis (*Entamoeba histolytica*), Chagas (*Trypanosoma cruzi*), Dengue Fieber, lymphatische Filariose (*Wucheria bancrofti*), viszeraler Leishmaniose (*Leishmania donovani*) und Schistosomiasis (*Schistosoma sp.*) auf Antikörper untersucht.

Von den 22 Patienten mit *Plasmodium vivax* Infektion reagierten zwei Seren (9%) positiv. Ähnlich Resultate für Kreuzreaktionen mit *P. vivax* konnten bereits in einer Evaluation eines kommerziellen CS-Antikörper-ELISA-Tests nachgewiesen werden. So reagierten in dieser Studie 6 von 76 (7,9%) *P. vivax* Serumproben positiv (Jelinek, Nothdurft et al. 1995). Verantwortlich hierfür dürften Antigengemeinschaften von Circumsporozoitenproteinen unterschiedlicher Malaria-Parasiten sein.

Von den 6 Patienten mit lymphatischer Filariose reagierten 2 Seren (33 %) positiv. Hinsichtlich einer möglichen Kreuzreaktion mit Filarien muss man jedoch berücksichtigen, dass eine lymphatische Filariose eine, bei normalen Reisenden, ausgesprochen seltene Erkrankung handelt. Bei beiden Patienten handelte es sich um Langzeit-Reisende, die sich über Monate in hochendemischen Malariagebieten unter Malariachemoprophylaxe aufgehalten haben. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Patienten während ihres Aufenthaltes mit *Plasmodium falciparum* infizierten, auch wenn anamnestisch keine Malaria-Episode bekannt war.

Die übrigen Seren mit tropenspezifischen Erkrankungen reagierten im CS-AK ELISA Test negativ.

Da Personen mit positivem Rheumafaktor normalerweise ein hohes Potential für Kreuzreaktionen in serologischen Test haben, wurden 50 Patientenseren untersucht, allerdings reagierte keines davon positiv.

Im Hinblick auf die Evaluation dieses Tests kann von einer zufrieden stellenden Sensitivität und einer sehr guten Spezifität für den Nachweis von Infektionen mit *Plasmodium falciparum* ausgegangen werden.

Vergleicht man diesen NANP19-CSP-AK-ELISA Test mit einem kommerziellen CSP-AK-ELISA-Test unter Verwendung von NANP40 (Esposito, Fabrizi et al. 1990) (Jelinek, Nothdurft et al. 1995), so zeigt sich eine vergleichbare Spezifität und eine etwas höhere Sensitivität.

Tabelle 15: Vergleich des NANP19 Tests mit einem kommerziellen NANP40 ELISA

	NANP19	NANP40 (Jelinek, Nothdurft et al. 1995)
Spezifität	99,15% (n = 117)	100% (n = 32)
Sensitivität gesamt	68% (n = 118)	43% (n = 120)
Sensitivität (frühe BE)	56% (n = 55) <i>Tag 0-10</i>	36% (n = 77) <i>Tag 0- 7</i>
Sensitivität (späte BE)	78% (n = 63) <i>Tag 11 -90</i>	55,8% (n = 43) <i>Tag 8 -90</i>

Im Vergleich zu NANP40 (4x40=160 Aminosäuren) ist das für diesen Test verwendete NANP19 ein weniger als halb so großes Peptid (4x19=76 Aminosäuren) und daher deutlich einfacher sowie kostengünstiger in der Herstellung. Darüber hinaus besitzt es bei diesem Versuchsaufbau eine höhere Sensitivität.

Die im Vergleich zu anderen serologischen Malariatests (z.B. der Nachweis des erythrozytären Stadiums) geringere Sensitivität, lässt sich mit dem spärlichen und kurzzeitigen Kontakt des Antigens mit dem Immunsystem erklären. Bei dem Stich der weiblichen Anopheles-Mücke werden nur ca. 10 -20 Sporozoiten in den menschlichen Wirt injiziert, welche innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden in die Leberzellen eindringen. Die geringe Sensitivität dieser Nachweis-Methodik ist bedauerlich, jedoch ist es durchaus möglich, dass uns auch in Zukunft keine exaktere Nachweismöglichkeit zum Nachweis einer *Plasmodium falciparum* Infektion zur Verfügung stehen wird. Aufgrund des geringen Antigenkontaktes ist durchaus denkbar, dass ein beträchtlicher Anteil der Infizierten keine CSP-Antikörper bilden wird.

Da der Nachweis von CSP-Antikörpern keine therapeutischen Konsequenzen nach sich zieht, sondern zur Abschätzung des Malariainfektionsrisikos in Endemiegebieten dient, ist das Ergebnis bezüglich der Sensitivität jedoch zufriedenstellend. Die CSP-AK-ELISA Methodik ist darüber hinaus ein nützliches Werkzeug, um die Wirksamkeit von Malaria-Präventionsmaßnahmen, wie z.B. Expositionsprophylaxe zu bestimmen und kann hilfreich sein, die Effektivität von Malariachemoprophylaxe-Präparaten abzuschätzen.

5.3 CSP-Antikörper-Prävalenz bei Reisenden

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Seroprävalenz von CSP-Antikörpern bei 1.903 gepaarten Serumproben von Reisenden in Malaria-Endemiegebiete untersucht. Die Serumproben wurden vor der Abreise und 28 Tage nach der Rückkehr im Rahmen von zwei internationalen Multi-Center-Studien MAL 30010 und MAL 30011 gewonnen.

Bei 66 der 1.903 Serumproben (3,5%) konnten nach der Reise im ELISA-Test positive Antikörpertiter (≥ 3 AKE) nachgewiesen werden. Jedoch konnte eine tatsächliche Serokonversion nur bei 18 Proben (0,95%) nachgewiesen werden. Bei den übrigen 48 Personen wurden Antikörperwerte ≥ 3 AKE bereits vor der Reise nachgewiesen.

Hier kann es sich sowohl um eine falsch positive Antikörperreaktion als auch um bestehende Antikörper von einer früheren Infektion mit *Plasmodium falciparum* handeln. Da sich der CSP-AK-ELISA-Test in der Evaluation durch eine sehr gute Spezifität von 99,15% auszeichnete, ist ein hoher Anteil von falsch positiven Serumproben unwahrscheinlich. Zu den Ausschlusskriterien der beiden prospektiven Studien zählten weder eine frühere Malariaerkrankung (einzige Bedingung war: keine Malariaerkrankung in den letzten 12 Monaten) noch der frühere Aufenthalt in einem Malariagebiet (Ausschlusskriterium war nur ein Aufenthalt in den letzten 60 Tagen). So gaben 58 Patienten in der Vorgeschichte eine Malaria-Erkrankung an. Circumsporozoiten IgG-Antikörper wurden bis zu 880 Tagen nach dem Ausbruch von Malaria-Symptomen nachgewiesen (Jelinek, Nothdurft et al. 1995). Dies kann erklären warum bei 48 Reisenden bereits bei der ersten Blutabnahme vor der Abreise Antikörper nachweisbar waren und betont wie wichtig es ist gepaarte Serumproben zu gewinnen.

Drei der 1.903 Reisenden erkrankten trotz Malariachemoprophylaxe (mit Chloroquin-Proguanil) an einer Malaria tropica (Hogh, Clarke et al. 2000). Die DTG empfiehlt aufgrund hochgradiger Resistenzen diese Kombination nur noch in Ausnahmefällen (z.B. Schwangerschaft) zur Malariachemoprophylaxe bei Reisen in Hochrisikogebiete einzusetzen (DTG 2010).

Bei 18 Reisenden (0,95%) konnte eine Serokonversion und damit eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Reisedauer war mit 18 Tagen relativ kurz. Rechnet man die Serokonversionsrate aller Studienteilnehmer zu Vergleichszwecken auf eine Reisedauer von einem Monat hoch, so würde dies eine Infektionsrate von 1,6% ergeben.

Die mit Abstand meisten (> 80%) nach Deutschland importierten Malariaerkrankungen werden jedes Jahr aus Afrika importiert (RKI 2009). Dies spiegelt sich auch in der geographischen Verteilung der Serokonverter in dieser Arbeit wider. So infizierten sich 15 der 18 Serokonverter (83,3%) auf dem afrikanischen Kontinent. Bei einer Aufenthaltsdauer von einem Monat ist die Infektionsrate für Westafrika mit 2,46% am höchsten, gefolgt von Ostafrika (1,81%) und dem Südlichen Afrika (1,51%). Diese Ergebnisse korrelieren auch mit den Meldezahlen der nach Deutschland bzw. Europa importierten und dem Robert-Koch Institut (RKI 2009) bzw. dem Surveillance Netzwerk TropNetEurop (Jelinek, Schulte et al. 2002) gemeldeten Malariaerkrankungen. Auffällig war, dass keiner der Reisenden nach einem Aufenthalt in Zentralafrika, einer Region mit Ländern wie z.B. Kamerun, die traditionell ein hohes Malariarisiko aufweisen, serokonvertierten. Dies ist am ehesten mit der geringen Anzahl an Reisenden (n = 56) und der niedrigsten Zahl an Patientenmonaten (PM = 36) (im Vergleich Ostafrika: PM 388) zu erklären.

Keiner der 149 Südamerika-Reisenden serokonvertierte. Bis auf die drei eher abgelegenen brasilianischen Provinzen Rondonia, Roraima und Acre und die Regenwaldgebiete Guyanas, Surinams und Französisch Guyanas teilte die DTG im Jahr 2010 die übrigen Regionen des tropischen Südamerikas als Niedrigrisikogebiete ein, für die keine kontinuierliche Malariachemoprophylaxe empfohlen wird (Behrens, Carroll et al. 2007; DTG 2010). 2008 wurden nur 6 der 402 Malariaerkrankungen, für die ein Infektionsort angegeben wurde, aus Südamerika nach Deutschland importiert (RKI 2009).

Insgesamt 3 der 18 Serokonverter (17%) bereisten „Andere Reiseziele“. Diese Destinationen setzen sich größtenteils aus den Malaria-Endemiegebieten Asiens und zu einem kleineren Teil aus Regionen in Mittelamerika und Ozeaniens zu-

sammen. Bei einer Reisedauer von einem Monat ergibt das für diese Regionen ein berechnetes Infektionsrisiko von 1,15%. Eine genaue Aufschlüsselung der Reiseziele liegt leider nicht vor. Da „Andere Reiseziele“ Regionen mit einem sehr heterogenen Infektionsrisiko umfasst, ist ein Vergleich mit anderen Studien bzw. Meldedaten nur bedingt sinnvoll. So wird z.B. das Infektionsrisiko für Papua-Neuguinea auf ca. 3% geschätzt (Hatz and Nothdurft 2006), während es für die meisten Regionen Thailands bei deutlich < 1% liegen dürfte.

Es liegen nur wenige Vergleichsstudien zum Nachweis von CS-Antikörpern bei nicht-immunen Reisenden vor.

Ende der 1980er Jahre ergab eine Berechnung des Malariarisikos anhand der gemeldeten Erkrankungen im Vergleich zu den Reisenden insgesamt ein Erkrankungsrisiko für Ozeanien von 4,1% und für Westafrika von 0,4% (Phillips-Howard, Radalowicz et al. 1990). Hierbei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass ein großer Teil der Reisenden eine Chemoprophylaxe einnahm, das tatsächliche Infektionsrisiko war aus diesen Daten also nicht abzuleiten.

Anfangs der 1990er Jahre berechnete man das Infektionsrisiko für Reisende anhand der Infektionsraten der semi-immunen Bevölkerung und anhand von Reisenden ohne Malariachemoprophylaxe. Für Ostafrika lag so die Schätzung ca. bei 1,2% pro Monat (Steffen, Fuchs et al. 1993). Das in dieser Studie ermittelte Infektionsrisiko für Ostafrika liegt im Vergleich dazu bei 18,1/ 1.000 PM oder bei 1,8%.

Die erste CSP-AK-Prävalenz-Studie bei nicht-immunen Reisenden (n = 222) in Malariagebieten Afrikas, südlich der Sahara zeigten, bei 21% der Reiserückkehrer positive CSP-Antikörper (Jelinek, Löscher et al. 1996). Bei dieser retrospektiven Studie wurden jedoch nur Serumproben nach der Reiserückkehr gewonnen. Daher ist unbekannt wie viele Probanden bereits vor der Abreise über CS-Antikörper verfügten, eine Berechnung der Serokonversion und damit der tatsächlichen Infektionsrate war hier nicht möglich.

Die erste prospektive Studie wurde mit 548 holländischen Reisenden durchgeführt (Cobelens, Verhave et al. 1998). Hier wurden bei 1,3% aller Reisenden CS-Antikörper nachgewiesen.

Tabelle 16: Vergleich der CSP-Serokonversion pro 1000 Personenmonate (PM) (Cobelens et al.)

Studie	West Afrika	Ost Afrika	Südamerika	Asien
Cobelens et al.	45,8	13,4	19,4	4,4
NANP19 CS-Prävalenz-Studie	24,6	18,1	0,0	11,5 (andere Reiseziele)
*Serokonversion/ 1.000 PM				

Eine weitere prospektive Studie mit 262 nicht-immunen deutschen Reisenden nach Ostafrika zeigte eine Serokonversionsrate für CSP-Antikörper von 4,96% (Nothdurft, Jelinek et al. 1999).

In einer groß angelegten, retrospektiven Studie zum Nachweis von CS-Antikörpern bei deutschen Reisenden in Malariagebiete weltweit, wurden Serumproben von 2.131 Reisenden untersucht. Insgesamt 4,9% aller Reisenden hatten nach der Reise positive CSP-Antikörpertiter. Serumproben vor der Abreise wurden hier nicht gewonnen, so dass die tatsächliche Zahl der Serokonverter niedriger liegen dürfte (Jelinek, Bluml et al. 1998).

Die Reisedauer und damit die Expositionsdauer ist normalerweise eng mit dem Infektionsrisiko mit *P. falciparum* verknüpft (Druilhe, Pradier et al. 1986; Webster, Boudreau et al. 1987; Jelinek, Löscher et al. 1996). Bezüglich der Reisedauer hielten sich die meisten Serokonverter (n = 10, OR 2,36) 15 -21 Tage in Malaria-Endemiegebieten auf. Warum nur relativ wenige (n = 2, OR 0,3) Reisende mit einem Aufenthalt von 22 -29 Tage serokonvertierten ist unklar. Ein Faktor könnte sein, dass sich ein signifikant höherer Prozentsatz der Reisenden in Niedrigrisikogebieten (35%) 22 -29 Tage aufhielt, verglichen mit 29% der Afrikareisenden (p = 0,017). Auch die durchschnittliche Reisezeit derjenigen, die sich in „anderen Reisezielen“ aufhielt war mit 19 Tagen etwas länger als der

Durchschnittswert von 18 Tagen. Dies könnte erklären warum die Reisedauer der Serokonverter mit durchschnittlich 17 Tagen leicht unter der Vergleichsgruppe lag. Insgesamt gesehen war die Reisezeit in dieser Studie deutlich kürzer als in den vorhergegangenen Studien bei Reisenden, wodurch sich unter Umständen die geringere Infektionsrate erklären lässt: 28 Tage: (Jelinek, Löscher et al. 1996) – 30 Tage: (Cobelens, Verhave et al. 1998) und 32 Tage (Jelinek, Bluml et al. 1998)).

Im Bezug auf die geschlechterspezifische Verteilung der Serokonverter, ergaben sich deutliche Unterschiede. So waren 13 der 18 Serokonverter (72%) männlich. Das ergibt eine OR von 2,32 ($p = 0,15$) im Vergleich zu den weiblichen Reisenden. Der hohe Anteil von männlichen Reisenden die sich mit *Plasmodium falciparum* infizierten könnte sich durch ein unterschiedliches Verhalten während der nächtlichen Transmissionszeit einerseits und einer geringeren Compliance männlicher Reisender bzgl. der Expositionsprophylaxe andererseits erklären. Die daraus resultierende erhöhte Exposition gegenüber dem Vektor führt zu einem höheren Infektionsrisiko, was sich anhand der Serokonversionsraten in dieser Studie nachvollziehen lässt. Eine ähnliche Verteilung wurde sowohl in anderen Studien, (Kriechbaum and Baker 1996; Muehlberger, Jelinek et al. 1998; Schlagenhaut, Chen et al. 2010) als auch bei den nach Deutschland importierten Malariaerkrankungen beobachtet (RKI 2009). Jedoch vermutete man bisher auch, dass deutlich mehr Männer als Frauen in Malariagebiete reisen, was in dieser Studie nicht so ausgeprägt der Fall war (53% männliche Studienteilnehmer vs. 47% weibliche Studienteilnehmer).

Während das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer bei 34,5 Jahre lag (Median 31; Range 5 -80), war das Durchschnittsalter der Serokonverter mit 31 Jahren (Median 25; Range 8-72 Jahren) etwas niedriger. Reisende im Alter von 18 -30 Jahren wiesen das höchste Infektionsrisiko auf, 11 von 18 Serokonvertern waren in dieser Altersgruppe (OR 2,04; $p = 0,16$). Auch dies korreliert gut mit den Meldedaten des Robert-Koch Instituts. In Deutschland erkrankten insbesondere Erwachsene im Alter von 25 -39 Jahren an Malaria (RKI 2009). Ursächlich für das erhöhte Risiko in dieser Altersgruppe dürften auch hier ein unterschiedliches Reise- und Präventionsverhalten sein. Bemerkenswert ist, dass sowohl ein 8-jähriges

Kind, als auch ein 72-jähriger Mann und eine 64-jähriger Frau unter den Serokonvertern waren. Beide Altersextreme haben bei einer Malaria tropica Erkrankung ein erhöhtes Risiko für einen komplizierten Verlauf (Muhlberger, Jelinek et al. 2003) (Hagmann, Neugebauer et al. 2010).

5.4 Schlussfolgerung

Bei 66 der 1.903 Reisenden (3,5%) konnten 28 Tage nach der Rückkehr aus Malariaendemiegebieten positive CSP-AK-Titer nachgewiesen werden. Eine Serokonversion lag bei 18 Reisenden (0,95%) vor. Vergleicht man die Anzahl der Serokonverter mit den Daten anderer Studien, so zeigt sich eine teilweise deutlich niedrigere Rate an positiven Seren. Dies ist einerseits damit zu erklären, dass es sich bei den anderen Arbeiten z.T. um retrospektive Studien handelte, und daher unklar ist wie viele Studienteilnehmer bereits vor Abreise über positive Antikörper-Titer verfügten. Andererseits war die Reisedauer in dieser Studie mit durchschnittlich 18 Tagen deutlich kürzer als in den früheren Arbeiten.

Diese Arbeit machte damit erneut deutlich, wie wichtig es ist bereits vor Abreise Serumproben zu gewinnen, um das tatsächliche Infektionsrisiko bestimmen zu können.

Die teilweise sehr kurze Aufenthaltsdauer (142 Reisende < 7 Tage) und die große Varianz bzgl. der Reisedauer (2 -38 Tage) sind nicht optimal gewählt, um das Infektionsrisiko zu bestimmen und zu vergleichen. Auch die Tatsache, dass für 410 Teilnehmer als Destination nur „Andere Reiseziele“ bekannt ist, erlaubt hier nur bedingt Rückschlüsse. Da die Serumproben jedoch aus zwei internationalen Multi-Center-Studien stammten, deren primäres Endziel es war, die Nebenwirkungen unterschiedlicher Malariachemoprophylaxe-Präparate zu vergleichen, konnte auf das Studiendesign kein Einfluss genommen werden.

Berechnet man das Infektionsrisiko für einen Aufenthalt von einem Monat in den jeweiligen Endemiegebieten, so ergibt sich das höchste Risiko für Aufenthalte in Westafrika (2,46%), gefolgt von Ostafrika (1,81%) und dem Südlichen Afrika (1,51%). Zu berücksichtigen ist hierbei dass CSP-AK-ELISA's, wie auch der hier verwendete Test, nur über eine begrenzte Sensitivität verfügen und dass daher das tatsächliche Infektionsrisiko um ca. 30% höher liegen dürfte.

Serokonversionsraten von deutlich über 1% pro Monat unterstreichen die Wichtigkeit einer regelmäßigen Malariachemoprophylaxe bei Reisen in diese Regionen. Das Risiko an einer potentiell letal verlaufenden Malaria tropica zu erkranken.

ken ist in den Endemiegebieten Afrikas deutlich höher als das Risiko von schweren, durch Chemoprophylaxe verursachten, Nebenwirkungen.

Die Tatsache, dass keiner der 149 Südamerika-Reisenden serokonvertierte, bestätigte die aktuellen Prophylaxe-Empfehlungen, die für die meisten Gebiete neben einer Expositionsprophylaxe die Mitnahme eines Notfallmedikamentes befürworten, jedoch keine kontinuierliche Chemoprophylaxe.

Rückschlüsse für die Region Zentralafrika lassen sich aufgrund der sehr geringen Anzahl an Reisenden ($n = 56$) und Personenmonate ($PM = 36$) nicht ziehen. Obwohl keiner der Reisenden in diese Region serokonvertierte, ist von einem substantiellen Risiko auszugehen.

Über die Destination „Andere Reiseziele“ (1,15%) kann aufgrund der sehr heterogenen Regionen, die hier zusammengefasst sind, nur bedingt eine Aussage getroffen werden. Zwar ist das Risiko mit einer OR von 0,73 im Vergleich zu den anderen Destinationen gering, jedoch dürfte das tatsächliche Infektionsrisiko in den meisten Regionen Asiens und Mittelamerikas deutlich unter den ermittelten 1,15% liegen, während es für Papua-Neuguinea oder die Salomonen deutlich höher liegen dürfte. Wo sich die drei Serokonverter, von denen als Destination „Andere Reiseziele“ bekannt ist, genau aufgehalten haben ist nicht bekannt.

Bezüglich der demographischen Daten waren ein deutlich höherer Anteil der Serokonverter männlichen Geschlechts (72% OR:2,32) und gehörte der Altersgruppe von 18-30 Jahren an (OR: 2,04). Interessant ist hierbei, dass die Geschlechterverteilung bei den Studienteilnehmern insgesamt fast ausgewogen war (Männer: Frauen - 53%:44%) und in das Hochrisikogebiet Westafrika sogar mehr Frauen (53%) als Männer (47%) reisten. Dass mehr männliche als weibliche Reisende an Malaria erkranken ist bekannt, jedoch ging man bisher davon aus, dass Männer häufiger in Hochrisikoregionen reisen, was in dieser Studie nicht belegt werden konnte. Ursächlich für das erhöhte Risiko könnten ein unterschiedliches Präventionsverhalten und verschiedene Aktivitäten während der nächtlichen Transmissionszeit sein.

Zusammenfassend betrachtet korrelieren die in dieser Studie erhobenen Daten betreffend der geographischen Verteilung der Infektionsgebiete, die für die jeweilige Region berechnete Infektionsrate, sowie Alter und Geschlecht der Infizierten sehr gut mit den epidemiologischen Daten hinsichtlich des Malariarisikos für nicht-immune Reisende überein.

Diese Arbeit zum Nachweis der Prävalenz von CSP-Antikörpern ist im Bezug auf die Studienpopulation die bisher größte prospektive Studie bei nicht-immunen Reisenden.

Aufgrund der im Vergleich zur Gesamtpopulation doch geringen Rate von Serokonvertern, erfüllt die Studie trotz gewählter Studienpopulation von 1.903 Teilnehmern nicht die Signifikanzkriterien. Um bei der festgestellten Infektionsrate und einem vorausgesetzten Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ und einer Teststärke (Power) von 80% die Signifikanzkriterien zu erfüllen, bedürfte es einer Studienpopulation von mehr als 5.000 Teilnehmern.

Diese Studie hat aber gezeigt, dass der Nachweis von Circumsporozoiten-Antikörper mittels eines NANP19-ELISA-Tests ein zuverlässiger serologischer Marker für den Nachweis des Malaria-Infektionsrisikos von nicht-immunen Reisenden darstellt, unabhängig ob es dabei zu einer klinisch manifesten Malaria kommt.

Diese Methodik kann helfen das Risiko in verschiedenen geographischen Regionen zu determinieren. So kann eine Einschätzung für die Notwendigkeit von Malariachemoprophylaxe in bestimmten Regionen gegeben werden.

Dieser NANP19-ELISA Test wurde in den folgenden Jahren in zwei Studien eingesetzt um das jeweilige Malaria-Infektionsrisiko abzuschätzen.

In einer Studie wurde die Malaria Inzidenz auf der der Insel Santiago, Republik Kap Verde nachgewiesen (Alves, Roque et al. 2006). Hierzu wurden unter anderem NANP19-Antikörper bei asymptomatischen Einheimischen, bzw. bei Perso-

nen mit zurückliegender Fieberanamnese nachgewiesen. Bei ca. 8% der Seroproben konnten Antikörper nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie wurde der Test eingesetzt um das Malariarisiko von japanischen Blauhelmsoldaten, die unter Chemoprophylaxe für 6 Monate in Ost-Timor im Einsatz waren abzuschätzen (Fujii, Kaku et al. 2007). Bei 3,1% der 1.876 Soldaten konnte nach Rückkehr eine Serokonversion nachgewiesen werden.

Der NANP19-ELISA-Test wurde bisher nicht mehr zum Nachweis von Malaria-Infektionen bei nichtimmunen Reisenden eingesetzt.

Um eine signifikante Aussage mit Hilfe des NANP19-Tests bezüglich des Malariarisikos von Reisenden stellen zu können wäre eine sehr große Studienpopulation notwendig. Dass für die Durchführung des Tests gepaarte Serumproben vor der Abreise und nach der Rückkehr, benötigt werden erhöht den Aufwand noch weiter.

Da sich die in dieser Studie gewonnen Daten, bzgl. des Infektionsrisikos doch relativ gut mit den Meldedaten der nach Deutschland importierten Malariaerkrankungen decken, wurde auf die Durchführung weiterer Studien verzichtet.

6 Zusammenfassung

Malaria tropica ist aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten. Reisen in tropische Länder gewinnen weiterhin an Beliebtheit, hierbei setzen sich Reisende dem Risiko von tropenspezifischen Erkrankungen aus. Insbesondere die Malaria nimmt hierbei aufgrund des potentiell gefährlichen Krankheitsverlaufes und der Inzidenz von importierten Erkrankungen nach Deutschland eine herausragende Stellung ein. Das Risiko sich mit Malaria zu infizieren unterscheidet sich beim Reisenden im Vergleich zur einheimischen Bevölkerung aufgrund von verschiedenen Faktoren deutlich.

Kommt es nach einem Stich der weiblichen Anophelesmücke zu einer Infektion mit Sporozoiten von *Plasmodium falciparum* so löst dies in der Mehrzahl der Fälle eine Immunantwort aus, die spezies- und stadienspezifisch ist. Hierbei binden Antikörper an das immunodominante Circumsporozoiten-Oberflächenprotein (CSP). Dieses Protein besteht zu einem wesentlichen Teil aus repetitiven Tandems der Aminosäuren Asparagin-Alanin-Asparagin-Prolin (NANP). Mit Hilfe von Antikörpern gegen CSP bzw. gegen NANP-Peptide kann eine Malaria-Infektion unabhängig von der klinischen Erkrankung nachgewiesen werden.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand im Aufbau eines CSP-Antikörper-ELISA-Tests mit Hilfe von synthetischen NANP-Peptiden als Antigen. Hierzu wurden Versuchsreihen mit drei unterschiedlich langen Peptiden (NANP5, NANP19 und NANP50) durchgeführt. Im Vergleich zu dem kürzeren NANP5 zeigten NANP19 und 50 in allen Beschichtungskonzentrationen deutlich höhere Extinktionswerte und eine bessere Diskriminierung von negativ und positiv zu wertenden Testergebnissen. Das in dieser Arbeit verwendete NANP19-Antigen führte zu vergleichbaren Extinktionswerten wie das längere NANP50-Antigen, zeichnet sich aber durch einfachere und kostengünstigere Herstellung aus.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der so erstellte NANP19-AK-ELISA bezüglich Sensitivität und Spezifität evaluiert. Hierzu wurden Serumproben von 118 nicht-immunen Reisenden mit nachgewiesener Malaria tropica Infektion, 118 Patienten mit anderen tropenspezifischen Erkrankungen, bzw. mit positiven Rheumafaktor

und von 117 Personen, die sich noch nie in Malaria-Endemiegebieten aufgehalten haben, untersucht. Hierbei zeigten sich eine sehr gute Spezifität von 99,15%, eine zufriedenstellende Sensitivität von insgesamt 68% und eine relativ geringe Kreuzreaktivität mit *Plasmodium vivax* Infektionen von 9%. Die Sensitivität dieses Testverfahrens ist dabei abhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme. Während die Sensitivität bei früher Blutentnahme (0 -10 Tage nach Symptombeginn) nur bei 58% lag, erhöhte sie sich bei später Blutentnahme (11 -90 Tage nach Symptombeginn) auf 78%. Die im Vergleich mit anderen serologischen Testverfahren relativ geringe Sensitivität ist bereits in anderen Studien vorbeschrieben und lässt sich am ehesten durch den geringen und sehr kurzen Kontakt des Immunsystems mit CSP erklären. Da sich jedoch aus dem Testergebnis keine therapeutische Konsequenzen ergeben, sondern die Resultate zur Abschätzung des Infektionsrisikos dienen, ist die erzielte Sensitivität durchaus zufriedenstellend und in Anbetracht der hohen Spezifität für epidemiologische Untersuchungen geeignet..

Abschließend wurde die Prävalenz von CSP-Antikörpern bei Serumpaaren von 1.903 Reisenden vor und nach ihrem Aufenthalt in Malariaendemiegebieten getestet. Bei 66 Reisenden (3,5%) konnten positive NANP19-AK-Titer nachgewiesen werden, jedoch lag nur bei 18 Serumpaaren (0,95%) eine tatsächliche Serokonversion vor. Hochgerechnet auf eine Aufenthaltsdauer von einem Monat ergibt dies ein allgemeines Infektionsrisiko von 1,58%. Regional war das Risiko am höchsten in Westafrika (2,46%), gefolgt von Ostafrika (1,81%), dem südlichen Afrika (1,51%) und „anderen Reisezielen“ (1,15%). Keiner der Reisenden nach Südamerika bzw. Zentralafrika serokonvertierte. Aufgrund der eingeschränkten Sensitivität, ist das tatsächliche Infektionsrisiko wahrscheinlich um ca. 30% höher. Männer hatten im Vergleich zu Frauen ein höheres Infektionsrisiko (OR: 2,32).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Nachweis von Circumsporozoitenprotein-Antikörpern mittels eines NANP19-ELISA-Tests ein zuverlässiger serologischer Marker für das Malaria-Infektionsrisiko von nicht-immunen Reisenden ist. Die Ergebnisse zur Prävalenz von CS-Antikörpern spie-

geln die epidemiologischen Daten von importierter Malaria gut wider und bestätigen die aktuellen Malaria-Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit.

7 Abkürzungen

AK	Antikörper
AKE	Antikörpereinheiten
BE	Blutentnahme
C	Celsius
CI	Confidence Interval
CSP	Circumsporozoitenprotein
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und International Gesundheit e.V.
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IgG	Immunglobulin G
IKP	Inkubationspuffer
NANP	Asparagin-Alanin-Asparagin-Prolin
OR	Odds Ratio
P.	Plasmodium
PBS	Phosphate buffered saline
PM	Personenmonate
RKI	Robert-Koch Institut
U	Unit = Einheiten
WHO	World Health Organization

8 Literatur

Aikawa, M., M. Iseki, et al. (1990). "The pathology of human cerebral malaria." Am J Trop Med Hyg **43**(2 Pt 2): 30-37.

Alves, J., A.L. Roque, et al. (2006). "Epidemiological characterization of *Plasmodium falciparum* in the Republic of Cabo Verde: implications for potential large-scale re-emergence of malaria." MalarJ **21** **5:32**.

Ballou, W. R., J. Rothbard, et al. (1985). "Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*." Science **228**(4702): 996-999.

Barnwell, J. W., Galinski, M.R. (1998). Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. Washington, ASM Press: 93-112.

Behrens, R. H., B. Carroll, et al. (2007). "The low and declining risk of malaria in travellers to Latin America: is there still an indication for chemoprophylaxis?" Malar J **6**: 114.

Bejon, P., J. Lusingu, et al. (2008). "Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age." N Engl J Med **359**(24): 2521-2532.

Bwire, R., E. J. Sloodman, et al. (1998). "Malaria anticircumsporozoite antibodies in Dutch soldiers returning from sub-Saharan Africa." Trop Med Int Health **3**(1): 66-69.

Campbell, G. H., A. D. Brandling-Bennett, et al. (1987). "Detection of antibodies in human sera to the repeating epitope of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* using the synthetic peptide (NANP)₃ in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." Am J Trop Med Hyg **37**(1): 17-21.

Cobelens, F. G., J. P. Verhave, et al. (1998). "Testing for anti-circumsporozoite and anti-blood-stage antibodies for epidemiologic assessment of *Plasmodium falciparum* infection in travelers." Am J Trop Med Hyg **58**(1): 75-80.

Cochrane, A. (1980). Immunization against sporozoites. Malaria. New York, Academic Press: 163-202.

Croft, A. M. and M. J. World (1996). "Neuropsychiatric reactions with mefloquine chemoprophylaxis." Lancet **347**(8997): 326.

Dame, J. B., J. L. Williams, et al. (1984). "Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Science **225**(4662): 593-599.

Del Giudice, G., S. Biro, et al. (1986). "Detection of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites by employing synthetic peptides." Parassitologia **28**(2-3): 107-111.

Del Giudice, G., A. Douglas, et al. (1989). "Comparative analysis of ELISAs employing repetitive peptides to detect antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites." Bull World Health Organ **67**(5): 515-523.

Del Giudice, G., H. D. Engers, et al. (1987). "Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children." Am J Trop Med Hyg **36**(2): 203-212.

Del Giudice, G., P. H. Lambert, et al. (1990). "Antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites in areas with stable and unstable malaria." Bull World Health Organ **68 Suppl**: 191-196.

Dobeli, H., H. Andres, et al. (1998). "Recombinant fusion proteins for the industrial production of disulfide bridge containing peptides: purification, oxidation without concatamer formation, and selective cleavage." Protein Expr Purif **12**(3): 404-414.

Druilhe, P., O. Pradier, et al. (1986). "Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection." Infect Immun **53**(2): 393-397.

DTG (2010). Empfehlungen zur Malariavorbeugung. München, Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V.

Esposito, F., P. Fabrizi, et al. (1990). "Evaluation of an ELISA kit for epidemiological detection of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites in human sera and bloodspot eluates." Acta Trop **47**(1): 1-10.

Esposito, F., S. Lombardi, et al. (1986). "Immunity to *Plasmodium* sporozoites: recent advances and applications to field research." Parassitologia **28**(2-3): 101-105.

Esposito, F., S. Lombardi, et al. (1988). "Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their

relationship to resistance against malaria infection." Trans R Soc Trop Med Hyg **82**(6): 827-832.

Felgner, P (1978). "Antibody activity in stick-ELISA as compared to other quantitative immunological tests in sera of echinococcosis cases." Tropenmed Parasitol. **(4)**:417-22.

Fujii, T., K. Kaku, et al. (2007). " Malaria and mefloquine prophylaxis use among Japan Ground Self-Defense Force personnel deployed in East Timor." J Travel Med. **14**(4):226-32.

Garcia, J. E., A. Puentes, et al. (2006). "Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria: implications for vaccine design." Clin Microbiol Rev **19**(4): 686-707.

Greenwood, B. and T. Mutabingwa (2002). "Malaria in 2002." Nature **415**(6872): 670-672.

Hagmann, S., R. Neugebauer, et al. (2010). "Illness in children after international travel: analysis from the GeoSentinel Surveillance Network." Pediatrics **125**(5): e1072-1080.

Hatz, C. and H. Nothdurft (2006). "[Malaria protection for short-term travelers]." Internist (Berl) **47**(8): 810-812, 814-817.

Hoffman, S. L., R. Wistar, Jr., et al. (1986). "Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum." N Engl J Med **315**(10): 601-606.

Hogh, B., P. D. Clarke, et al. (2000). "Atovaquone-proguanil versus chloroquine-proguanil for malaria prophylaxis in non-immune travellers: a randomised, double-blind study. Malarone International Study Team." Lancet **356**(9245): 1888-1894.

Jelinek, T., A. Bluml, et al. (1998). "Assessing the incidence of infection with Plasmodium falciparum among international travelers." Am J Trop Med Hyg **59**(1): 35-37.

Jelinek, T., T. Löscher, et al. (1996). "High prevalence of antibodies against circumsporozoite antigen of Plasmodium falciparum without development of symptomatic malaria in travelers returning from sub-Saharan Africa." J Infect Dis **174**(6): 1376-1379.

Jelinek, T., H. D. Nothdurft, et al. (1995). "Evaluation of circumsporozoite antibody testing as a sero-epidemiological tool for the detection of Plasmodium falciparum infection in non-immune travelers." Trop Med Parasitol **46**(3): 154-157.

Jelinek, T., C. Schulte, et al. (2002). "Imported Falciparum malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases." Clin Infect Dis **34**(5): 572-576.

Knobloch, J. (1996). Tropen- und Reisemedizin, Gustav Fischer Verlag, Jena

Knobloch, J. (2003). Parasitologie und Epidemiologie. Malaria Grundlagen und klinische Praxis. Bremen, Uni-Med: 14-19.

Kriechbaum, A. J. and M. G. Baker (1996). "The epidemiology of imported malaria in New Zealand 1980-92." N Z Med J **109**(1032): 405-407.

Löscher, T. (2010:554-594). Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Georg-Thieme Verlag.

Macpherson D, G. K., Tessier D, Keystone J, Streiner D (1997). Mefloquine tolerance: a randomized, double-blinded, placebo-controlled study using a loading dose of mefloquine in pre-exposed travellers. . Fifth International Conference on Travel Medicine, Geneva.

Mendis, C., G. Del Giudice, et al. (1992). "Anti-circumsporozoite protein antibodies measure age related exposure to malaria in Kataragama, Sri Lanka." Parasite Immunol **14**(1): 75-86.

Muehlberger, N., T. Jelinek, et al. (1998). "Effectiveness of chemoprophylaxis and other determinants of malaria in travellers to Kenya." Trop Med Int Health **3**(5): 357-363.

Muehlberger, N., T. Jelinek, et al. (2003). "Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of falciparum malaria in European patients: observations from TropNetEurop and SIMPID Surveillance Data." Clin Infect Dis **36**(8): 990-995.

Nardin, E. H., R. S. Nussenzweig, et al. (1979). "Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria." Science **206**(4418): 597-599.

Nothdurft, H. D., T. Jelinek, et al. (1999). "Seroconversion to circumsporozoite antigen of Plasmodium falciparum demonstrates a high risk of malaria transmission in travelers to East Africa." Clin Infect Dis **28**(3): 641-642.

Nussenzweig, V. and R. S. Nussenzweig (1985). "Circumsporozoite proteins of malaria parasites." Cell **42**(2): 401-403.

Overbosch, D., H. Schilthuis, et al. (2001). "Atovaquone-proguanil versus mefloquine for malaria prophylaxis in nonimmune travelers: results from a randomized, double-blind study." Clin Infect Dis **33**(7): 1015-1021.

Phillips-Howard, P. A., A. Radalowicz, et al. (1990). "Risk of malaria in British residents returning from malarious areas." BMJ **300**(6723): 499-503.

RKI (2009). "Reiseassoziierte Infektionserkrankungen 2008." Epidemiologisches Bulletin: 39/385-389.

Schlagenhauf, P., L. H. Chen, et al. (2010). "Sex and gender differences in travel-associated disease." Clin Infect Dis **50**(6): 826-832.

Scholander, C., C. J. Treutiger, et al. (1996). "Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes." Nat Med **2**(2): 204-208.

Sinden, R. G., HM (2002). The malaria parasite. Essential Malariology. New York, Arnold: 9-34.

Snow, R. W., C. A. Guerra, et al. (2005). "The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria." Nature **434**(7030): 214-217.

Snow, R. W., F. C. Shenton, et al. (1989). "Sporozoite antibodies and malaria in children in a rural area of The Gambia." Ann Trop Med Parasitol **83**(6): 559-568.

Steffen, R., E. Fuchs, et al. (1993). "Mefloquine compared with other malaria chemoprophylactic regimens in tourists visiting east Africa." Lancet **341**(8856): 1299-1303.

United Nations World Tourism Organization (2007). Tourism 2020 Vision.

Wahlgren, M., V. Fernandez, et al. (1994). "Rosetting." Parasitol Today **10**(2): 73-79.

Warell, D. (2002). Clinical features of malaria. Essential Malariology. Oxford, Arnold: 191-205.

Webster, H. K., E. F. Boudreau, et al. (1987). "Development of immunity in natural Plasmodium falciparum malaria: antibodies to the falciparum sporozoite vaccine 1 antigen (R32tet32)." J Clin Microbiol **25**(6): 1002-1008.

White, N. J. (2008). "Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite." Clin Infect Dis **46**(2): 172-173.

WHO (2000). "Severe and complicated malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg: 94 (Suppl. 91): 91-90.

WHO (2009). "World Malaria Report 2009." 27-28.

Young, J. F., W. T. Hockmeyer, et al. (1985). "Expression of Plasmodium falciparum circumsporozoite proteins in Escherichia coli for potential use in a human malaria vaccine." Science **228**(4702): 958-962.

Zavala, F., R. W. Gwadz, et al. (1982). "Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes." Nature **299**(5885): 737-738.

Zavala, F., A. Masuda, et al. (1985). "Ubiquity of the repetitive epitope of the CS protein in different isolates of human malaria parasites." J Immunol **135**(4): 2790-2793.

Zavala, F., J. P. Tam, et al. (1985). "Rationale for development of a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria." Science **228**(4706): 1436-1440.

Zavala, F., J. P. Tam, et al. (1986). "Synthetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to Plasmodium falciparum sporozoites." J Immunol Methods **93**(1): 55-61.

9 Danksagung

Herrn Professor Dr.med. Thomas Löscher danke ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.med. Tomas Jelinek für die wissenschaftliche Betreuung bei der Fertigstellung dieser Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Danken möchte ich außerdem den Angestellten des Tropeninstituts München und des Schweizerischen Tropen- und Public Health Institut, Basel für ihre hilfreiche Unterstützung.

Frau Gaby Peyerl-Hoffmann danke ich besonders für die eingehende Unterstützung beim Erlernen der methodischen Prozesse.

Dem Boehringer-Ingelheim Fonds bin ich zu Dank verpflichtet, durch dessen finanzielle Unterstützung mir das Arbeitspraktikum am Tropeninstitut in Basel ermöglicht wurde.

Ich danke meinen Eltern, die mein Studium und die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.