

**Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Leiter:

Professor Dr. med. Thomas Löscher

**Molekulare Marker zur Resistenzdiagnostik und Charakterisierung
der Parasiten-Wirts-Interaktion am Beispiel von importierten
Plasmodium falciparum Infektionen in Europa**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Wilhelm

aus

Augsburg

April 2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind zur Publikation eingereicht:

Jelinek T, Peyerl-Hoffmann G, Muhlberger N, Wichmann O, Wilhelm M, Schmider N, Grobusch MP, Von Sonnenburg F, Gascon J, Laferl H, Hatz C, Alifrangis M, Burchard G, McWhinney P, Schulze M, Kollaritsch H, Da Cunha S, Beran J, Kern P, Gjørup I, Cuadros J. Molecular surveillance of drug resistance through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *Malar J* 2002,1: 11.

M. Wilhelm, T. Jelinek, S. Dittrich, M.P. Grobusch, T. Weitzel, T. Zoller, J. Gascon, A. Matteelli, H. Laferl, C. Hatz, J. Cuadros, G. Burchard, J. Beran, P. McWhinney, H. Kollaritsch, S. da Cunha, M.H. Schulze, P. Kern, I. Gjørup, - for the TropNetEurop and SIMPID Surveillance Networks. Erythrocyte binding antigen (EBA 175) of *Plasmodium falciparum*: Distribution of polymorphisms in African countries. *Trop Med Int Health submitted*

M. Wilhelm, T. Jelinek, G. Peyerl-Hoffmann, M.P. Grobusch, T. Weitzel, T. Zoller, J. Gascon, A. Matteelli, H. Laferl, C. Hatz, J. Cuadros, G. Burchard, J. Beran, P. McWhinney, H. Kollaritsch, S. da Cunha, M.H. Schulze, P. Kern, I. Gjørup, - for the TropNetEurop and SIMPID Surveillance Networks. Polymorphism and distribution of allelic families in two merozoite surface proteins (MSP1 and 2) through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *Malar J submitted*

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	7
1.1	Geschichte und Verbreitung der Malaria	7
1.2	Taxonomie	9
1.2.1	Der Vektor.....	9
1.2.2	Der Parasit: Die humanpathogenen <i>Plasmodien</i>	9
1.2.3	Der Zyklus der Malariaparasiten im Wirtsorganismus	11
1.3	Semiimmunität.....	14
1.3.1	Angeborene Semiimmunität	14
1.3.2	Erworbene Semiimmunität.....	15
1.4	Behandlung der Malaria.....	16
1.5	Wirkmechanismus der Chemotherapeutika.....	18
1.5.1	Chinoline	18
1.5.2	Antifolate	19
1.5.3	Antibiotika	20
1.5.4	Artemisinin und Derivate.....	20
1.5.5	Atovaquon.....	21
1.6	Resistenz	21
1.6.1	Definition	22
1.6.2	Ursachen der Resistenzentwicklung.....	23
1.6.3	Geographische Verbreitung von Resistenzen gegen Antimalariamittel.....	25
1.6.4	Genetischer Hintergrund der Medikamentenresistenz bei <i>Plasmodium falciparum</i>	27
1.7	Merozoiten Oberflächen Proteine (MSP1 und 2)	29
1.7.1	MSP1	30
1.7.2	MSP2	31
1.8	Erythrozyten-bindendes Antigen (EBA-175).....	31
2	Problemstellung und Zielsetzung	34
3	Proben	36
3.1	TropNetEurop	36
3.1.1	Aufbau und Ziele	36
3.1.2	Meldewesen.....	37
3.2	Patientenkollektiv.....	37
3.3	Gewinnung und Transport	38
4	Material und Methoden	39
4.1	Nukleotide	39
4.2	Enzyme	41

4.3	Chemikalien	42
4.4	Geräte und Software	44
4.5	Molekularbiologische Methoden	45
4.5.1	DNA-Extraktion.....	45
4.5.2	Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
4.5.3	Einführung in die RFLP-Technik	47
4.5.4	Produktanalyse.....	48
4.5.5	Maßnahmen zur Sicherstellung der Ergebnistreue.....	48
4.5.6	Statistische Methoden und Datenanalyse	49
4.5.7	<i>Plasmodium falciparum</i> –Stämme	49
4.6	Einsatz der PCR im Rahmen populationsgenetischer Untersuchungen.....	50
4.6.1	Nachweis der Spezies <i>Plasmodium falciparum</i>	50
4.6.2	Nachweis von EBA-175	51
4.6.3	Genotypisierung von MSP1 und 2 Allelfamilien	52
4.7	PCR und RFLP Standardmethoden zum Nachweis von Medikamentenresistenz bei <i>Plasmodium falciparum</i>	55
4.7.1	Polymorphismen in der DHFR und DHPS Gensequenz.....	55
4.7.2	DHFR-Gen (Codon 51, 59, 108)	58
4.7.3	DHPS-Gen (Codon 436, 437, 540, 581, 613)	63
4.7.4	Pfcr-Gen.....	70
4.7.5	Pfmdr-Gen (Codon 86, 1042 und 1264)	71
4.7.6	Cytochrom - b - Gen.....	73
4.8	Reaktionsansätze mit Amplifikationsbedingungen für Polymerase-Kettenreaktion und RFLP- Methoden	75
4.8.1	<i>Plasmodien</i> Spezies Bestimmung durch PCR	75
4.8.2	Genotypisierung der MSP 1 und 2 Gene durch PCR	76
4.8.3	Nachweis von Mutationen auf dem DHFR-Gen (PCR und RFLP).....	76
4.8.4	Nachweis von Mutationen auf dem DHPS-Gen (PCR und RFLP).....	78
4.8.5	Punktmutation auf dem Pfcr-Gen mit PCR und anschließendem Enzymverdau.....	78
4.8.6	Nachweis einer Punktmutation auf dem Pfmdr-Gen durch PCR und RFLP-Technik	80
4.8.7	Nachweis einer Mutation auf Codon 286 des Cytochrom-b Gen von <i>P. falciparum</i>	82
5	Ergebnisse.....	84
5.1	Nachweis der <i>Plasmodien</i> Spezies	84
5.2	Patientenkollektiv und Daten von TropNetEurop	84
5.3	Verteilungsstudie der importierten <i>Plasmodium falciparum</i> Infektionen	89
5.3.1	Geographische Verteilung der importierten Infektionen	89

5.3.2	Prävalenz von EBA-175.....	90
5.3.3	Prävalenz von MSP1/2	91
5.3.4	Multiplizität von MSP1 und MSP2	91
5.4	Importierte <i>Plasmodium falciparum</i> Malaria aus Afrika.....	92
5.4.1	Prävalenz von EBA-175 in Afrika	92
5.4.2	Prävalenz der Merozoiten-Oberflächen Proteine 1 und 2	94
5.4.3	Polymorphismen in der DHFR und DHPS Gensequenz.....	97
5.4.3.1	DHFR-Codon 51.....	97
5.4.3.2	DHFR-Codon 59.....	97
5.4.3.3	DHFR-Codon 108.....	98
5.4.3.4	DHPS-Codon 436.....	99
5.4.3.5	DHPS-Codon 437.....	100
5.4.3.6	DHPS-Codon 540.....	101
5.4.3.7	DHPS-Codon 581.....	101
5.4.3.8	DHPS-Codon 613.....	102
5.4.4	Polymorphismus auf Codon 76 des Pfcrt-Gens	102
5.4.5	Polymorphismen auf dem Pfmdr-Gen.....	103
5.4.5.1	Codon 86	103
5.4.5.2	Codon 1042 und 1246	104
5.5	Mutationsanalyse an Codon 268 des Cytochrom-b Gen	105
5.5.1	Sensitivität der PCR sowie des Enzymverdau	105
5.5.2	Prävalenz des Codon 268 Polymorphismus.....	105
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Resistenzuntersuchung in Afrika	106
5.6.1	DHFR-Gen.....	106
5.6.2	DHPS-Gen.....	107
5.6.3	Pfcrt und Pfmdr-Gen	108
5.6.4	Kombinationen der Einzelmutationen	108
5.7	Assoziation verschiedener molekularer Marker mit dem Verlauf einer importierten Malariainfektion.....	110
5.7.1	Komplizierte Fälle versus unkomplizierte Verläufe	110
5.7.2	Malariainfektionen von Immigranten versus importierte Infektionen durch Europäer	115
6	Diskussion.....	119
6.1	Patientendaten.....	119
6.2	Verteilungsfrequenz der EBA-175 Fragmente in Isolaten aus Afrika.....	120
6.3	Prävalenz und Multiplizität von MSP1 und MSP2 Allelfamilien	122

6.4	Polymorphismen molekularer Marker zum Nachweis von Medikamentenresistenz bei importierten <i>P. falciparum</i> Infektionen.....	124
6.4.1	Resistenz gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin	125
6.4.2	Resistenz gegen Chloroquin	129
6.4.3	Resistenz gegen Atovaquon.....	133
6.5	Identifikation von Assoziationen zwischen molekularen Markern und klinischen Parametern anhand von importierten <i>P. falciparum</i> Infektionen	135
6.5.1	Vergleich zwischen semiimmunen und nichtimmunen Individuen innerhalb eines Endemiegebietes	135
6.5.2	Assoziation zwischen dem klinischen Verlauf der Malaria tropica anhand von Patientendaten und molekularen Markern des Parasiten	137
7	Zusammenfassung.....	140
8	Literaturverzeichnis	144
9	Abkürzungen.....	161
10	Abbildungsverzeichnis.....	162
11	Standardisierter TropNetEurop Fragebogen	165
12	Danksagung	166
13	Curriculum vitae	167

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Verbreitung der Malaria

Die Malaria ist eine der ältesten Infektionskrankheiten der Menschheit. Im indischen, chinesischen und ägyptischen Schrifttum sind periodische Malariafieber schon aus der Zeit 2700 v.Chr. dokumentiert. Hippokrates (460 bis 370 v.Chr.) kennt sowohl verschiedene Formen der Malaria wie tägliches, Dreitages- und Viertagesfieber, als auch die Assoziation mit Feuchtigkeitsgebieten, was sich später in der Krankheitsbezeichnung niedergeschlagen hat. „Mala aria“ (ital. „schlechte Luft „) oder auch „Sumpffieber“ waren die synonym verwandten Namen, welche die Zusammenhänge zwischen der Erkrankung und „schlechter Luft“ in den Sumpfgebieten vieler Städte, wie damals z.B. um Rom zeigten. So vermutete man in diesen Gebieten schon früher die Ursache der Krankheit, was sich Jahrhunderte später durch differenziertes Wissen über den Vektor und die Erkrankung bewahrheitete [47].

1880 gelang dem französischen Militärchirurg Alphonse Laveran (1845-1922) die Erstbeschreibung des Lebenszyklus des Malariaerregers. Er entdeckte erstmalig *Plasmodien* in den roten Blutkörperchen erkrankter französischer Soldaten.

Ende des 19. Jahrhunderts wurde durch den, in Indien geborenen britischen Arzt Ronald Ross (1857-1932) der Nachweis erbracht, daß Mücken die Malaria übertragen [93]. Beide Forscher Ross (1902) und Laveran (1907) erhielten dafür den Nobelpreis. 1899 identifizierte Giovanni Battista Grassi die weibliche Stechmücke der Gattung *Anopheles* als den Hauptwirt des Malariaerregers. Diese überträgt bei ihrer Blutmahlzeit den Erreger auf den Zwischenwirt Mensch.

Nach seiner Entdeckung dichtete Ronald Ross [94]:

„Ich kenne nun dies kleine Ding
Unzähl'ge Menschen werden leben
Oh Tod, wo ist dein Stachel?
Und wo, oh Grab, dein Sieg?“

Über 100 Jahre danach sind wir allerdings von einer erfolgreichen Malariabekämpfung noch immer weit entfernt [94]. Die Malaria gehört mit der Tuberkulose und HIV/AIDS zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit.

Rund 40% der Weltbevölkerung in fast 100 Ländern der Erde leben in Gebieten mit möglicher Malariaübertragung. Nach vorsichtigen Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) beträgt die Anzahl der Neuerkrankungen zwischen 200.000 - 500.000 Fälle pro Jahr. Der überwiegende Teil der Infizierten, ca. 90%, leben im tropischen Afrika [182]. Die geographische Verbreitung der Erkrankung

entspricht weitgehend der Verteilung der *Anopheles* und zeigte in den vergangenen Jahren eine relative Stabilität. Erwähnenswert sind die in vielen Regionen auftretenden Schwankungen des Malariarisikos z.B. durch saisonale Klimaänderungen oder immer wieder neu auftretende Erregerresistenzen. Die Schwerpunkte ihrer Verbreitung liegen südlich der Sahara und in Südostasien. Jedoch ist die Krankheit auch in fast allen anderen tropischen und in vielen subtropischen Ländern zu finden (siehe Abbildung 2). Mit weltweit geschätzten 1,2 bis 2,7 Millionen Todesfällen pro Jahr, hierbei sind hauptsächlich Kinder betroffen, gehört die Malaria zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in tropischen Ländern [182].

Durch den wachsenden Fernreiseverkehr in den letzten Jahren wurde auch vereinzelt eine sog. „airport“ oder „baggage“ Malaria beobachtet. Bei dieser Form der Malaria handelt es sich um Infektionen von nicht gereisten Personen in einem Nicht-Endemiegebiet durch eingeschleppte Mücken oder Erreger. Mit 4-6 gesicherten Infektionen pro Jahr in ganz Europa sind diese Fälle aber eher selten.

In Deutschland wurden in den letzten Jahren im Durchschnitt ca.1000 importierte Malariafälle pro Jahr gemeldet [120].

Noch vor wenigen Jahrzehnten war man zuversichtlich diese Krankheit ausrotten zu können. Diese Meinung gründete auf die Einführung von neuen und wirksamen Malariamedikamenten und dem flächendeckenden Einsatz von Insektiziden. Die Programme zeigten anfängliche Erfolge, scheiterten aber Mitte der 70er Jahre vor allem an Geldmangel, wodurch es zu einem deutlichen Wiederanstieg der Krankheitszahlen kam.

Durch die Entschlüsselung des Genoms von *Plasmodium falciparum* 2002 und neuer Möglichkeiten in der Molekularbiologie beginnt nun hoffentlich eine neue Ära im Kampf gegen die Malaria.

1.2 Taxonomie

1.2.1 Der Vektor

Anopheles gehört mit *Culex* und *Aedes* zu den drei meist verbreiteten Gattungen von Stechmücken (=Moskitos). *Anopheles*-Mücken sind die alleinigen Vektoren für Malariaerreger, sie können jedoch auch andere Infektionskrankheiten wie z.B. Filariosen oder Arbovireninfektionen übertragen [101]. Die von Stechmücken übertragenen Erkrankungen werden als „Moskito-borne-diseases“ bezeichnet. Es sind ca. 360 verschiedene *Anopheles* Arten bekannt, wovon nur etwa 80 in der Lage sind die Malaria auf den Menschen zu übertragen.

Nur die weibliche *Anopheles* überträgt den Erreger. Sie benötigt die Blutmahlzeit für die Entwicklung ihrer Eier, während die männlichen Tiere sich von Nektar und anderen Nährflüssigkeiten ernähren. Ein Saugakt des Weibchens genügt bereits für die Produktion von ca. 100 Eiern. Ihre Eier legt sie stets in sauberem Wasser ab, bevorzugt in Dauergewässern mit viel Sonne. Es handelt sich meist um Sümpfe oder andere stehende bzw. leicht fließende Gewässer. Die *Anopheles*-Mücke braucht als Brutplatz eine feuchtwarme Umgebung (mind. 16 °C bis max. 33 °C) unterhalb von 2000m NN. Wie die meisten anderen Arten stechen die *Anophelesweibchen* bevorzugt in der Dämmerung oder nachts [101]. Die Übertragung von *Plasmodien* spp. durch *Anopheles* Arten wird durch Vektordichte, Vektorempfänglichkeit, Stichfrequenz und Sporogoniedauer beeinflusst [94].

1.2.2 Der Parasit: Die humanpathogenen *Plasmodien*

Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* (Ordnung *Haemosporidae*) *Apicomplexa* (= Sporentierchen) ausgelöst. Aus den rund 125 *Plasmodienarten*, von denen die meisten Vögel oder aber auch Reptilien infizieren, sind nur vier humanpathogen. Die Spezies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* verursachen verschiedene klinische Manifestationen.

Erreger	Erkrankung
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria tropica
<i>Plasmodium vivax</i>	Malaria tertiana
<i>Plasmodium ovale</i>	Malaria tertiana
<i>Plasmodium malariae</i>	Malaria quartana

Plasmodium falciparum, der Erreger der Malaria tropica, ist der weitaus gefährlichste Malariaparasit. Er ist hauptsächlich für die letal verlaufende Form der Malaria verantwortlich. Wie bereits erwähnt wird die Zahl

der jährlichen Todesfälle weltweit auf ca. 2,7 Millionen geschätzt. 90% dieser letalen Verläufe entfallen auf Afrika, betroffen sind dort vor allem Kinder.

Die Malaria *tertiana* und *quartana* sind relativ benigne Formen, bei denen es nur selten zu Komplikationen oder Todesfällen kommt.

Über 100 Jahre nach der Entdeckung des Malariaparasiten und seines Vektors haben internationale Wissenschaftlergruppen sowohl die Erbsubstanz des gefährlichsten Malaria-Erregers, als auch den hauptsächlichlichen Überträgerorganismus in Afrika - *Anopheles gambiae* - entschlüsselt.

Mit Hilfe neuester, molekularbiologischer Methoden war es möglich das Genom von *Plasmodium falciparum* vollständig zu entschlüsseln. Dieses setzt sich aus 14 linearen Chromosomen mit insgesamt 23 „megabases“ (Mb) Kern-DNA und aus annähernd 5300 Genen zusammen. Zusätzlich enthält es 2 extrachromosomale Elemente: ein mitochondriales Fragment von 6 kb und ein plastidartiges, zirkuläres Element von 35 kb, welches dem Apicoplasten zugeordnet werden konnte und prokaryotischen (Algen) Ursprungs ist [187]. Ein internationales Projekt zur Sequenzierung des vollständigen *Falciparum* Genoms (3D7-Clon) wurde 1996 gestartet und die sequenzierten Teile sukzessive im Netz veröffentlicht. 2002 war die Sequenzierung aller 14 Chromosomen abgeschlossen [65] und steht nun für weiterführende Forschungsprojekte zur Verfügung.

Weitere zukünftige Erfolge im Kampf gegen die Krankheit erhofft man sich durch die Sequenzierung des hauptsächlichlichen Überträgers der Malaria, von *Anopheles gambiae* [78]. Durch diese genetische Entschlüsselung von Erreger und Überträger können Forschungsgruppen die erstellte Genom-Datenbank verwenden, um nach Lösungen für Krankheiten zu suchen. Ebenso erwartet man daraus neue Impulse für die Impfstoff- und Medikamentenentwicklung.

1.2.3 Der Zyklus der Malariaparasiten im Wirtsorganismus

Der Entwicklungszyklus der humanpathogenen Malariaplasmodien ist mit einem Generationswechsel (geschlechtliche/ungeschlechtliche Vermehrung) und mit einem obligaten Wirtswechsel (Mücke/ Mensch) verbunden. Der Zyklus der Parasiten verläuft als sexueller Zyklus (Sporogonie) in der Überträgermücke und als asexueller Zyklus (Schizogonie) im Menschen (Abbildung1).

Aus parasitologischer Sicht kann die Mücke als Hauptwirt bezeichnet werden, da sich in ihr beide Geschlechtsformen vereinigen und daraus die den Menschen infizierenden Sporozoiten hervorgehen. Wenn die weibliche Mücke Blut eines infizierten Menschen saugt, so kommt es zunächst durch die Aufnahme von Mikro-(männlich) und Makro-(weiblich) gametozytenhaltigem Blut, zu einer ungeschlechtlichen Vermehrung der *Plasmodien* im Magen der Mücke. Die Gametozyten entwickeln sich dort zu männlichen und weiblichen Gameten (Gamogonie). Die beweglichen Mikrogameten fertilisieren Makrogameten und formen eine Zygote. Innerhalb von 24 Stunden verlängert sich die Zygote und wandelt sich in eine bewegliche Ookinete um, welche in epitheliale Zellen der Mücke eindringt. Es entsteht eine Oozyste, die an der Basalmembran des Mitteldarmepithels der Mücke anhaftet. Nach bis zu zwei Wochen entstehen daraus mehr als 10.000 Sporozoiten, die in die Speicheldrüsen der *Anopheles*-Mücke wandern, um von dort aus bei einem Stich, über den Speichel in den Wirt zu gelangen (sexuelle Vermehrung und Sporogonie).

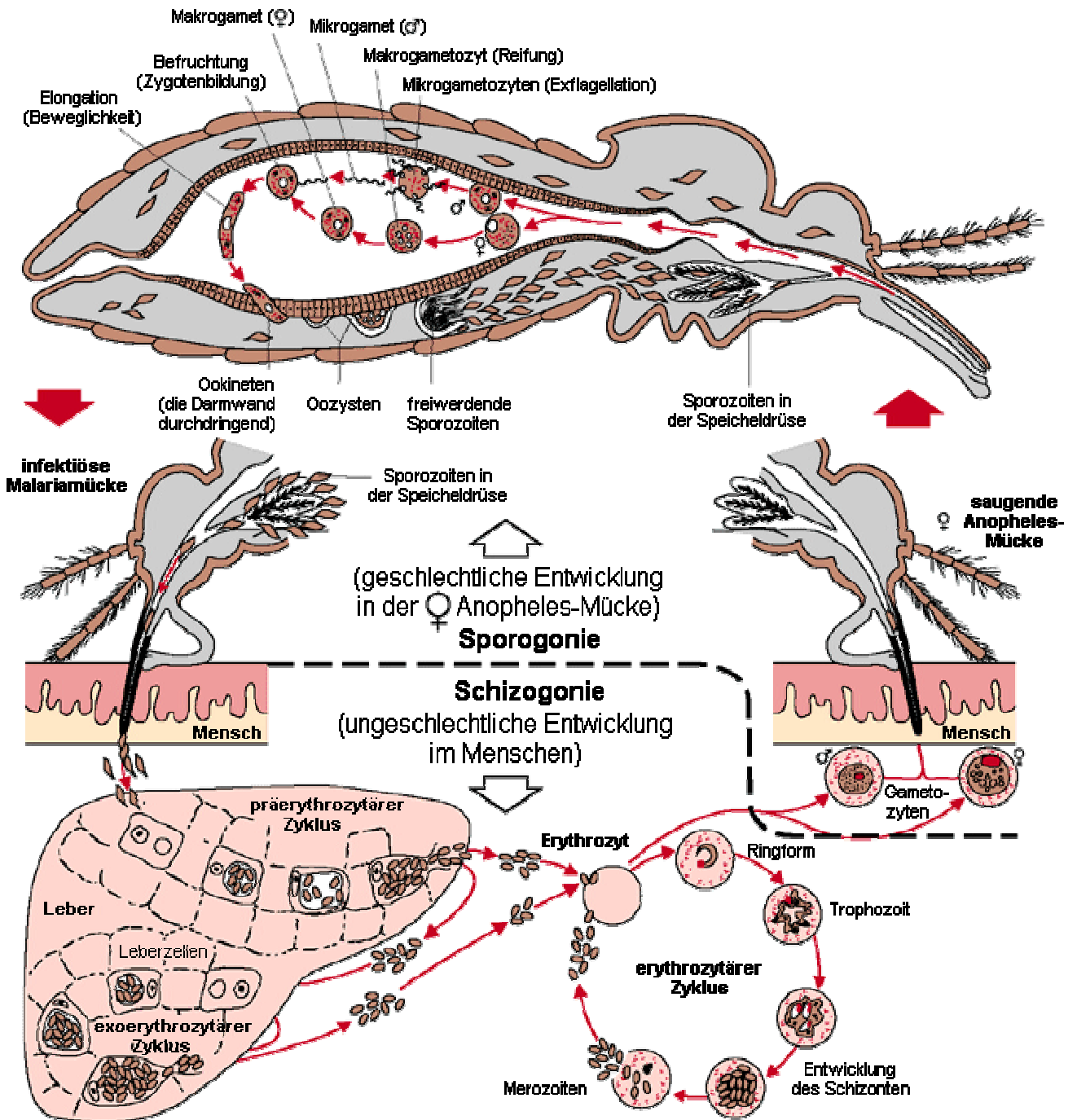
Die nach einem Stich in das menschliche Blut gelangten Sporozoiten wandern in die Leber, wo sie innerhalb der ersten 15-45 Minuten in die Leberzellen eindringen. In den befallenen Hepatozyten entwickeln sie sich zu Gewebsschizonten (prä- oder exoerythrozytäre Schizogonie). Diese Gewebsschizonten reifen innerhalb der nächsten 2 Wochen zu 10.000 bis 30.000 Merozoiten heran, diese werden dann durch Ruptur der Leberzelle freigesetzt. Die so in die Blutbahn gelangten Merozoiten befallen dort rasch Erythrozyten. Über die Vermehrungsstadien der Trophozoiten und Schizonten entwickeln sich in einem 48-Stunden-Rhythmus erythrozytäre Merozoiten, welche nach Zerstörung der Zelle erneut rote Blutkörperchen infizieren können (erythrozytäre Schizogonie). Die Anzahl der pro Zyklus gebildeten Merozoiten ist bei den einzelnen *Plasmodien-Spezies* unterschiedlich und beträgt bei *Plasmodium falciparum* 8-32. Das massive Ausschütten von Fremdeiweiß bei der Zellruptur ist für die typischen Symptome der Malaria wie Fieber, Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen verantwortlich. Aus einer Subpopulation der Parasiten entstehen nach mehreren Vermehrungszyklen wieder die sexuellen Stadien der Mikro-und Makrogametozyten. Werden diese durch einen erneuten Stich von den Vektoren aufgenommen, kommt es zur geschlechtlichen Vermehrung im Darm der Mücke und der Kreislauf schließt sich.

Bei *Plasmodium vivax* und *ovale* kann es zur Bildung von sog. Schlafstadien (Hypnozoiten, Dormozoitien) kommen. Hier verbleibt ein Teil der Gewebsschizonten in einer Art Ruhephase über Monate oder Jahre hinweg in der Leber. Durch ein unbekanntes Signal nehmen diese Stadien die exoerythrozytäre Schizogonie wieder auf, was lange Zeit nach einer Erstinfektion zu einem Malariarückfall führen kann.

Bei *Plasmodium falciparum* und *malariae* reifen alle Schizonten zu merozoitenhaltigen Zellen aus. Durch das Ausbleiben der Dormozoitienbildung kommt es bei diesem Infektionsweg in der Regel weder zu Spätmanifestationen noch zu Rezidiven. Bei *Plasmodium malariae* sind in seltenen Fällen nach Jahren und sogar nach Jahrzehnten Rekrudescenzen beschrieben worden, deren Ursache eine persistierende Erythrozyten Replikation auf niedrigem Niveau ist [94].

Abbildung 1:

Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* [80]



1.3 Semiimmunität

In den Endemiegebieten hängt die klinische Apparenz der Malaria auch von der spezifischen Immunitätslage, dem Lebensalter, eventuell bestehenden anderen Infektionen und Grunderkrankungen ab und kann dementsprechend variieren [70].

Epidemiologische Studien zeigen, daß genetische Einflußfaktoren des Wirtes bei der Manifestation einer Plasmodieninfektion eine Rolle spielen. Beispielsweise ist bekannt, daß *Plasmodium vivax*, obwohl weltweit die zweithäufigste, humanpathogene *Plasmodien-Spezies*, in Westafrika kaum verbreitet ist. Als Grund hierfür gilt, daß in dieser Region hauptsächlich Duffy-Blutgruppe-negative Menschen leben, die *vivax* Spezies aber nur menschliche Duffy-Blutgruppen-positive Erythrozyten befallen kann. Die roten Blutkörperchen dieser Menschen sind vor der Invasion durch *P. vivax* geschützt.

Allgemein wird zwischen angeborener und erworbener Semiimmunität unterschieden.

1.3.1 Angeborene Semiimmunität

Genetische Variationen, die zu unterschiedlichen Phenotypen der Erythrozyten führen, scheinen im Zusammenhang mit der Verbreitung und dem Schutz vor Malariaerkrankungen zu stehen. Dies führte zur Postulierung der sog. Malariahypothese. Bestimmte vererbare Erythrozytendefekte in polymorphen Genfrequenzen kamen nur in Regionen vor in welchen die Malaria endemisch ist oder war. Zu diesen erythrozytären Anämien gehören die heterozygote Sichelzellanämie (HbAS), der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Thalassämien und das Persistieren des Hämoglobin F. Da der Vorteil einer partiellen Protektion vor einer Plasmodieninfektion die Nachteile der homozygoten Ausprägung nicht ausgleichen kann wurde der Begriff des „balancierten Genpolymorphismus“ geschaffen.

- HbS wird durch eine informative Mutation der β -Globinkette verursacht, dies zieht eine Verformung der roten Blutkörperchen nach sich. In vielen klinischen und epidemiologischen Studien wurde gezeigt, daß diese Patienten zwar mit *Plasmodien* infiziert werden, jedoch seltener an einer schweren Form der Malaria erkranken. Als Ursache wird eine gestörte Replikation des Parasiten und eine beschleunigte Zerstörung der parasitierten Erythrozyten durch oxidativen Streß vermutet. Für das Sichelzellenhämoglobin wurde das Postulat der Malariahypothese vielfach belegt.
- α -Thalassämie sind angeborene Defekte mit fehlender oder verminderter Synthese der α -Globinpeptidketten. Über die relativen Mechanismen der Protektion ist wenig bekannt.

- G-6-PD-Mangel ist in seiner schwersten Form die Ursache für eine chronische hämolytische Anämie.

Mehrere Ursachen der protektiven Wirkung gegenüber Malariainfektionen sind denkbar. Zum Einen das verminderte Wachstum der Erreger zum Anderen die oxidative Schädigung defizienter Erythrozyten oder die veränderte Antigenität der Membran, was zu einer verstärkten Erkennung durch Antikörper führen kann.

1.3.2 Erworbene Semiimmunität

Eine erworbene Semiimmunität wird in Endemiegebieten bei dort aufwachsenden Kindern etwa ab dem fünften Lebensjahr beobachtet, da sie bereits im Kleinkindalter Malariaerregern gegenüber stark exponiert sind. Erst nach vielen wiederholten Parasiteninfektionen entwickelt sich dabei eine erworbene Immunität. Diese ist allerdings nicht steril sondern führt dazu, daß Malariaepisoden weniger häufig auftreten und zunehmend leichter verlaufen. Diese Semiimmunität ist gegen bestimmte Stämme ausgebildet und führt meist zu asymptomatischen Krankheitsverläufen mit begrenzter Parasitämie [71]. Der Erhalt dieser Teilimmunität ist jedoch auf ständige Neuinfektionen angewiesen und wird mit einer hohen Kindersterblichkeit (12-25%) in den Endemiegebieten teuer bezahlt [101]. In verschiedenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Patientenalter, der Morbidität und Mortalität untersucht. In Gambia wurde errechnet, daß die Sterblichkeit bei Kindern zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr zu 25% auf eine Malariaerkrankung zurückzuführen ist [69]. Farnert et. al (1999) fanden einen Zusammenhang zwischen der Komplexität einer durchlebten Malariaerkrankung und dem zukünftigen Schutz vor einer erneuten Infektion [52].

Die Ausbildung einer Semiimmunität dauert allem Anschein nach eine gewisse Zeit. Dies kann verschiedenste Gründe haben. Es wird diskutiert, daß die Immunität Art- und Stammspezifisch ist und der Organismus eines Individuums sich erst mit den lokalen *Plasmodien*-Stämmen vertraut machen muß. Bei einem Aufenthalt in malariefreien Gebieten klingt diese erworbene Teilimmunität meist innerhalb weniger Jahre wieder ab.

Unter den genetischen Faktoren, die eine „Resistenz“ gegen schwere Verlaufsformen der Malaria *tropica* vermitteln, wurden auch bestimmte HLA-(human leucocyte antigen) Genotypen beschrieben [75].

In der Promotorregion des TNF- α -Gens sind ebenfalls eine Reihe von Einzelmutationen nachgewiesen worden, von denen einige die Expression des TNF- α -Gens und den Verlauf einer Infektion beeinflussen können [113]. Insbesondere scheint ein niedriger Quotient aus dem Plasmaspiegel von IL-10 und TNF- α ein Risikomarker für zerebrale Malaria und schwere Anämie zu sein [109].

In weiteren genetischen Veränderungen, wie z.B. einer Punktmutation in der Promotorregion des iNOS-Gen [99, 76], oder in einer Genvariante des Intrazellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) [55, 18] wurden Assoziationen zum Verlauf einer Malaria gefunden.

Es ist schwierig diese Mutationen ausschließlich der erworbenen Immunität zuzuordnen, da verschiedenste immunologische Prozesse ineinander greifen und sich die Abläufe gegenseitig beeinflussen.

Eine sterile Immunität gegen die humanpathogenen Formen der Malaria ist bisher, mit Ausnahme der Duffy-negativen Westafrikaner gegen *Plasmodium vivax*, nicht bekannt. Einen relativen Schutz können genetische Faktoren oder die Immunabwehr des Wirtes verleihen.

1.4 Behandlung der Malaria

Trotz der langen Persistenz der Malaria in der Menschheitsgeschichte und ständig neu erworbenen wissenschaftlichen Erkenntnissen ist bis dato noch kein 100% wirksames Medikament gefunden worden.

In den letzten Jahren keimte nach anfänglichen Erfolgen auf dem Wege zur Entwicklung einer Vakzine gegen Malaria [17] Hoffnung auf, jedoch kehrte alsbald Ernüchterung ein. Obwohl spezifische Antigene der unterschiedlichsten Erregerstadien (Sporoziten, Leberschizonten, Merozoiten) oder Erythrozyten-Oberflächen Antigene beschrieben und auf ihre antiparasitäre Wirkung untersucht wurden, ist zur Zeit noch kein Impfstoff zum Schutz vor einer Malariainfektion verfügbar [27]. Protektion vor einer Infektion bietet die sogenannte Expositionsprophylaxe (lange, helle Kleidung und Verwendung von Repellentien und Moskitonetzen) sowie eine Chemoprophylaxe durch entsprechende Medikamente. Zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria steht jedoch nur eine begrenzte Zahl von Chemotherapeutika zur Verfügung. Keine der angesprochenen Maßnahmen kann allerdings einen vollständigen Schutz vor einer Malariainfektion und den sich eventuell daraus entwickelnden Symptomen bieten.

Die Schutzrate bei Reisenden lag in umfangreichen prospektiven Fallkontrollstudien in Abhängigkeit von den verwendeten Medikamenten, der Übertragungsintensität und der Resistenzsituation am Aufenthaltsort zwischen 70% und 95% [117]. Jede Art der Behandlung aber auch der Chemoprophylaxe ist mit dem Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen verbunden. Neben der Betrachtung individueller Kontraindikationen und Unverträglichkeiten muß das generelle Nebenwirkungsrisiko gegenüber dem Infektionsrisiko und der Resistenzlage am Aufenthaltsort abgewogen werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über verbreitete Wirkstoffe und deren Verwendung.

Tabelle 1: Chemotherapeutika zur Behandlung und Chemoprophylaxe der Malaria

Wirkstoff	Therapie	Prophylaxe
Chinin	i.v. komplizierte Malaria, oral unkomplizierte Malaria	Nein
Chloroquin	unkomplizierte Malaria	Ja
Pyrimethamin/Sulfadoxin	unkomplizierte Malaria	Ja
Mefloquin	unkomplizierte Malaria	Ja
Amodiaquin	unkomplizierte Malaria	Nein
Halofantrin	unkomplizierte Malaria	Nein
Artemisinin-Derivate	Malaria tropica	Nein
Artemether/Lumefantrin	unkomplizierte Malaria	Nein
Atovaquon/Proguanil	unkomplizierte Malaria	Ja
Tetracycline	in Kombination mit Chinin	Ja
Proguanil/Chloroquin	unkomplizierte Malaria	Ja
Primaquin	Eradikationstherapie der Malaria tertiana	Nein
Azithromycin	unkomplizierte Malaria	Ja
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	unkomplizierte Malaria	Nein
Pyrimethamin/Dapson	unkomplizierte Malaria	Ja
Clindamycin	in Kombination mit Chinin	Nein
Sulfalen/ Pyrimethamin	unkomplizierte Malaria	Nein
Chlorproguanil/Dapson	unkomplizierte Malaria	Ja

1.5 Wirkmechanismus der Chemotherapeutika

1.5.1 Chinoline

Chinin ist eines der ältesten Mittel gegen Malaria und hat auch heute noch einen festen Platz in der Malariatherapie. Ein Augustinermönch berichtete 1633 über Behandlungserfolge mit Chinarinde in Peru, diese war von den dortigen Jesuiten schon seit dem Jahr 1600 zur Malariatherapie angewandt worden. Seit 1640 verwendeten die Spanier routinemäßig aus Südamerika importiertes Chinarindenpulver des immergrünen Chinabaumes (*Cinchina officinalis*) zur Malariabehandlung. Das daraus gewonnene und 1820 erstmals isolierte Alkaloid Chinin, ist heute noch das Mittel der ersten Wahl bei der komplizierten und cerebralen Form der Malaria. Chinin wirkt schizontozid auf alle Plasmodienarten und zusätzlich gametozytoid auf *P. vivax*, *ovale* und *malariae*, zusätzlich besitzt es eine fiebersenkende Wirkung.

Chloroquin, ein 4-Aminochinolin-Derivat von Chinin, wurde in den 40er Jahren in Deutschland synthetisiert. Es ist eines der wenigen Medikamente die sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe geeignet sind. Nach dem 2. Weltkrieg wurde es weltweit das Mittel der Wahl bei unkomplizierter Malaria. Weitere Strukturanaloga zum Chloroquin sind Amodiaquin, zur Behandlung der unkomplizierten Malaria und Primaquin ein 8-Aminochinolin das zur Eradikationstherapie von *Plasmodium vivax* und *ovale* verwendet wird. Mit Primaquin können die sog. „Schlafstadien“ in der Leber therapiert werden.

Das Mefloquin, ein 4-Chinolinmethanol zur Behandlung der unkomplizierten Malaria, gehört wie Halofantrin (das wegen kardiotoxischer Nebenwirkungen nur noch begrenzt eingesetzt wird) und Lumefantrin zur Familie der Arylaminalkohole.

Der Wirkmechanismus der ältesten Klasse von Malariamedikamenten ist auch heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Gesichert ist, dass die Chinoline im Lysosom der Parasiten akkumulieren und dort mit dem Hämoglobinabbau interferieren. Man nimmt an, daß sie durch Komplexbildung mit Ferriprotoporphyrin IX die Polymerisation von Hämin, ein für den Parasiten toxisches Zwischenprodukt des Hämoglobinabbaus, zum unschädlichen Hämozoin (Malariapigment) hemmen. Durch freies Ferriprotoporphyrin IX kommt es dann zusätzlich zur oxidativen Schädigung des Parasiten. Als weitere mögliche Wirkweise wird eine Hemmung des GSH abhängigen Hämabbaus diskutiert [49, 125, 133, 177].

1.5.2 Antifolate

Kombinationspräparate aus einem Sulfonamid-Antibiotikum und einem Dihydrofolatsäure-Inhibitor wurden seit den 60er Jahren zur Behandlung der unkomplizierten Malaria eingesetzt. Häufige Kombinationen sind Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar®), Sulfalen/Pyrimethamin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Cotrimoxazol®) und das neue für Afrika getestete Chlorproguanil/Dapson (Lapdap®). Die als Fansidar® weltweit eingeführte Kombination erreichte einen wichtigen Platz in der Therapie und Prophylaxe der Chloroquin-resistenten Malaria. Vorallem bei der Chemoprophylaxe ist sie seit Jahren wegen des Risikos von schweren Nebenwirkungen umstritten. Im Vordergrund stehen dabei schwere allergische Hautreaktionen (Stevens-Johnson-Syndrom, Lyell-Syndrom) sowie Leber- und Knochenmarkschädigungen.

Antifolate greifen in den Zellvermehrungszyklus der Parasiten ein. Eine Voraussetzung für die DNA-Synthese der *Plasmodien* ist ein intakter Folsäurezyklus. Im Unterschied zum Menschen können *Plasmodien* aufgenommene Folsäure nicht verwerten und sind auf die *de novo* Synthese angewiesen. Da im Falle einer Blockade der Folatsynthese auch die Synthese von Purinbasen und Proteinen vermindert wird oder zum Stillstand kommt, hat dies direkte Auswirkung auf die DNA-Replikation und den gesamten Zellzyklus.

Gruppe I und II Antifolate greifen genau hier in den Zyklus der Protozoen ein. Die beiden Antifolate hemmen synergistisch den Folatzzyklus [60]. Insbesondere zwei Enzyme DHPS und DHFR nehmen wichtige Stellung in diesem Stoffwechselprozeß ein.

Sulfonamide sind Folsäureantagonisten und Strukturanaloga zu p-Aminobenzoesäure (PABA). Sie wirken durch kompetitive Verdrängung der p-Aminobenzoesäure, als Inhibitoren der Dihydropteroatsynthase (DHPS). DHPS katalysiert als Schlüsselenzym die Umwandlung von PABA zu Dihydropterotat.

Dihydrofolatreduktase (DHFR) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat, einem Baustein der Thymidylatsynthese der Parasiten. Pyrimethamin und Biguanide inhibieren dieses Enzym.

1.5.3 Antibiotika

Tetracyclin und Derivate werden in Kombination mit Chinin zur Behandlung der schweren Form der Malaria eingesetzt. In den USA und durch die WHO wird Doxycyclin als Prophylaxe für Hochrisikogebiete mit Multiresistenzen empfohlen. In Deutschland ist es für diese Indikation jedoch noch nicht zugelassen. Als Angriffsort wird der Apicoplast beschrieben, ein Zellorganell mit einem zirkulären 35 kb Plastid und prokaryotischem Transkriptions- und Translationssystem. Untersuchungen auf der Ebene der t-RNA zeigten unter Medikamentenwirkung verminderte t-RNA-Spiegel von mitochondrial codierten Genen (Cytochrom-Oxidase I, Cytochrom b) und dem Plastid-codiertem RNA-Polymerase-Gen [103].

1.5.4 Artemisinin und Derivate

Pflanzenauszüge von *Artemisia annua* (Qinghaosu) wurden in China traditionell zur Behandlung von Fieber und gegen Malaria eingesetzt. Als wirksame Komponente wurde Artemisinin, ein Sesquiterpenlaktone, isoliert. Artemisinine sind zu hochwirksamen Medikamenten mit synthetisch darstellbaren Wirkstoffen (Artesunate, Arteether, Artemether) weiterentwickelt worden.

Die Kombination Artemether-Lumefantrin (Riamet®) ist seit 2001 auch in Deutschland zur Behandlung von unkomplizierter Malaria zugelassen. Artemisinin-derivate wirken auf alle Blutstadien der Malariaerregers einschließlich der Gametozyten, sind aber nicht hypnozoitizidal [138]. Beide Komponenten haben eine sekundäre Hemmwirkung auf die Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese des Parasiten. Artemisinin und seine Derivate sind Endoperoxide und verfügen über eine intramolekulare Peroxidbrücke. Bei der Aktivierung der Substanzen im Lysosom durch das Eisen des Hämkomplexes kommt es zur Spaltung der Peroxidbrücke und Entstehung von freien Radikalen. Diese führen durch Alkylierung von Proteinen und Membranbestandteilen zu einer irreparablen Schädigung der Zelle.

1.5.5 Atovaquon

Eine Alternative zu Mefloquin bietet Malarone[®], eine fixe Kombination aus Atovaquon mit Proguanil, welches in Deutschland seit 1997 im Handel ist. Atovaquon/Proguanil kann zur Therapie und Prophylaxe einschließlich der notfallmäßigen Selbstbehandlung der unkomplizierten *Falciparum* Malaria eingesetzt werden. Atovaquon, ein Hydroxynaphtochinon, leitet sich von dem Naturstoff Lapachol (Inhaltsstoff des Indischen grünen Teebaumes, Surinam greenheart wood) ab. In *in vitro*-Studien zeigte sich eine breite antiparasitäre Wirkung, unter anderem gegen *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium* species.

Atovaquon wirkt auf die Blutformen des Malariaerregers, zeigt sich aber auch effektiv gegen präerythrozytäre Stadien (Leberformen), Sexualformen und Insektenstadien des Parasiten [14, 37, 38, 58, 62]. Untersuchungen zum Wirkmechanismus ergaben eine Hemmung des mitochondrialen Elektronentransportes sowie einen Kollaps des Membranpotentials durch Atovaquon [64,158]. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Strukturverwandtschaft zu Ubichinon wurde ein Angriff am Cytochrom-b postuliert. Für Inhibitoren mit ähnlicher Struktur wurde gezeigt, daß sie an der Ubihydrochinon (Q₀) - Bindungsstelle des Cytochrom-bc₁-Komplexes angreifen und den Elektronentransport hemmen.

1.6 Resistenz

Unter Resistenz ist das resistente Verhalten der *Plasmodien* bei der Therapie zu verstehen. Aus Erkrankungen trotz Prophylaxe kann nicht immer ohne weiteres auf das Vorliegen resistenter Stämme geschlossen werden. Die Gründe, die z.B. zum Versagen einer Chemoprophylaxe führen, sind vielseitig.

Neben einer reduzierten Sensitivität der Erreger gegen die verwendeten Substanzen sind die wichtigsten Ursachen mangelnde Compliance (insbesondere ein vorzeitiger Abbruch bei der Einnahme der Medikamente), Einnahmefehler, Absorptionsstörungen (Erbrechen, Durchfall), verminderte Wirkstoffqualität, Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln, unzureichende Metabolisierung von Prodrugs und die teilweise lange Inkubationszeit der Malaria (oft über die Wirkungsdauer des Wirkstoffes hinaus).

Somit besteht ein Unterschied zwischen Resistenz und der Bezeichnung eines Therapieversagers. Während Resistenz häufig zu Therapieversagern führt, wird nicht jeder Therapieversager durch einen resistenten Erreger verursacht. Die medikamentöse Vorbeugung aber auch die Therapie der Malaria wird durch die Verbreitung von Resistenzen erschwert. Diese sind bereits gegen jedes zur Verfügung stehende Antimalariamittel möglich. Von besonderer Bedeutung ist die Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegenüber den Wirkstoffen, da dieser die schwerste Form der Erkrankung Malaria tropica verursacht.

1.6.1 Definition

Resistenz ist definiert als Fähigkeit einer Plasmodienpopulation zu überleben und sich zu replizieren, obwohl ein adäquater Wirkstoff in ausreichender Dosierung gegeben und resorbiert wurde. Der Wirkstoff muß dabei für den Zeitraum, der für eine normale antiparasitäre Wirkung notwendig ist, in ausreichender Menge am Wirkort vorliegen. Verstärkt wird das Problem der Resistenz durch das Auftreten multiresistenter Erreger. „Multi drug resistance“ (MDR) von *Plasmodium falciparum* wird definiert als Resistenz gegen mehr als 2 verschiedene Klassen von Malariamedikamenten. Im allgemeinen handelt es sich bei den ersten beiden Wirkstoffklassen um 4-Aminochinoline (wie z.B. Chloroquin) und die Antifolate (wie z.B. Sulfadoxin/Pyrimethamin). Wichtigste Methode und sogenannter „Goldstandard“ zur Bestimmung von Resistenzen sind *in vivo* Sensitivitätstests. Sie geben genaue Informationen und erlauben Aussagen über die Wirksamkeit eines Mittels im Studiengebiet einschließlich der Berücksichtigung von wirtsspezifischen Faktoren.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde von der WHO ein standardisierter Test eingeführt und die Therapieergebnisse auf Grundlage parasitologischer Merkmale als sensitiv (S) oder resistent mit unterschiedlichem Schweregrad (R1, R2, R3) eingestuft.

➤ *Sensitiv*

Keine asexuellen Formen am Tag 6 und keine Rekrudescenz bis Tag 28

➤ *Resistenzgrad R1*

Rekrudescenz beschreibt das erneute Auftreten von Symptomen oder einer Parasitämie, nach einem Parasiten- und symptomfreien Intervall (Parasitenzahl unter der Nachweisgrenze) von 7 bis 28 Tagen.

➤ *Resistenzgrad R2*

Reduktion der Parasitämie um >75% nach 48 Stunden, jedoch persistierende Parasitämie für insgesamt mindestens 7 Tage

➤ *Resistenzgrad R3*

Reduktion der Parasitämie um <75% nach 48 Stunden

Diese Einteilung ist heute veraltet. Die WHO beschloß 2001 eine neue Klassifikation für therapeutische Ergebnisse. Die therapeutische Antwort wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

➤ *Frühe Therapieversager „Early treatment failure“ (ETF):*

Parasitendichte an Tag 2 > als an Tag 0

Parasitendichte an Tag 3 >25% von Tag 0

Parasitämie an Tag 3 mit Fieber >37.5°C

➤ *Späte klinische Therapieversager „Late clinical failure“ (LCF):*

Symptome schwerer Malaria bzw. andere ernste Symptome nach Tag 3 bei vorhandener Parasitämie.

Vorhandene Parasitämie mit Fieber >37.5°C zwischen Tag 4 und Tag 14, ohne die Kriterien für ETF zu erfüllen.

➤ *Späte parasitologische Therapieversager „Late parasitological failure“ (LPF):*

Vorhandene Parasitämie an den Untersuchungstagen 7 oder 14 ohne die Kriterien für ETF oder LCF zu erfüllen.

➤ *Klinisch und parasitologisch adequates Therapieergebnis „Adequate clinical and parasitological response“ (ACPR):*

Keine Parasitämie an Tag 14 und keine Symptome von ETF, LCF oder LPF bis Tag 14.

Eine weitere Möglichkeit um Parasitenpopulationen auf Medikamenten Sensitivität zu prüfen bieten *in vitro* Methoden. Die Resistenz kann auch labortechnisch mit Hilfe von Parasitenkulturen verifiziert werden. Wegen der eingeschränkten Kultivierbarkeit, da sich nur eine begrenzte Anzahl an Stämmen züchten läßt, können nur mit *Plasmodium falciparum* Isolaten zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden. Hierfür werden Parasiten aus Patientenblut im Labor gezüchtet und somit kann unabhängig vom Einfluß des Wirtsorganismus die Sensitivität des Parasiten zum antiparasitären Wirkstoff getestet werden. Es lassen sich auch Aussagen über Kreuzresistenzen und synergistische Wirkungen zwischen verschiedenen Substanzen ableiten. Diese Methode setzt einen hohen logistischen, technischen und finanziellen Aufwand voraus wodurch ihre Anwendung in Feldstudien im End-/Epidemiegebiet erschwert wird. Das Ergebnis spiegelt somit oft nicht das tatsächliche Populationsmuster des Erregers im Studiengebiet wieder [173], außerdem kommt es zu einer schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [198].

1.6.2 Ursachen der Resistenzentwicklung

Resistenzen gegen Malariamittel entwickeln sich erfahrungsgemäß dort wo der Medikamentendruck groß und die Übertragungsrate hoch ist. Darüber hinaus ist offenbar die Unterdosierung der Wirkstoffe ein ebenfalls entscheidender Faktor. Bei Arzneimitteln mit langer Halbwertszeit, wie z.B. Mefloquin ist die Unterdosierung in der Abklingphase oder nach Ende der Therapie unvermeidlich auch wenn regelgerecht

dosiert wird. Hier findet sich nach Behandlung der Primärinfektion ein subtherapeutischer Medikamentenspiegel im Blut. Durch diese niedrigen Substanzspiegel können Sekundärinfektionen „gewöhnnt“ werden.

Genmutationen, die zu Resistenzen führen können, finden aber auch spontan (Rekombination, Deletion, crossing over) ohne Medikamenteneinfluss statt. Einzelne so veränderte Parasiten mit geringen genetischen Variationen können so in einer Gesamtpopulation vorkommen. Zeigen sie unter Medikamentendruck Vorteile, kommt es zu einer Selektion der bevorteilten Parasiten. Diese sind dann unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage die „ursprüngliche“ Wildtyppopulation teilweise oder vollständig zu verdrängen. Die Entwicklung und Ausbreitung von resistenten Erregern wird von vielen weiteren Faktoren beeinflusst. Dazu gehören Wirkstoffeigenschaften, Vektoreigenschaften sowie Einnahmegewohnheiten und der Immunstatus des Patienten. Zum Beispiel scheinen Chloroquin-resistente Parasiten in einigen Anophelesarten Reproduktionsvorteile gegenüber sensitiven Populationen aufzuweisen [160, 179, 185].

Wirkstoffe mit kurzer Halbwertszeit wie z.B. Artemisinin-Präparate verlangen Compliance der Patienten hinsichtlich der Einnahmedauer, um die gesamte Parasitenpopulation des Patienten zu eliminieren [73]. Genauso beeinflusst unkontrollierte Medikamenteneinnahme ohne genaue Diagnose den Medikamentendruck und die Selektion von resistenten Parasitenpopulationen. So wurde im Rahmen von Bekämpfungs- und Eradikationsprogrammen in Brasilien, Kambodscha, Tansania und Ghana Speisesalz mit Chloroquin versetzt [126], was vermutlich zur Entwicklung von Resistenz in diesen Gebieten maßgeblich beigetragen hat.

Eine kompetentere Immunantwort verstärkt die Wirkung einer Therapie. Ein semiimmuner Patient könnte trotz abnehmender Sensitivität des Parasiten zum Medikament geheilt werden, während ein nicht-immuner Patient erkrankt und die Parasitenpopulation somit weiter verbreiten kann. Daher führt das Auftreten von resistenter Malaria bei nicht-immunen Bevölkerungsgruppen (Touristen, Vertriebene oder Fremdarbeiter) in der Regel zu einer Manifestation und Ausbreitung von Resistenz.

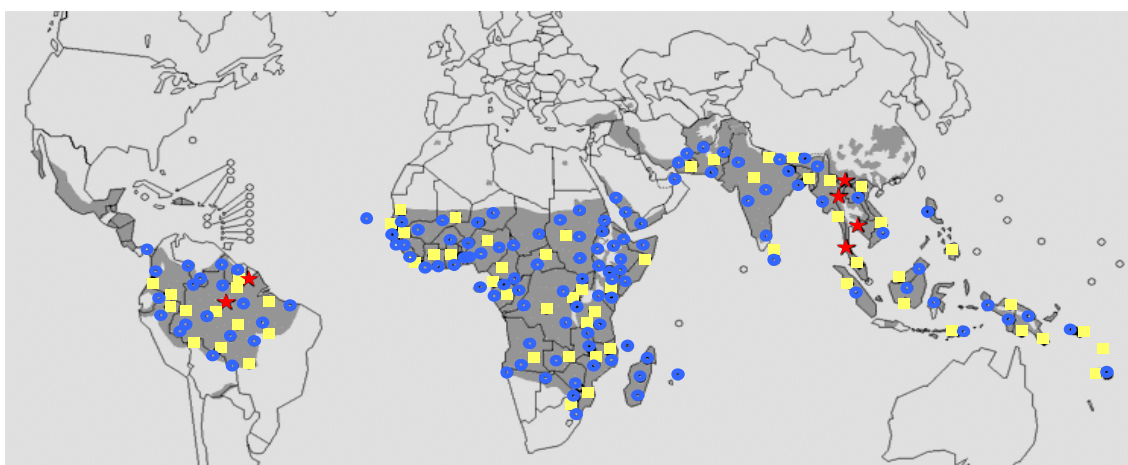
Ebenso scheint der Grad der Transmission die Entwicklung und Verbreitung von Resistenzen zu beeinflussen, wobei die genaue Rolle nicht geklärt ist. Ein erhöhtes Risiko zur Resistenzentwicklung wurde sowohl für Gebiete mit intensiver als auch mit moderater Übertragungsrate postuliert. Die Frage ob sich Resistenz schneller in Gebieten mit erhöhter oder erniedrigter Transmissionsrate entwickelt führte zu verschiedenen Postulaten. Resistenz trat zuletzt auch verstärkt in Gebieten mit schwacher Transmission auf (Thailand, Brasilien), was für die „low-transmission“ Hypothese spricht [192, 193]. Grundsätzlich ist die Resistenzentwicklung und -ausbreitung wohl multifaktoriell beeinflusst.

1.6.3 Geographische Verbreitung von Resistenzen gegen Antimalariamittel

Resistenzen von *Plasmodium falciparum* sind gegen fast alle Standardtherapeutika beschrieben, wobei die geographische Verbreitung je nach Medikament stark variiert. Abbildung 2 zeigt die Gebiete mit Malariaverbreitung und die weltweite Resistenzsituation.

Abbildung 2:

Malaria Endemiegebiete und Resistenzverteilung (WHO)



- Chloroquin-Resistenz
- Sulfadoxin/Pyrimethamin-Resistenz
- ★ MDR: Multidrug resistance

Chloroquin-Resistenz tritt heute in allen Malaria-endemischen Gebieten auf, mit Ausnahme von Mittelamerika und den Karibischen Inseln. Die ersten Fälle von Resistenzverhalten gegenüber Chloroquin wurden 1959 in Asien an der thailändisch-kambodschanischen Grenze, als auch in Kolumbien beschrieben [116]. Seit Ende der 70er Jahre breitete sich die Chloroquin-Resistenz auch in Afrika aus, wo sie Anfang 1990 regional bereits über 50% betrug [182]. Im tropischen Afrika wurde das Auftreten klinisch manifester Resistenzen wahrscheinlich lange durch einen hohen Grad an Immunität maskiert. Durch diese rasante Entwicklung wurde der Gebrauch von Chloroquin in vielen Gebieten sinnlos [181]. Weitgehend Chloroquin-empfindliche Isolate findet man gegenwärtig nur noch auf einigen karibischen Inseln und im nordwestlichen Panama.

Ähnlich ernst ist die Lage bei dem in Deutschland nicht mehr zugelassenen Kombinationspräparat Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P), das gegenwärtig in 10 afrikanischen Staaten als additives oder alleiniges Standardmedikament verwendet wird. Resistenz gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin wurde erstmals in den

60er Jahren an der thailändisch-kambodschanischen Grenze und in Venezuela entdeckt [106]. Heute findet man in großen Teilen Südostasiens, Südchinas und im Amazonasbecken hochgradige Resistenz. In Afrika beobachtete man seit Ende der 80er Jahre eine abnehmende Sensitivität gegen die Antifolatkombination (S/P), die sich heute von Ostafrika nach Westafrika mit unterschiedlicher Intensität in den einzelnen Ländern ausdehnt.

Abnehmende Sensitivität und Resistenz gegen Mefloquin wurde zuerst in den späten 80er Jahren wiederum im thailändischen Grenzgebiet zu Myanmar und Kambodscha beobachtet. Diese Gebiete werden auf Grund der Häufung von verschiedensten Resistenzen gegen Antimalariamittel als MDR-Gebiete (multidrug-resistant) bezeichnet. Ostafrika ist auf dem besten Wege in naher Zukunft ebenfalls ein MDR-Gebiet zu werden [188]. Auch aus dem Amazonasbecken wurden Fälle von Mefloquin-Resistenz berichtet, aber Grad und Verbreitung sind weitaus geringer als in Südostasien.

Die ältesten Malariamittel, nämlich Chinin und die Artemisinine, stellten sich als am widerstandsfähigsten gegenüber Resistenzentwicklungen heraus. Klinische Resistenz zu Chinin obgleich schon 1910 beobachtet, stellt im Vergleich zu anderen Therapeutika ein geringes Problem dar [181]. Zur Vorbeugung von solchen Resistenzphänomenen hat sich eine Kombination aus Chinin und einem Tetracyclin bewährt. Zur Zeit sind gegen alle verwendeten Medikamente zumindest regionale Resistenzen bekannt.

Neuentwicklungen von Medikamenten mit dem Ziel, die Resistenzentwicklung zu kompensieren werden gegenwärtig kaum versucht. Es werden vielmehr bereits früher synthetisierte Substanzen erprobt oder bereits als Monosubstanzen verfügbare Stoffe kombiniert. Der Weg von der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes bis zu seiner Zulassung verschlingt Unsummen von Geld, bindet Ressourcen und dauert in der Regel mindestens 10 Jahre. Die Industrie zieht sich fast vollständig aus der Malariaforschung und der Entwicklung und Erprobung neuer Wirkstoffe zurück. Es fehlt der Markt für solche Neuentwicklungen, denn Entwicklungsländer sind auf kostengünstige antiparasitäre Chemotherapeutika angewiesen.

Die WHO versucht seit Mitte der 90er Jahre durch die Initiative „Roll Back Malaria“ die Malaria als eine globale Herausforderung wieder ins Gespräch zu bringen, mit kleinen Erfolgen.

Das 8-Aminochinolon Tafenoquin und Fosmidomycin als Vertreter der Isoprenoid-Biosynthesehemmer sind zwar als Wirkstoffe seit Jahrzehnten bekannt aber in ihrer Wirksamkeit gegen Malaria erst jetzt beschrieben worden [88, 114, 102].

1.6.4 Genetischer Hintergrund der Medikamentenresistenz bei *Plasmodium falciparum*

Es werden verschiedene Theorien benutzt und unterschiedlichste Mechanismen diskutiert um Medikamentenresistenz und deren Entstehung zu erklären [79, 155]. In einem „Review“ von Borst et. al. (1995) werden verschiedenste Ursachen als auslösende Mechanismen aufgeführt.

Durch den Verlust von Transportsystemen oder Veränderungen der Membran bzw. der transmembranen Domänen kommt es zur verminderten Aufnahme des Wirkstoffs in die Zelle. Weiter wäre denkbar, daß die Substanz zwar in die Zelle gelangt, dort aber verstärkt wieder ausgeschleust, inaktiviert oder die Umwandlung in den aktiven Metaboliten gehemmt wird. Durch Mutationen kann es zu einer Veränderung der Zielstruktur kommen, so ist es möglich, daß z.B. durch einen Aminosäuretausch an der Bindungsstelle des angegriffenen Enzyms die Bindungsaffinität zur Wirksubstanz herabgesetzt wird [22].

In den letzten Jahren hat sich die Theorie, daß Punktmutationen auf bestimmten Genen, die für bestimmte Enzyme (z.B. DHPS/DHFR) codieren für die Entwicklung von solchen Resistenzphänomenen verantwortlich sind, bestätigt. So konnten Mutationen in mehreren Laborstämmen und einigen resistenten Wildisolaten nachgewiesen werden. Die Entdeckung, daß Resistenzen gegen verschiedene Malariamittel mit Punktmutationen auf dem *P. falciparum* Genom korrelieren, führte zur Entwicklung von Methoden, um die Prävalenz dieser Mutationen zu untersuchen. Die Bestimmung spezifischer Genotypen erfolgt entweder über allelspezifische PCR oder als Kombination von PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Analyse (PCR-RFLP). Bei allelspezifischer PCR sind die eingesetzten Primer entweder für den Wildtyp oder die Mutation spezifisch und ein Produkt entsteht nur, wenn DNA-Vorlage und Primer vollständig übereinstimmen. Bei der PCR-RFLP-Analyse werden die relevanten Genabschnitte unabhängig vom Genotyp amplifiziert und anschließend mit verschiedenen Enzymen verdaut, die spezifisch nur den Wildtyp oder die Mutation schneiden. Dadurch ist die Methode robuster, schnell etablierbar und für Analysen großer Probenmengen geeignet. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Bereitstellung der zu untersuchenden Proben auf Filterpapier.

Obwohl nicht in allen Feldstudien eine eindeutige Korrelation zwischen *in vivo* Ergebnis und Genotyp des Parasiten nachweisbar war, konnte gezeigt werden, daß die Prävalenz resistenzassoziierter Mutationen ein wertvolles Mittel ist, um Vorhersagen über die mögliche Effektivität einer Malariatherapie zu treffen [35, 36, 43, 83, 86]. Über die globale Verteilung verschiedenster molekularer Resistenzmarker gibt es bisher nur begrenzt Daten. Im Rahmen regelmäßiger Untersuchungen molekularer Resistenzmarker in einem Studiengebiet können die Ergebnisse als Frühwarnsystem für Veränderungen der Resistenzsituation genutzt werden. Weiterhin können auch Resistenzentwicklungen gegen Substanzen, die nicht mehr zur Therapie eingesetzt werden, verfolgt, beobachtet und ausgewertet werden.

Unterschiedlichste molekulare Marker wurden bereits mit Medikamentenresistenz in Verbindung gebracht.

Medikamentenresistenz von *P. falciparum* gegen Pyrimethamin ist mit Punktmutationen auf dem DHFR-Gen assoziiert worden [33]. Besonders intensiv untersucht wird eine Mutation der Aminosäure Serin zu Asparagin am Codon 108. Nach diesem AS-Tausch in Position 108 wurde eine Resistenz gegen Pyrimethamin und ein Sensitivitätsverlust zu Cycloguanil (aktive Form des Proguanil) beobachtet. Zusätzliche Veränderungen in den Codons 51 (Asn->Ile), 59 (Cys->Arg) und 164 (Ile->Leu) haben eine additive Wirkung und können den Effekt noch verstärken. Dagegen scheint der Wechsel zu Threonin an Position 108 gemeinsam mit der Mutation an Position 16 von Alanin zu Valin zu einer Resistenz gegen Cycloguanil und einer leicht verminderten Wirkung von Pyrimethamin zu führen. Das Auftreten von Mehrfachmutationen in den Codons 108, 164 und 51 oder 59 sprechen für eine stark erhöhte Resistenz gegen die beiden DHFR-Antifolate [61, 128].

Eine ähnliche These wurde auch bei der Entwicklung der Sulfadoxin-Resistenz aufgestellt. Durch Punktmutationen auf dem DHPS-Gen kommt es zu strukturellen Änderungen am oder in der Nähe des aktiven Zentrum des Enzyms. In den 5 folgenden Genloci sind Aminosäurewechsel beschrieben worden: Codon 436 (Ser ->Ala/Phe), Codon 437 (Ala->Gly), Codon 540 (Glu->Lys), Codon 581 (Ala->Gly) und Codon 613 (Ala->Thr/Ser) [32, 86].

Durch das Vorkommen mehrerer Mutationen wird die Ausbildung eines resistenten Phänotyps verstärkt, wobei sich in einigen Studien die Mutation an Position 437 als entscheidend erwies.

Während die Mechanismen der Resistenz gegen Antifolate in den Mutationen der Gene die für die Enzyme DHPS/DHFR codieren zu finden sind, scheint die Situation zur Erklärung der Resistenz gegen Chloroquin weitaus komplizierter zu sein. Resistenzen gegen Chloroquin entwickelten sich relativ langsam, so daß davon ausgegangen wird, daß es sich um einen multifaktorellen Prozeß handelt. Erste Fälle von Unwirksamkeit des beliebten und vor allem kostengünstigen Wirkstoffs wurden Ende der 50iger Jahre in Asien beobachtet. In den folgenden 30 Jahren erfolgte eine ubiquitäre Ausbreitung in tropischen und subtropischen Gebieten, so daß heute das Vorkommen von Resistenz gegen Chloroquin und das Verbreitungsgebiet von *Plasmodium falciparum* als deckungsgleich zu bezeichnen sind. Das „multi drug resistance“ (Pfm_{dr}1)-Gen auf Chromosom 5 des Parasiten scheint eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von Resistenz zu spielen. Anders als bei der verminderten Wirksamkeit der Antifolate wird bei Chloroquin eine insuffiziente Konzentration des Wirkstoffes im Lysosom beschrieben. Pfm_{dr} 1 enthält die genetische Information für ein P-glycoprotein (Pgh1), ein lysosomaler, transmembraner Transporter aus der Familie der ABC-Transporter. Mutationen am Codon 86 (Asn->Tyr), 184 (Phe->Tyr), 1042 (Asn->Asp) und 1246 (Asp->Tyr) von Pfm_{dr}1 wurden mit Chloroquinresistenz assoziiert. Diese Resultate werden aber kontrovers diskutiert da es zu uneinheitlichen Ergebnissen und unterschiedlichen Korrelationen in diversen Studien kam [10, 11, 174, 186].

Weitere Assoziation mit *in vitro*- und *in vivo*-Chloroquin Resistenz zeigen Mutationen am *Pfcr*-Gen. *Pfcr*, ein Gen mit 13 Exons, befindet sich auf Chromosom 7 in unmittelbarer Nachbarschaft zum *cg2*-Gen.

Die Mutation von Lysin (K 76 T) zu Threonin in Codon 76 von *Pfcr*, das für ein Transportprotein in der Lysosomenmembran codiert, wird als Faktor für eine Grundresistenz angesehen [43]. Man nimmt an, daß Mutationen am Transporter zu einem stärkeren Export von Chloroquin aus der Vakuole führen und gleichzeitig pH-Veränderungen bewirken. Veränderungen am *Pfmdr*-Gen, als auch am *Pfcr*-Gen wirken modulierend auf die Ausbildung von Resistenz, jedoch sind auch hier die Ergebnisse umstritten [44].

Trotz synergistischer Wirkung der Kombination aus Atovaquone/Proguanil wurden beim Menschen bisher einige Therapieversager beschrieben. Ein Austausch von Tyrosin durch Asparagin am Codon 268 des Cytochrom *bc₁* Gens wurde bei einem Malariapatienten in England berichtet, der nach seiner Rückkehr aus Nigeria mit Malarone® behandelt wurde. Bei einem anderen Fall mit spätem Therapieversagen wurde eine weitere Mutation am Codon 268 nachgewiesen [51]. Bei dem Erregerstamm dieses Patienten kam es zu einem Austausch der AS Tyrosin durch Serin. Bei *in vitro* Versuchen wiesen alle resistenten Stämme einfache oder mehrfache Punktmutationen auf [149], unter anderem eine Substitution von Tyrosin durch Cystein am Codon 268 [194]. In einer Studie mit *Plasmodium berghei* wurden 3 Mutationen beschrieben, die mit Resistenz zu Atovaquon verbunden waren. Ein Aminosäurewechsel an Position 133 oder 144 zusätzlich zu einer Mutation am Codon 284, führte zu einem erhöhtem Resistenzniveau [161].

Resistenzen gegen Artemisinin und dessen Derivate wurden noch nicht beschrieben, allerdings gibt es auch hier schon Hinweise auf eine abnehmende Sensitivität der Wirkstoffe [189].

Eine endgültige Beurteilung, wie weit sich die beschriebenen Mutationen durchsetzen und in den unterschiedlichen Epidemie- und Endemiegebieten zu phänotypischer Resistenz führen, steht noch aus.

1.7 Merozoiten Oberflächen Proteine (MSP1 und 2)

Eine wichtige Eigenschaft der humanen Malariaparasiten ist ihre genetische Vielfalt, die durch Allelpolymorphismen, Rekombination, Chromosomenneuanordnung und durch Antigenvariationen zustande kommt. Genetische Rekombination wird durch Deletion, Insertion, „crossing over“ oder vergleichbare Phänomene ausgelöst. Verschiedene Merozoiten-Oberflächen Proteine (MSP1 bis 6) sind identifiziert worden, aber für die meisten ist die genaue Funktion die sie während eines Vermehrungszyklus übernehmen weiterhin nicht geklärt. Beide Gene, die für MSP1 und MSP2 codieren enthalten Segmente mit Tandemwiederholungssequenzen. Diese können sich in Ihrer Länge und Basenabfolge für verschiedene Allele unterscheiden. Abweichungen in den Wiederholungsmustern können mittels PCR und anschließender Elektrophorese als Längenunterschiede sichtbar gemacht werden. Durch gegensätzliche

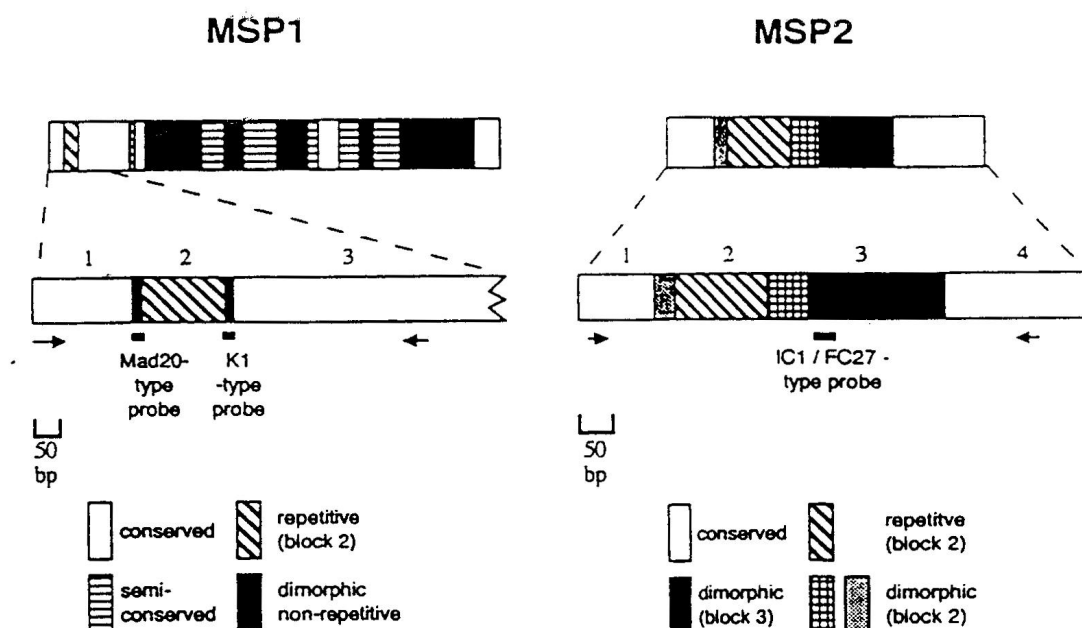
Bandenmuster ist es möglich Parasitenpopulationen zu bestimmen und zu charakterisieren [6, 172] gegebenenfalls auch zwischen Rekrudescenzen und Neuinfektionen zu unterscheiden [84].

1.7.1 MSP1

Das Merozoiten-Oberflächen Antigen 1 (ca.200 kDa) wird während der Schizogonie gebildet und verbleibt an der Zelloberfläche der Merozoiten. Für das am besten untersuchte Oberflächenprotein MSP1 wurde postuliert, daß es an den biochemischen Invasionsreaktionen des Parasiten in die roten Blutzellen beteiligt ist. Mit seinem Glykosylphosphatidylanker könnte es bei der Ersterkennung der Erythrozyten durch den Parasiten eine entscheidende Rolle spielen. Vermutet wird eine Interaktion von MSP1 und Spectrin, ein Protein auf der Zytoplasmamembran der „red blood cells“. Die Erbinformation für MSP1 befindet sich auf Chromosom 9 von *P. falciparum*. Das Gen das für das Merozoiten Oberflächen Protein codiert besteht aus verschiedenen Regionen die sich in ihrem „Konservierungsgrad“ unterscheiden. Die Genstruktur besteht aus 17 Blöcken, woraus eine Zahl konstanter, semi-variabler und variabler Gruppen resultiert. Von besonderem Interesse ist der polymorphe Block 2 (Abbildung 3). In diesem Genabschnitt lassen sich drei nach verschiedenen Referenzstämmen benannte Allelfamilien MAD20, K1 und RO33 differenzieren. Durch Längenpolymorphismen innerhalb einer Familie ist eine genaue Charakterisierung möglich.

Abbildung 3:

Schematische Darstellung der Gene die für MSP1 und MSP2 codieren [199]



1.7.2 MSP2

Die genetische Information für MSP2 befindet sich auf Chromosom 2. Das codierende Gen beinhaltet zwei konstante Regionen, die eine zentrale, polymorphe Wiederholungsregion umschließen. Mit etwa 45 kDa ist es aber wesentlich kleiner als das MSP1 Antigen (Abbildung 3.). Hinsichtlich der unterschiedlichen Sequenzfolge können in dieser „repeat region“ zwei Allelfamilien (IC und FC27) unterschieden werden. Wie bei MSP1 ist auch in diesem Genabschnitt extensiver Längenpolymorphismus zu beobachten.

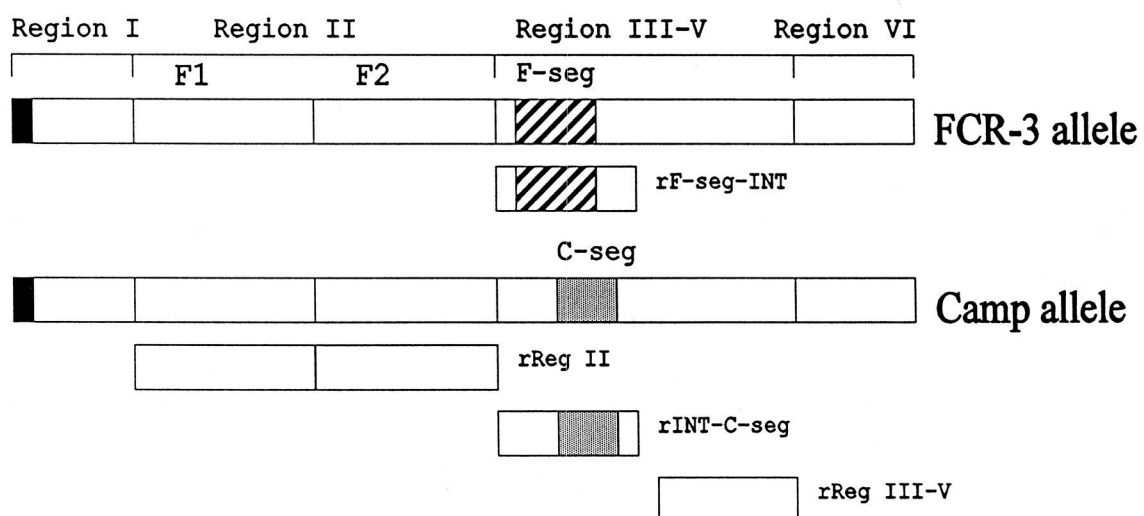
1.8 Erythrozyten-bindendes Antigen (EBA-175)

Zusammen mit dem „Duffy-binding protein“ von *Plasmodium vivax* (PvDBP) gehört EBA-175 zur Familie der DBL-EB Proteine (Duffy-binding-like erythrozyte-binding proteins) [129]. Diese Proteinfamilie ist charakterisiert durch N-terminale Signalpeptide, cysteinreiche DBL Domänen und einer transmembranen Domäne mit einem kurzen cytoplasmatischen Ende.

Das EBA-175 Gen ist auf dem Parasitenchromosom 7 lokalisiert und besteht aus vier Exons [153]. Das große Exon 1 ist in sechs Regionen unterteilt, welche für zwei DBL Tandemregionen in Region II (F1 und F2) codieren. Diese bilden mit einer carboxyl-cysteinreichen Region die mutmaßliche Bindungsstelle.

Abbildung 3a:

Schematische Darstellung der von Exon1 codierten extrazellulären Domäne [124]



Auf Grund seines mitotischen Vermehrungszyklus muß *P. falciparum* in die Erythrozyten eindringen. Die Invasion des Parasiten hängt von einer Aufeinanderfolge schneller Reaktionen zwischen Erreger- und Wirtsmolekülen ab. An dieser Kaskade die das Eindringen des Protozoen in die roten Blutkörperchen zur Folge hat ist ein 175 kDa Protein EBA-175 (engl. erythrocyte-binding antigen-175) beteiligt. Der Invasionsvorgang ist in mehrere Stufen gegliedert und nach ca. 30 Sekunden abgeschlossen (siehe Abbildung 4).

EBA-175 befindet sich in einer der oberen Organellen (engl. Micronemes) am apikalen Ende des Merozoiten [19]. Die mechanischen Vorgänge die bei der Invasion in den Erythrozyten eine Rolle spielen sind seit 1978 grob beschrieben [2]. Über die Stoffwechsellaskaden, die genauen Mechanismen und die molekulare Steuerung ist kaum etwas bekannt. Nach der Sezernierung von EBA-175 bildet sich eine Verbindung zwischen Erythrozytenoberfläche und Merozoit aus. Das Erythrozyten-bindende Antigen bindet mit seiner cysteinreichen Region II an die Sialinsäureabhängige Seite des Glykophorin A, einen Rezeptor auf der Erthrozytenoberfläche.

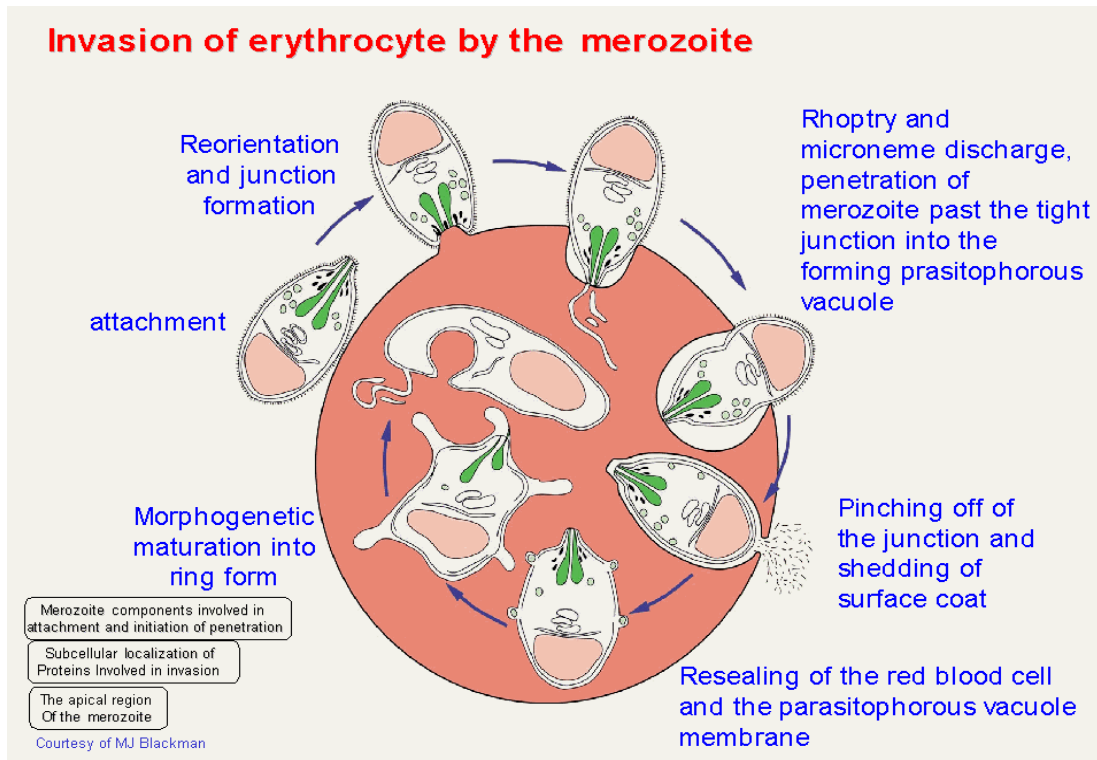
Der Genabschnitt der für dieses Antigen codiert, wurde von zwei *Plasmodien* Stämmen (FCR-3, cAMP) sequenziert und entschlüsselt [176]. Bezüglich der Sequenz ergaben sich lediglich Unterschiede in Region III des Genoms. Der FCR Stamm enthält 1462 Aminosäuren, wogegen der Abschnitt aus dem Gen des cAMP Stammes nur 1435 AS aufweist und somit um 27 AS kürzer ist. Der einzige Unterschied liegt in einem 423 bp (FCR-Stamm) respektive einem 342 bp (cAMP-Stamm) langen Fragment. Jeder bis jetzt untersuchte Parasit der *Malaria tropica* verursacht exprimiert entweder das F- oder das C-Fragment jedoch nie beide.

Da die Sequenzen an verschiedenen Orten im Genom inseriert sind wäre es denkbar, daß es auf Grund einer Mutation oder eines crossing-over Ereignisses, einen Parasiten mit beiden Varianten gibt. Bis zum heutigen Tag ist kein solches Isolat gefunden worden, so daß einiges für die These spricht, daß sich durch solch eine Veränderung ein Selektionsnachteil für das Individuum ergibt. Im Umkehrschluß heißt das natürlich, daß sich in einigen Gebieten ein Vorteil für die eine oder andere Variante bieten kann. Die dimorphe Struktur von EBA-175 ist bekannt, aber die Rolle und Aufgabe dieses Dimorphismus ist noch nicht geklärt.

Binks et. al. (1999) vermutet einen Zusammenhang zwischen den dimorphen Regionen und der Bindung zu Glykophorin-A [20]. In anderen Studien konnte bis jetzt noch kein Zusammenhang zwischen Rezeptorsensitivität und der Invasion bewiesen werden [165].

Abbildung 4:

Invasionsprozeß des Merozoiten in den Erythrozyten [200]



In *in vitro* Versuchen gelang der Nachweis das Antikörper gegen EBA-175 das Eindringen der Parasiten in die roten Blutzellen verhindern können. An Affen die mit einem *Plasmodium falciparum* EBA-175 Region II „Impfstoff“ behandelt wurden, kam es im Vergleich zu unbehandelten Tieren *in vivo* zu einem signifikant erhöhten antiparasitärem Effekt [89]. Diese Tatsachen und die weiterhin nicht eindeutig geklärte Aufgabe von EBA-175 beim Invasionsprozess macht es als potentiellen Impfstoffbestandteil interessant.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Durch die steigende Zahl von Fernreisen in tropische Länder kommt es zu einer erhöhten Exposition der Reisenden mit tropischen Krankheitserregern. Dadurch besteht eine verstärkte Infektionsgefahr und ein erhöhtes Risiko an einer Tropenkrankheit zu erkranken. Unser Immunsystem kann auf solche Infektionen oftmals nur ungenügend reagieren, sodaß bei nicht rechtzeitig begonnener adäquater Therapie die Krankheit einen schweren Verlauf nehmen kann.

Protozoosen, zu denen auch der Erreger der Malaria zählt, bilden neben anderen Infektionen durch Bakterien, Pilze oder Viren einen der größten Pools an importierten Infektionskrankheiten.

Durch den Import solcher Erreger ergeben sich verschiedenste Probleme in der Diagnostik, Therapie und Prävention.

Malaria nimmt auf Grund Ihrer hohen Morbidität und Mortalität weltweit eine Sonderstellung ein.

Jedes Jahr verreisen etwa 3 Millionen Deutsche ca. 3-4 Wochen in ein Malaria-Endemiegebiet. Über 2/3 der importierten Malariafälle lassen sich auf eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* zurückführen. Da die Malaria *tropica* die gefährlichste Art der Erkrankung ist und tödlich enden kann, ist es wichtig rechtzeitig geeignete Therapie- oder Prophylaxemaßnahmen zu ergreifen. Durch die zunehmende Anzahl der *Falciparum*-Resistenzen gegen herkömmliche Medikamente, wird die Therapie und die Chemoprophylaxe erschwert. Versuche die Malariasituation zu kontrollieren, schlugen in den meisten Gebieten fehl und scheiterten an den finanziellen Ressourcen. Diese Maßnahmen führten zur verstärkten Resistenzbildung beim Vektor und Erreger und erschweren somit zusätzlich die Prävention.

Bei zunehmender Resistenz der Malariaerreger gegen Standardtherapeutika ist die genaue Kenntnis der Resistenzlage Voraussetzung für eine geeignete Therapie der Bevölkerung im Endemiegebiet. Sie bildet aber auch die Grundlage für eine adäquate Therapie und Prophylaxe von Reisenden. Fehlende Informationen über die Art und Verbreitung einiger „mehr virulenter“ oder resistenter *Plasmodien*-Stämme führt auf lange Sicht zu einer Verschlechterung der Gesamtsituation im Endemiegebiet, bedingt durch falsche Behandlungsmaßnahmen. Neben *in vivo* Sensitivitätsstudien die meist auf kleinere Gebiete beschränkt sind, werden auch vermehrt molekularbiologische Methoden eingesetzt um Entwicklungen der Resistenzlage zu überwachen und Änderungen, die eventuell andere Behandlungsschemata erfordern, frühzeitig zu erkennen.

Die Ziele der Arbeit waren die:

- a. Auswertung und Analyse von Patientendaten bei importierten *Plasmodium falciparum* Malariainfektionen aus der TropNetEurop Datenbank
- b. Verteilung und Prävalenz des EBA-175 Proteins
- c. Verteilung und Prävalenz der Merozoiten-Oberflächen Proteine 1 und 2
- d. Etablierung und Evaluation von molekularen Markern zur Resistenzdiagnostik anhand von *P. falciparum* Isolaten
- e. Verteilung und Prävalenz von Punktmutationen bei *Plasmodium falciparum* die mit Medikamentenresistenz assoziiert sind, auf dem
 - DHFR-Gen (Codon 51, 59, 108)
 - DHPS-Gen (Codon 436, 437, 540, 581, 613)
 - *Pfcr*t-Gen (Codon 76)
 - *Pfmdr*1-Gen (Codon 86, 1042, 1246)
 - Cytochrom-bc₁-Gen (Codon 286)
- f. Identifikation von Assoziationen zwischen verschiedenen molekularen Markern von *Plasmodium falciparum*
 - und dem klinischen Verlauf der Malaria tropica.
 - und Charakterisierung der Parasiten-Wirts-Interaktion bei klinischer Malaria zwischen semi- und nicht-immunen Individuen innerhalb eines Endemiegebietes

Als Untersuchungsmaterial dienten Blutproben auf Whatman-Filterpapier 3MM™ von Patienten die in einer „study site“ von TropNetEurop vorstellig wurden, und bei denen sich eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* bestätigte.

In großen Studiengebieten ist nur wenig über die Verteilung und die Art von Punktmutationen bzw. Polymorphismen auf den *Plasmodium falciparum* Genen bekannt. Diese Untersuchung soll helfen, sich ein genaueres Bild über die Epidemiologie, die Prävalenz einzelner Stämme und die Resistenzlage vor Ort zu machen.

Diese Studie könnte Aufschluß über die Verbreitung und Virulenz verschiedener *Plasmodium falciparum* Stämme, sowie deren Einfluß auf Morbidität und Mortalität geben.

3 Proben

3.1 TropNetEurop

Ausgehend von einer Initiative der AG "Importierte Infektionen" der Abteilung Infektions- und Tropenmedizin der Universität München wurde im Februar 1999 das European Network on Imported Infectious Disease Surveillance (TropNetEurop) gegründet.

3.1.1 Aufbau und Ziele

Inhaltlich liegt die Betonung des Netzwerkes auf einem Zusammenschluß klinischer Zentren mit infektiologischem und tropenmedizinischem Schwerpunkt. Hierdurch ist der direkte Patientenkontakt gewährleistet, was sowohl die Qualität der detaillierten Datenerfassung verbessert als auch die Möglichkeit zur Durchführung klinischer Studien bietet. TropNetEurop dient der Erfassung eines breiten Spektrums importierter Infektionskrankheiten, insbesondere auch solcher die nicht meldepflichtig sind. Die Kooperation auf europäischer Ebene ermöglicht den Austausch von Informationen verschiedener nationaler Gesundheitssysteme und bietet die Möglichkeit multizentrische Forschungsprojekte, mit vergleichsweise geringem Aufwand, durchzuführen und zu koordinieren.

Ziel des Netzwerkes sind unter Anderem:

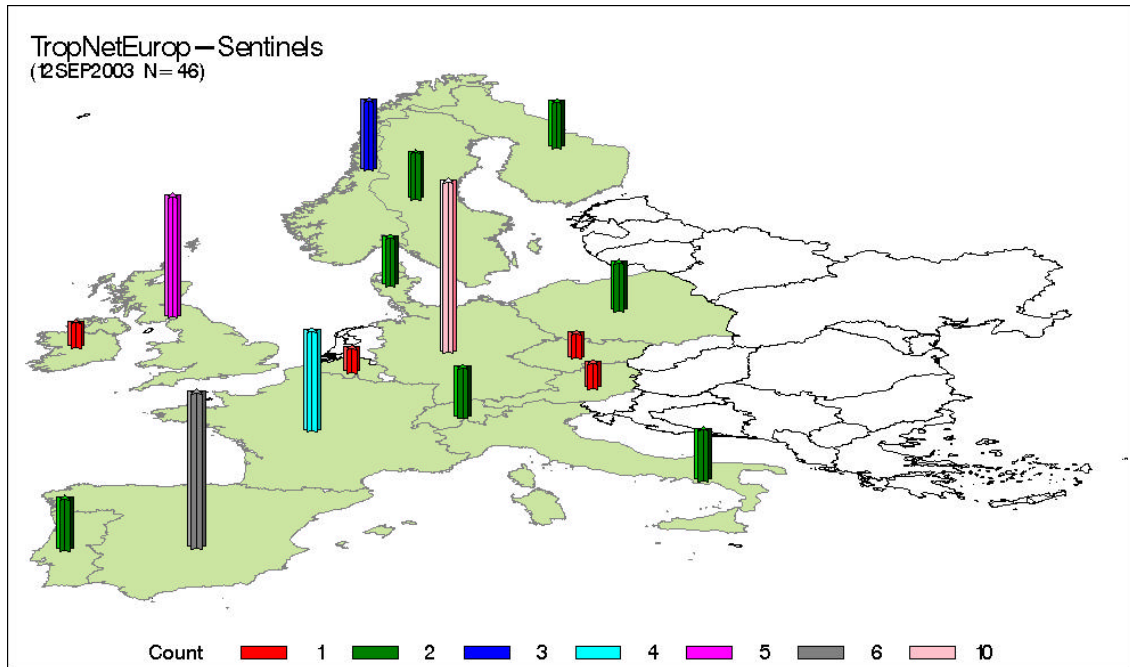
- Die Identifizierung von neuen Trends bei importierten Infektionskrankheiten, bei spezifischen Pathogenen, Risikofaktoren und klinischen Verläufen in der erfaßten Population.
- Die Bereitstellung von epidemiologischen Daten, Informationen und klinischer Kompetenz für detaillierte Untersuchungen ggf. auch Interventionsmaßnahmen.
- Schaffung einer Basis für klinische Forschungsprojekte zu infektiologischen Fragestellungen.

Im Rahmen der Arbeit von TropNetEurop gelang im Februar 2000 die Identifikation einer Kleinepidemie von Fällen importierter Malaria tropica aus der Dominikanischen Republik nach Europa [82].

Das Netzwerk besteht zur Zeit aus 46 Mitgliedern, die sich aus den führenden tropenmedizinischen Institutionen in 15 europäischen Ländern rekrutieren. Der klinische Verbund behandelt jährlich ca. 63.000 Patienten nach ihrer Rückkehr von einer Reise. Das elektronische Netzwerk ist in der Lage ungefähr 12% der nach West- und Zentraleuropa importierten Malariafälle zu melden (www.tropnet.net).

Abbildung 5:

Verteilung der TropNetEurop Zentren

**3.1.2 Meldewesen**

Durch jeden Partner von TropNetEurop erfolgt eine anonymisierte und standardisierte Erfassung von Patienten und Daten. Die Datenerfassung erfolgt mittels Computer über eine fertige Eingabemaske (<http://www.tropnet.net>) oder per FAX mit einem standardisierten Fragebogen. Die Daten werden kontinuierlich aber mindestens einmal pro Monat an die koordinierende Stelle weitergeleitet und dort ausgewertet (Fragebogen siehe Kapitel 11).

3.2 Patientenkollektiv

Im Rahmen einer prospektiven Querschnittsstudie wurden von April 2000 bis Juli 2003 insgesamt 574 Proben gesammelt. Untersucht wurden Blutproben von *P. falciparum* infizierten Patienten die in einer zum TropNetEurop Netzwerk gehörenden Klinik vorstellig wurden. Die Einschlusskriterien waren eine bestehende und im Ausland erworbene Infektion mit dem Erreger der Malaria tropica. Die Rekrutierung der Teilnehmer, die Abnahme von Blut und das Ausfüllen der TropNetEurop Fragebögen erfolgte durch die vor Ort niedergelassenen Ärzte.

Kinder und Erwachsene beider Geschlechter im Alter von 5 Monaten bis zu 79 Jahren wurden in die Studie aufgenommen. Das Kollektiv bestand aus nicht-immunen Tropenrückkehrern und Touristen und aus Immigranten, Flüchtlingen und ausländischen Besuchern.

Einschlusskriterien:

- keine Altersgrenze
- *Plasmodium falciparum* Monoinfektion
- erfaßte Basisdaten durch Fragebogen (Infektionsregion, etc.)
- Blutprobe (Filterpapier, EDTA-Blut)

Ausschlusskriterien:

- fehlende Information zur Infektionsregion
- Mischinfektionen mit anderen *Plasmodien* Spezies

3.3 Gewinnung und Transport

Vor Beginn einer spezifischen Therapie wurde von jedem Patienten eine Blutprobe zur mikroskopischen Untersuchung, sowie zur eventuellen Durchführung einer PCR genommen. Nach positivem Befund der mikroskopischen Untersuchung (Goldstandard) wurden 10µl Vollblut auf DNA freies Whatman™- 3MM Filterpapier aufgebracht. Nach dem Trocknen der Proben an der Luft über ca. 20 Minuten, wurden die beschrifteten Filter einzeln in Kunststofftütchen verpackt. Nach dem Trocknen des Blutes sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Zur weiteren Untersuchung wurde das Probenmaterial von den beteiligten Zentren per Post in die Abteilung für Infektiologie und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität nach München geschickt. Mit dieser Methode war es möglich die Orte, der Probennahme und der Probenuntersuchung räumlich zu trennen. Zum Einen hatte das den Vorteil, auf einen größeren Patientenpool zurückgreifen zu können und zum Anderen wurde gewährleistet, daß es bei der Untersuchung der „samples“ zu keinen Abweichungen in der Untersuchungsmethodik kam. In einer multizentrischen Studie konnte durch Farnert et al. (2001) bewiesen werden, daß es bei der Untersuchung identischer Proben durch PCR Technik in unterschiedlichen Labors zu abweichenden Ergebnissen kommen kann [50].

4 Material und Methoden

4.1 Nukleotide

Alle folgenden Nukleotide wurden im Laufe der Untersuchung für unterschiedliche PCR Amplifikationen verwendet.

Tabelle 2: Standardisierte Primersequenzen

Bezeichnung	Primersequenz 5' -> 3'
rPLU5	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC
rPLU6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG
rFAL1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT
rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC
rVIV1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC
rVIV2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA
rOVA1	ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA
rOVA2	GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG
M1-OF	CTA GAA GCT TTA GAA GAT GCA GTA TTG
M1-OR	CTT AAA TAG TAT TCT AAT TCA AGT GGA TCA
M2-OF	ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA
M2-OR	CTT TGT TAC CAT CGG TAC ATT CTT
M1-MF	AAA TGA AGG AAC AAG TGG AAC AGC TGT TAC
M1-MR	ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA ATT ACC
M1-KF	AAA TGA AGA AGA AAT TAC TAC AAA AGG TGC
M1-KR	GCT TGC ATC AGC TGG AGG GCT TGC ACC AGA
M1-RF	TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG
M1-RR	CAT CTG AAG GAT TTG CAG CAC CTG GAG ATC
M2-ICF	AGA AGT ATG GCA GAA AGT AAG CCT CCT ACT
M2-ICR	GAT TGT AAT TCG GGG GAT TCA GTT TGT TCG
M2-FCF	AAT ACT AAG AGT GTA GGT GCA AAT GCT CCA
M2-FCR	TTT TAT TTG GTG CAT TGC CAG AAC TTG AAC
EBA1	CAA GAA GCA GTT CCT GAG GAA
EBA2	TCT CAA CAT TCA TAT TAA CAA TTC
EBA3	GAG GAA AAC ACT GAA ATA GCA CAC
EBA4	CAA TTC CTC CAG ACT GTT GAA CAT

TCRP1	CCG TTA ATA ATA AAT ACA CGC AG
TCRP2	CGG ATG TTA CAA AAC TAT AGT TAC C
TCRD1	TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT
TCRD2	CAA AAC TAT AGT TAC CAA TTT TG
pfmdr1-1	AGA TGG TAA CCT CAG TAT CA
pfmdr1-2	TTA CAT CCA TAC AAT AAC TTG
pfmdr1-3	GCG TGT ATT TGC TGT AAG AG
pfmdr1-4	CAG CAT AAC TAC CAG TTA AT
pfmdr1-5	GTG GAA AAT CAA CTT TTA TGA
pfmdr1-6	TTA GGT TCT CTT AAT AAT GCT
MDR1	ATG GGT AAA GAG CAG AAA GA
MDR2	AAC GCA AGT AAT ACA TAA AGT TCA
MDR3	TGG TAA CCT CAG TAT CAA AGA A
MDR4	ATA AAC CTA AAA AGG AAC TGG
M1	TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC
M5	AGT ATA TAC ATC GCT AAC AGA
M3	TTT ATG ATG GAA CAA GAC TGG GAC GTT
F/	AAA TTC TTG ATA AAC AAC GGA ACC TTT TA
M4	TTA ATT TCC CAA GTA AAA CTA TTA GAG CTT C
F	GAA ATG TAA TTC CCT AGA TAT GGA ATA ATT
R2	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA
R/	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA
K	TGC TAG TGT TAT AGA TAT AGG ATG AGC ATC
K/	CTA TAA CGA GGT ATT GCA TTT AAT GCA AGA A
L	ATA GGA TAC TAT TTG ATA TTG GAC CAG GGA TTC
L/	TAT TAC AAC ATT TTG ATC ATT CGC GCA ACC GG
CYTb1	CTC TAT TAA TTT AGT TAA AGC ACA
CYTb2	ACA GAA TAA TCT CTA GCA CC
CYTb3	AGC AGT AAT TTG GAT ATG TGG AGG
CYTb5	GGT TTA CTT GGA ACA GTT TTT AAC AaT G *
CYTb6	TGA ATG GTA CTT TCT ACC AgT T *
CYTb7	ACC TGA ATG GTA CTT TCT ACa ATa T *

*Kleine Buchstaben zeigen einen Basenaustausch (Abweichungen vom Original DNA-Strang) an, um eine geeignete Schnittstelle für ein Restriktionsenzym zu schaffen.

4.2 Enzyme

Jedes Restriktionsenzym braucht spezielle Inkubationsbedingungen, um seine volle Aktivität entfalten zu können. Entscheidend hierfür ist ein Temperaturoptimum und der verwendete Inkubationspuffer. Jedes Enzym ist in der Lage an bestimmten Stellen DNA Sequenzen zu schneiden. Die Nukleotidketten setzen sich aus den vier Basen Adenosin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) zusammen. Ein Codon ist ein Abschnitt mit drei Basen welcher für eine Aminosäure codiert. Folgende Enzyme wurden im Laufe der Untersuchungen verwendet wobei „*“ das Symbol für Schnittstelle bedeutet und „B“ eine beliebige Base ist.

Tabelle 3:

Name des Enzyms mit Temperaturoptimum, Puffer und Erkennungssequenz

Enzym	Inkubationstemperatur	Puffer	Erkennungssequenz
<i>AlwNI</i>	37°C	NEB 4	5' GGATC(N) ₄ *3' 3' CCTAG(N) ₅ *5'
<i>NsiI</i>	37°C	NEB <i>NsiI</i>	5' ATGCA * T3' 3' T * ACGTA5'
<i>SspI</i>	37°C	NEB <i>SpsI</i>	5' AAT * ATT3' 3' TTA * TAA5'
<i>Tsp509I</i>	65°C	NEB 1	5' * AATT3' 3'TTAA *5'
<i>ApoI</i>	50°C	BSA/NEB 3	5' Pu * AATT Pu3' 3' Py TTAA * Py5'
<i>AflIII</i>	37°C	BSA/NEB 3	5' A * C Pu Py GT3' 3' TG Py Pu C * A5'
<i>BsrI</i>	65°C	NEB 3	5' ACTGGN *3' 3'TGAC * CN5'
<i>AluI</i>	37°C	NEB 2	5' AG * CT3' 3' TC * GA5'
<i>BstNI</i>	60°C	BSA/NEB 2	5' CC * A/T GG....3' 3' GG T/A * CC5'
<i>XmnI</i>	37°C	BSA/NEB 2	5' GAANN * NNTTC3' 3' CTTNN * NNAAG5'
<i>MnlI</i>	37°C	BSA/NEB 2	5' CCTC(N) ₇ *3' 3' GGAG(N) ₆ *5'

<i>MspA1 I</i>	37°C	BSA/NEB 4	5' C A/C G * C G/T G....3' 3' G T/G C * G C/A C....5'
<i>Ava II</i>	37°C	NEB 4	5' G * G A/T CC....3' 3' CC T/A G * G5'
<i>Mwo I</i>	60°C	NEB <i>MwoI</i>	5' GCNNNNN * NNGC3' 3' CGNN * NNNNNCG5'
<i>Fok I</i>	37°C	NEB 4	5' GGATG(N) ₉ *3' 3' CCTAC(N) ₁₃ *5'
<i>BstUI</i>	60°C	NEB 2	5' CG * CG3' 3' GC * GC5'
<i>BsaWI</i>	60°C	BSA/NEB 2	5' A/T * CCGG A/T3' 3' T/A GGCC * T/A5'

Die exakte Zusammenetzung der verwendeten Puffer kann im New England Biolabs Katalog "Catalog and Technical Reference 2002-03" eingesehen werden.

4.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien kamen im Laufe der Untersuchungen zum Einsatz:

InstaGene™ Matrix DNA Reinigungskit:	Bio-Rad, München
Taq Polymerase:	5 U/μl, Appligene, Heidelberg
Enzyme (Restriktionsendonukleasen) :	New England Biolabs NEB, Schwalbach
Oligonukleotide (Primer) :	MWG-Biotech AG, Ebersberg
(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 100mM :	Appligene, Heidelberg
DNA 100 bp Leiter:	GIBCO BRL, Eggenstein
Tween 20 (1%):	Merck, Darmstadt
10xPuffer TAE Ultra pure:	Invitrogen Ltd. Paisley, Scotland, UK
DMSO:	Serva, Heidelberg
Natriumacetat:	Roth, Karlsruhe
Orange G:	Sigma, St. Luis, USA
Sucrose:	Sigma, St. Luis, USA
Bromphenolblau:	Sigma, Deisenhofen
EDTA:	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid:	Sigma, Deisenhofen

Ficoll 400:	Sigma,Deisenhofen
Tris:	Sigma,Deisenhofen
Mineralöl:	Sigma,Deisenhofen
NuSieve GTG agarose™:	BMA products, Rocheland, ME, USA
SeaKem LE agarose™:	BMA products, Rocheland, ME, USA
Agarose :	Appligene, Heidelberg

Puffer:

10 x TAE:	0,4 M Tris; 0,2 M Natriumacetat, 0,001 M EDTA; pH 7,5
TE-Puffer :	10 mM Tris/HCl ; 1 mM EDTA ; pH 8,0

Lösungen:Orange-Puffer:

Sucrose	4,00 g
Orange G	0,035 g
H ₂ O dest.	ad 10 ml

Blaupuffer:

Ficoll 400	1,50 g
10% SDS-Lösung	1,00 ml
0,5 M EDTA	2,00 ml
Bromphenolblau	2,60 mg
TE-Puffer	ad 10 ml

4.4 Geräte und Software

Die folgenden Geräte standen zur Verfügung:

Gelelektrophoresekammern:

Bio-Rad DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
PEQLab Easy Coast, OWL, OWI	PQ-Lab Biotechnologie Gmbh, Erlangen
	PQ-Lab Biotechnologie Gmbh, Erlangen
GDS8000®, Ultraviolet-Transilluminator,	UVP Products Ltd., Cambridge, UK
Gelanalyse- und Dokumentationssystem	UVP Products Ltd., Cambridge, UK
Gabit®	UVP Products Ltd., Cambridge, UK
Sartorius, Göttingen Pipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Laminar Flow	Keßler + Luch GmbH, Giessen

PCR-Maschinen:

Uno II	Biometra, Göttingen
TGradient	Biometra, Göttingen
Personal Cyclor	Biometra, Göttingen
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Werke, Staufen

Waagen:

Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen
Sartorius 3716 MP	Sartorius, Göttingen
Sartorius BP210 D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Zentrifugen:

Tischzentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen
Rotana/S	Hettich, Tuttlingen

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 DNA-Extraktion

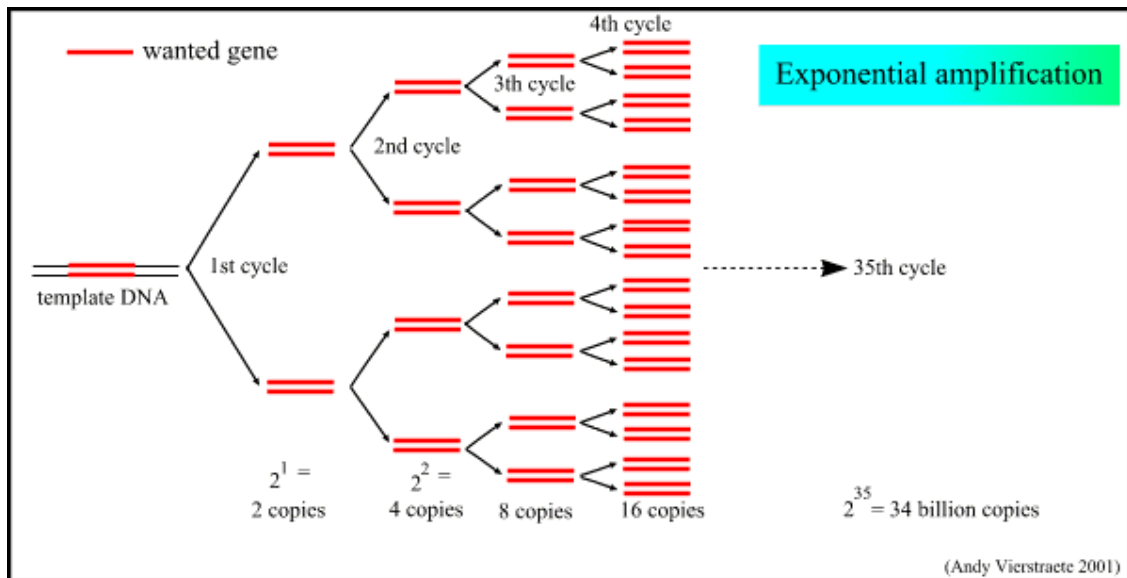
Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion dienten Patientenblutproben (5-10 µl) auf Whatman-Filterpapier, welche getrocknet und danach einzeln in Plastiktüten verpackt wurden. Damit konnte eine Kontamination verhindert und auch bei längerem Transport die Haltbarkeit gewährleistet werden. Zur Extraktion wurde dann ein getrockneter Tropfen Blut ausgeschnitten und in ein 1,5 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß verbracht. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe einer chelatbildenden Matrix (Chelex®). Hierzu wurde in das Eppendorf „tube“ auf den Blutspot 200 µl Chelex® gegeben, die Mischung 30 Sekunden gevortext und für 10-15 Minuten bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte der erste Zentrifugationsschritt von 2 Minuten bei 12.000 U/min. Der Überstand wurde abgenommen in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und erneut 2 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert, um Reste der Matrix zu beseitigen. Das so erhaltene „supernatant“ enthielt die extrahierte DNA und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Lagerung bei -20°C stellt sicher, daß keine Aktivitätseinbußen für die PCR zu befürchten sind. Diese von Kain und Lanar beschriebene Methode [91] ist auch mit zusätzlichen Inkubationsschritten für Vollblut geeignet.

4.5.2 Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. **P**olymerase **c**hain **r**eaction, PCR) ist eine relativ einfache Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Sie ist eine *in vitro* Nachahmung des DNA Replikationsmechanismus, wie sie in jedem Lebewesen bei der Zellteilung vorkommt. Diese Methode ist 1985 von Mitarbeitern einer kalifornischen Biotechnologie Firma unter Anleitung von Kary Mullis entwickelt worden. Es ist möglich von einem genau definierten Abschnitt der Erbsubstanz (engl. **D**eoxyribonucleotidacid, DNA) eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Kopien zu erstellen. Auf Grund der hohen Sensitivität und Schnelligkeit eröffnete diese Methode neue Möglichkeiten in der molekularbiologischen Forschung [146]. Das Grundprinzip der PCR basiert auf drei Reaktionsschritten, die zyklisch wiederholt werden und somit eine exponentielle Vermehrung der DNA Zielsequenz nach sich ziehen (Abbildung 6).

Abbildung 6:

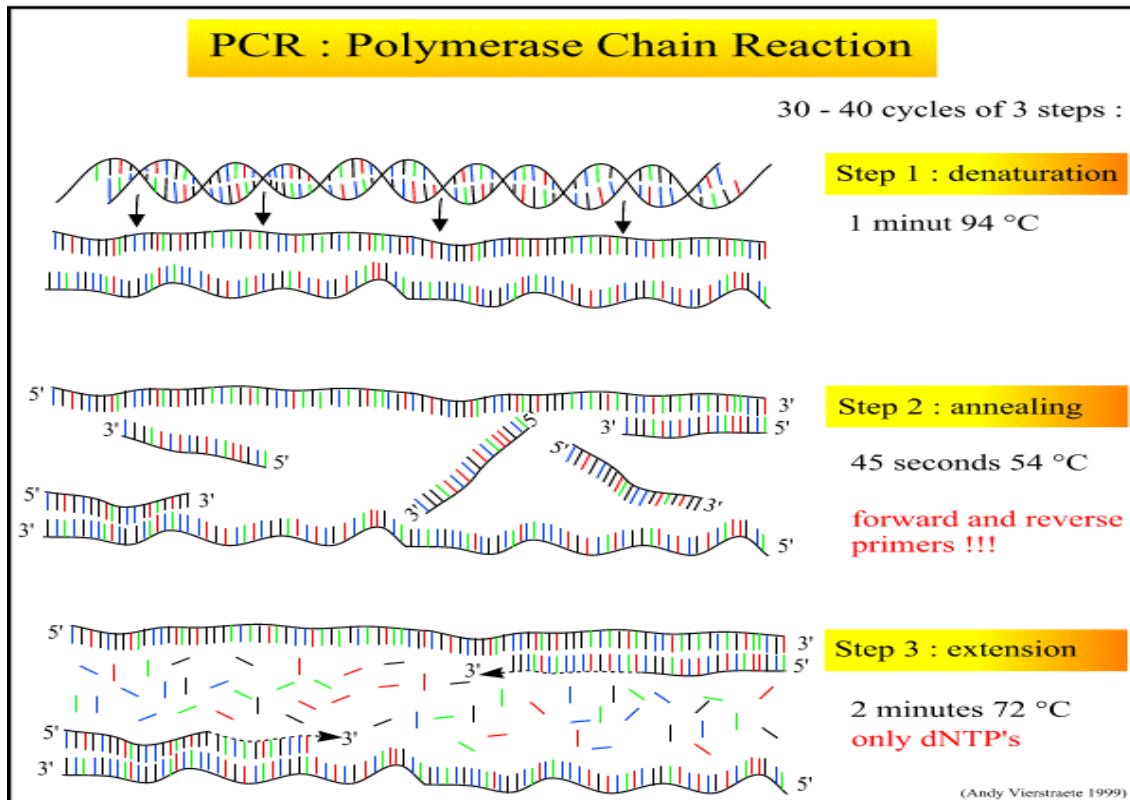
Exponentielle DNA Vervielfältigung [201]



Im ersten Schritt findet eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge statt, d.h. bei 94°C erfolgt eine Trennung der komplementären DNA-Stränge. An die beiden Einzelstränge lagern sich dann im zweiten Schritt bei niedriger Temperatur (ca. 50°C) die Primer an (Annealing). Bei den Primern handelt es sich um synthetische Oligonukleotide die komplementär zu den bekannten Randbereichen der gesuchten Gensequenz sind und dort an die Erbsubstanz binden. Auf Grund ihrer geringeren Größe (ca. 20-30 Basen) und der daraus resultierenden höheren Beweglichkeit, kann eine schnellere Anlagerung (Hybridisierung) an den DNA-Einzelstrang im Vergleich zum zweiten Nativstrang erfolgen. Diese Primersequenzen fungieren im dritten Schritt (Extension) als Startermoleküle für die DNA-Polymerase, die die fehlenden komplementären DNA-Abschnitte entlang der Einzelstränge vom 3' zum 5' Ende synthetisiert (Abbildung 7). Diese Taq-Polymerase ist ein Isolat aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quellen gefunden wird, und arbeitet bei einem Temperaturoptimum von 72°C.

Abbildung 7:

Prinzip der PCR [201]

**4.5.3 Einführung in die RFLP-Technik**

Der Enzymverdau ist eine Methode zur genaueren Untersuchung des jeweiligen Genoms. Zur weiteren Charakterisierung der PCR Produkte werden sie mit Restriktionsendonukleasen inkubiert. Das sind artspezifische, bakterielle Endonukleasen, die Fremd-DNS erkennen und spalten, ohne die durch Modifikation geschützte eigen-DNS anzugreifen. Sie werden zur Fragmentierung und Isolierung spezifischer Genabschnitte auf den Chromosomen, zur Nukleotidsequenzanalyse sowie zur Rekombination von DNS-Molekülen eingesetzt. Sie wurden erstmals aus dem Bakterium *Escherichia coli* isoliert. Inzwischen sind mehr als 2500 verschiedene Spezies bekannt. Mit Hilfe dieser Enzyme ist es möglich DNA in definierte Restriktionsfragmente zu zerlegen. Jedes Restriktionsenzym kann eine spezifische Gensequenz, in der Regel aus etwa vier bis acht Basen bestehend, erkennen. Ist die DNA-Sequenz an den zu Untersuchenden Codons bekannt, kann ein spezifisches Enzym zum Verdau zugesetzt werden, um in dem Genom die Basenpaarabfolge zu identifizieren.

Ist durch Mutation auf einem Chromosom die Schnittstelle verändert, unterscheiden sich die Restriktionsfragmente in ihrer Länge (engl. **R**estriction **f**ragment **l**enght **p**olymorphism, RFLP). Dies läßt Rückschlüsse auf den Wildtyp respektive auf veränderte Aminosäuresequenzen und damit Mutationen zu.

4.5.4 Produktanalyse

Die Analyse der DNA Bruchstücke erfolgte durch eine Gelelektrophorese. Das Verfahren dient zur analytischen und präparativen Trennung verschiedenster Substanzgemische im elektrischen Gleichstromfeld. Durch die Elektrophorese findet ein Transport geladener Partikel durch den elektrischen Strom statt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle wird nicht nur durch ihre Ladung, sondern auch durch ihre Größe bestimmt. Um Amplifikations- und Verdauprodukte sichtbar zu machen wurden zwei unterschiedliche Gelytypen verwendet. Die PCR-Produkte erforderten ein 2% - 3%es Gel aus NuSieve GTG agarose™. Zur Beurteilung des Enzymverdaus fand ein 2,5%es Mischgel aus NuSieve GTG agarose™ und SeaKem LE agarose™ im Verhältnis 3:1 Verwendung. Für die Zubereitung werden die entsprechenden Mengen an Gelpulver eingewogen auf 100 ml mit TAE Puffer aufgefüllt und unter Aufkochen gelöst. Nach Zugabe von 2,5µl Ethidumbromidlösung (10mg/ml) pro 100 ml Gel, wurde das Gemisch in die vorbereiteten Kammern gegossen und bis zum Erkalten stehen gelassen. In jede Geltasche wurde dann eine Mischung aus der zu untersuchenden DNA-Probe (8-10µl) und 2µl Orange Puffer pipettiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 30-70 Volt für 60-240 Minuten in TAE-Puffer. Als Standard für die Längenmessung laufen in jedem Agarosegel mehrere 100 bp DNA-Leiter mit. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und ermöglicht so eine Auswertung mit UV-Licht. Zur Dokumentation erfolgte eine Aufnahme und Speicherung jedes Gels mit dem GDS 8000® Ultraviolett Transilluminator in Verbindung mit der speziellen Verarbeitungssoftware Grabit®.

4.5.5 Maßnahmen zur Sicherstellung der Ergebnistreue

Um ein möglichst reproduzierbares und zuverlässiges Ergebnis zu erzielen und um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die verschiedenen Arbeitsschritte der PCR und RFLP in drei unterschiedlichen Laborräumen durchgeführt. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde in jedem Ansatz eine positive und eine negative Kontrolle mit ausgetestet.

Jede DNA Probe wurde durch ein kontrolliertes und standardisiertes Verfahren (siehe Punkt 4.5.1) extrahiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Damit der gesamte Ansatz als ein auswertbares Ergebnis zählte mußte sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle in der Auswertung der Elektrophoresegele als positiv bzw. negativ erscheinen. Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn sie eine erkennbare Bande in der zu erwartenden Länge des Amplifikats lieferte.

4.5.6 Statistische Methoden und Datenanalyse

Alle Daten wurden zunächst in Microsoft Access 2000® eingegeben. Vor der Analyse wurden die Daten überprüft und anschließend in das Statistikprogramm Epi Info 2000/2002™ (The Division of Surveillance and Epidemiological Studies, Epidemiology Program Office, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA und The Global Program on AIDS, WHO, Geneva, Switzerland) eingelesen. Dieses Programm enthält alle notwendigen deskriptiven und prüfstatistischen Verfahren die zur Analyse der Daten nötig sind. Es fanden sowohl parametrische als auch non-parametrische Verfahren Verwendung.

4.5.7 *Plasmodium falciparum* –Stämme

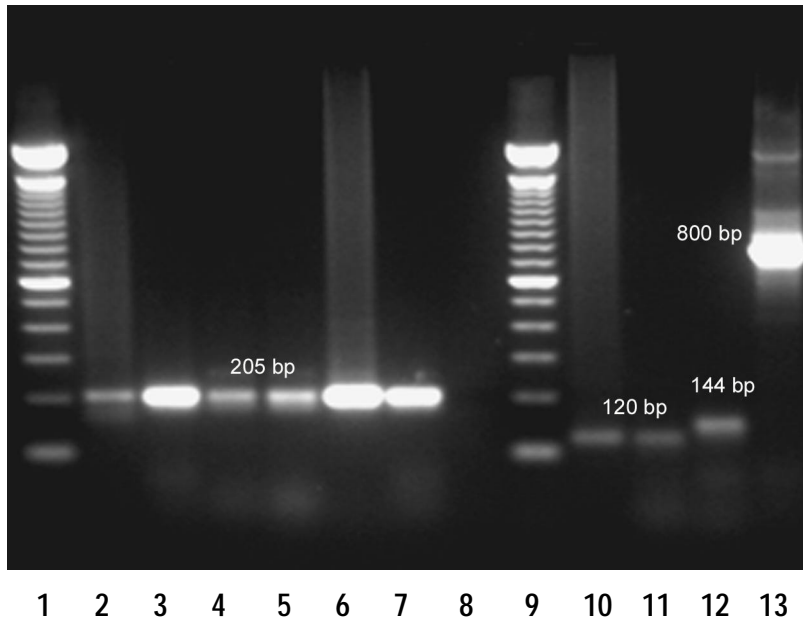
Als Positivkontrollen für die PCR und den Enzymverdau dienten verschiedenste *Plasmodium falciparum* Stämme. Diese wurden genau wie die DNA der Patientenproben in einem Extraktionsvorgang mit Hilfe der Chelex-Methode isoliert. Alle verwendeten Referenzen codieren an den zu untersuchenden Genloci entweder für die entsprechenden Mutationen oder den Wildtyp.

4.6 Einsatz der PCR im Rahmen populationsgenetischer Untersuchungen

4.6.1 Nachweis der Spezies *Plasmodium falciparum*

Alle Proben wurden zunächst mit Hilfe einer „nested PCR“ auf eine *Plasmodium falciparum* Infektion getestet. Um auf spezifische *Plasmodium* ssrRNA Gene zu prüfen wird die extrahierte DNA einer ersten Amplifizierung unterzogen. Die Primerpaare rPLU5 und rPLU6 sind genus-spezifische Oligonukleotide (Nest1). Durch eine anschließende zweite Amplifikationsrunde mit dem DNA-Template aus Nest1 und den Spezies spezifischen Primern rFAL1 und rFAL2 gelingt der direkte Nachweis von *Plasmodium falciparum*. Bei einem negativen Ergebnis wurden die Proben mit Hilfe weiterer spezies-spezifischer Nukleotide (rVIV1&rVIV2, rOVA1&rOVA2, rMAL1&rMAL2) auf die drei anderen humanpathogenen *Plasmodium* Arten untersucht. Bei einer erfolgreichen Amplifikation wurden folgende Banden erhalten:

Erreger	Bandenlänge
<i>Plasmodium falciparum</i>	205 bp
<i>Plasmodium vivax</i>	120 bp
<i>Plasmodium ovale</i>	800 bp
<i>Plasmodium malariae</i>	144 bp

Abbildung 8:PCR-Produkte der *Plasmodien* Spezies Bestimmung

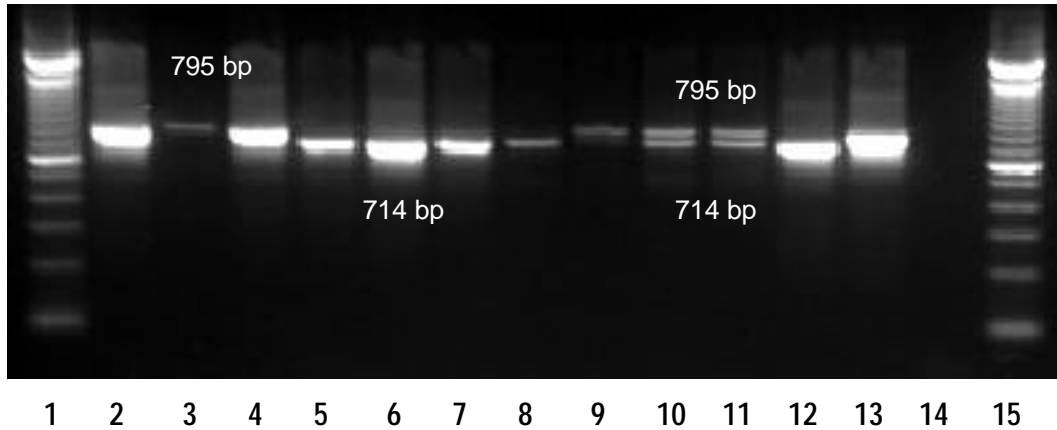
- | | | | |
|-------|---|-----|---|
| 1, 9: | DNA Leiter (100 bp) | 10: | Patientenprobe |
| 2-5: | Patientenproben | 11: | Positivkontrolle (<i>P. vivax</i>) |
| 6-7: | Positivkontrolle (<i>P. falciparum</i>) | 12: | Positivkontrolle (<i>P. malariae</i>) |
| 8: | Negativkontrolle | 13: | Positivkontrolle (<i>P. ovale</i>) |

4.6.2 Nachweis von EBA-175

Um die beiden Gen Fragmente des Erythrozyten-bindenenden Antigen-175 zu bestimmen wurde eine „nested PCR“ durchgeführt. In Runde 1 fanden die Primer EBA1 und EBA2 Verwendung. Durch die anschließende Amplifizierung mit den Oligonukleotiden EBA3 und EBA4 erfolgte eine Differenzierung der Parasiten in „F- bzw. C-Stämme“. Die PCR Reaktion für Nest1 und Nest 2 verlief in folgenden identischen Schritten. Denaturierung bei 94°C für 5 Min., gefolgt von einer Denaturierung bei 95°C für 1 Min., einer Primer-Hybridisierung bei 56,4°C für 1 Min. und der Extension bei 72°C für 2 Min. Die Schritte 2 bis 4 wurden 30 Mal zyklisch wiederholt. Nach einer abschließenden Inkubationszeit von 3 min bei 72°C erfolgte die Abkühlung des Ansatzes auf 20°C. Eine Probe wurde als positiv bewertet wenn nach Ablesen des Elektrophoresegels eine 795 bp Bande für das F-Fragment und eine etwa 714 bp lange Bande für das C-Fragment sichtbar wurde.

Abbildung 9:

PCR-Produkte der EBA-175 Bestimmung



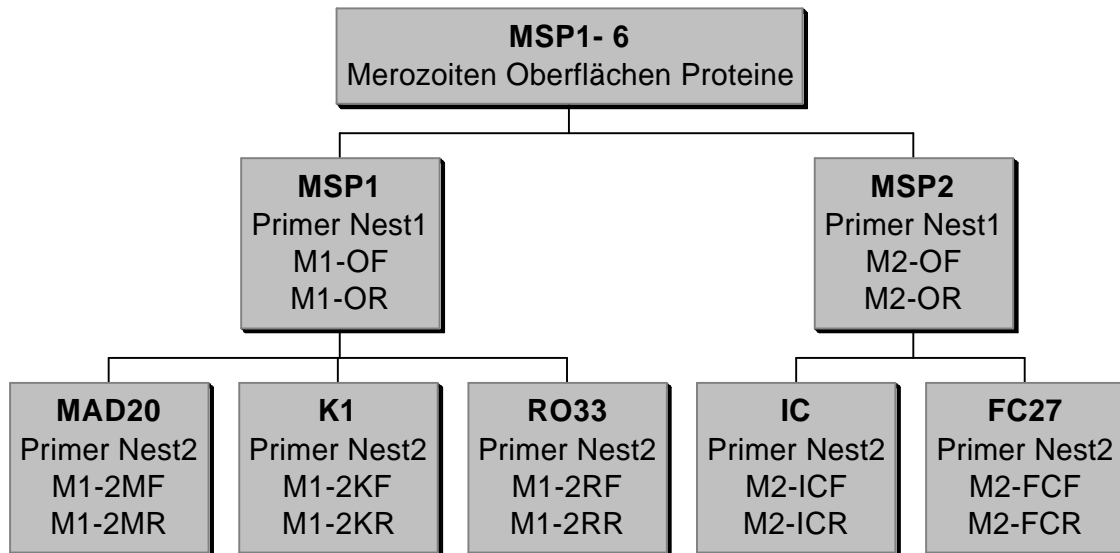
- | | | | |
|--------|------------------------------|-----|-------------------------------|
| 1, 15: | DNA Leiter (100 bp) | 12: | Positivkontrolle (C-Fragment) |
| 2-4: | Patientenproben (F-Fragment) | 13: | Positivkontrolle (F-Fragment) |
| 5-8: | Patientenproben (C-Fragment) | 14: | Negativkontrolle |
| 9-11: | Mischinfektion | | |

4.6.3 Genotypisierung von MSP1 und 2 Allelfamilien

Für die Genotypisierung wurde die von Snounou et. al (1993) etablierte „nested Polymerase-Kettenreaktion“ mit leichten Veränderungen durchgeführt (siehe Punkt 4.8.2). Als genetische Marker dienen die polymorphen Regionen von zwei *Plasmodium falciparum* Genen: Das merozoite surface protein 1 und MSP2.

Abbildung 10:

Amplifikationsschritte der PCR zum spezifischen Nachweis allelischer MSP1/2 Familien

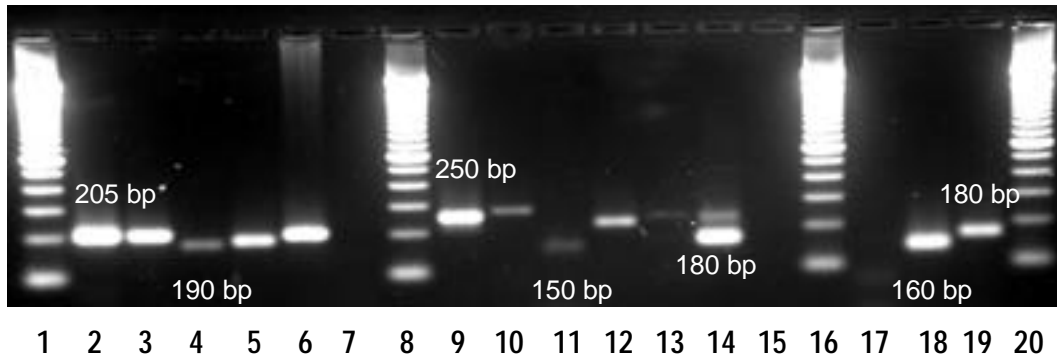


Die erste Reaktion (PFG-Nest1) amplifiziert die Blöcke 2 und 4 von MSP1 mit Hilfe des Primerpaares M1-OF/M1-OR und das ganze Gen von MSP2 mit den Primern M2-OF und M2-OR. Darauf folgen jeweils drei (MSP1) respektive zwei (MSP2) getrennte weitere Amplifikationen (PFG-Nest2) um spezifisch unter den Allelfamilien MAD20, K1, RO33 und IC, FC27 zu unterscheiden. Die genauen Sequenzen (s. Tabelle 2) und die Reaktionsbedingungen sind unter Punkt 4.8.2 beschrieben. Für eine erfolgreiche Amplifikation waren die folgenden Bandenlängen charakteristisch.

Allelfamilie	Bandenlänge (bp)
MAD20	100-300
K1	100-350
RO33	160,170,180
IC	320-1200
FC27	180-700

Abbildung 11:

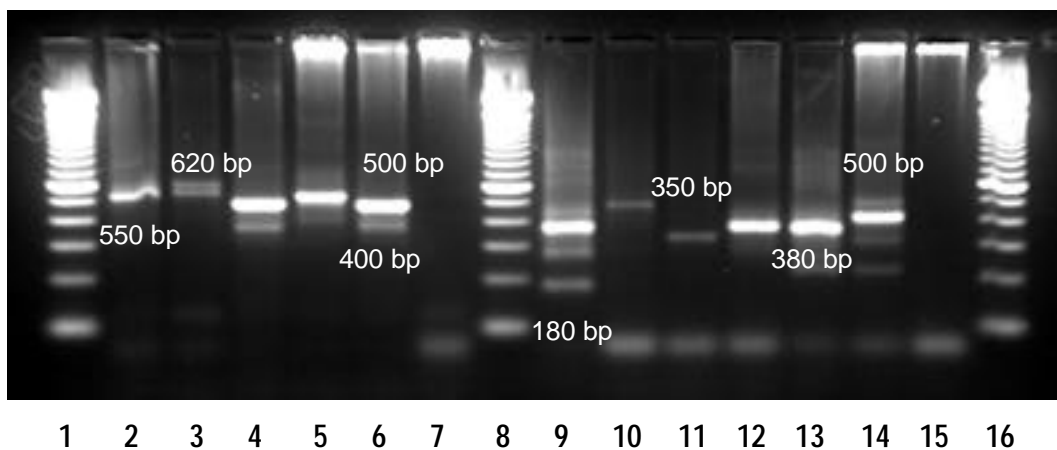
Agarosegel mit PCR Amplifikationsprodukten der MSP1 Genotypisierung



- | | | | |
|---------------|--------------------------|-------|-------------------------|
| 1, 8, 16, 20: | DNA Leiter (100 bp) | 9-13: | Patientenproben (K1) |
| 2-5: | Patientenproben (MAD20) | 14: | Positivkontrolle (K1) |
| 6: | Positivkontrolle (MAD20) | 18: | Patientenprobe (RO33) |
| 7, 15, 17: | Negativkontrolle | 19: | Positivkontrolle (RO33) |

Abbildung 12:

Agarosegel mit PCR Amplifikationsprodukten der MSP2 Genotypisierung



- | | | | |
|-----------|-----------------------|--------|-------------------------|
| 1, 8, 16: | DNA Leiter (100 bp) | 7, 15: | Negativkontrolle |
| 2-5: | Patientenproben (IC) | 9-13: | Patientenproben (FC27) |
| 6: | Positivkontrolle (IC) | 15: | Positivkontrolle (FC27) |

4.7 PCR und RFLP Standardmethoden zum Nachweis von Medikamentenresistenz bei *Plasmodium falciparum*

Um Aussagen über mögliche Polymorphismen und Mutationen auf den Resistenzgenen des Erregers machen zu können ist zur genaueren Untersuchung des Parasiten-Genoms, eine kombinierte Methode aus einer nested PCR mit anschließendem Enzymverdau (RFLP) nötig. Wie bereits beschrieben wurden hierzu die PCR-Produkte mit bakteriellen Enzymen sog. Restriktionsendonukleasen inkubiert. Nach anschließender Elektrophorese lassen sich charakteristische Bandenmuster auf den Agarosegelen detektieren.

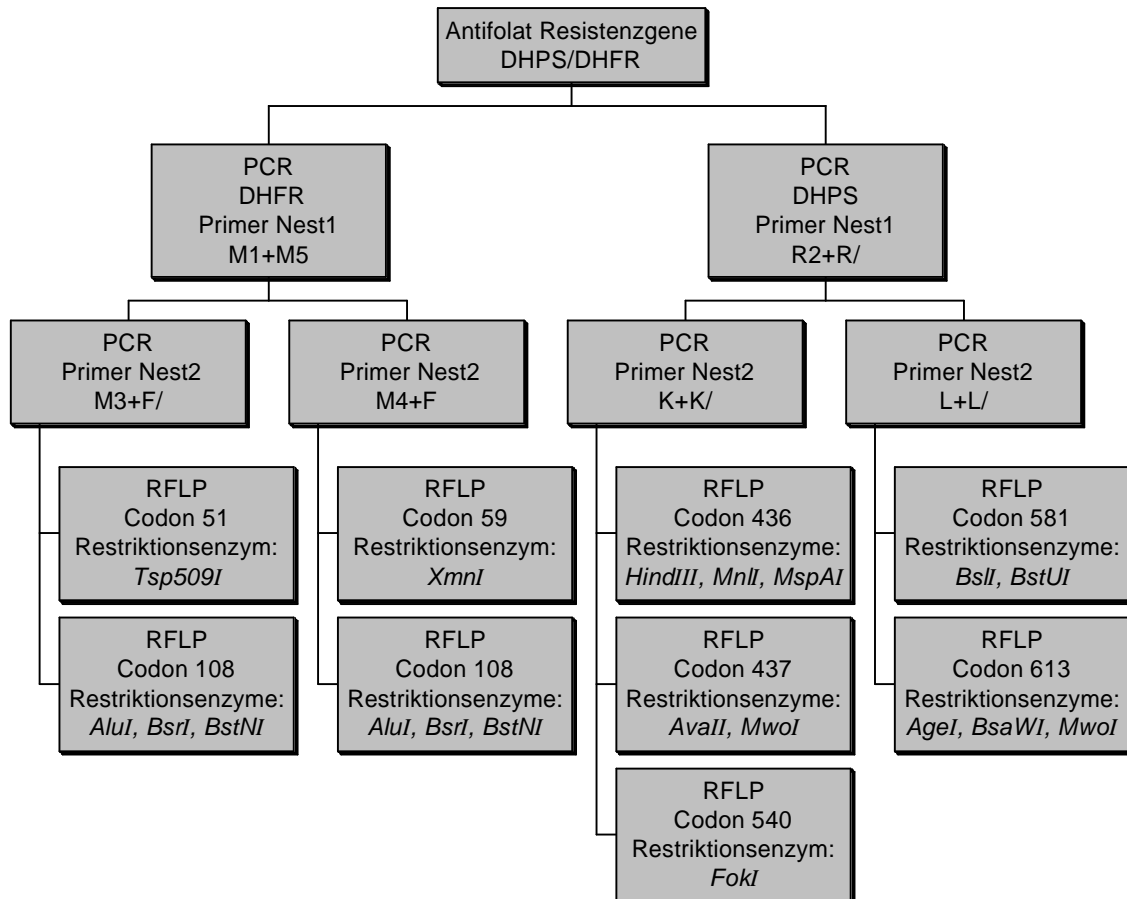
Als Positiv- und Negativkontrollen für die PCR-Amplifikation, als auch für einen Enzymverdau dienten mehrere bekannte *Falciparum*-Laborstämme, welche die entsprechenden Mutationen oder Wildtypen an den zu bestimmenden Genloci aufwiesen.

4.7.1 Polymorphismen in der DHFR und DHPS Gensequenz

Für die Auswertung der Polymorphismen auf den DHFR/DHPS Genen wurde eine „nested PCR“ Methode eingesetzt. In der ersten Amplifikationsrunde wurde mit dem Primerpaar M1 und M5 ein Abschnitt innerhalb des DHFR-Genes erhalten. In gleicher Weise wurde mit Hilfe des Oligonukleotidpaares R2 und R1 ein Abschnitt aus dem DHPS-Gen von *Plasmodium falciparum* amplifiziert. Für die zweiten Amplifikationsrunden (Nest2) war eine Aufteilung des „templates“ aus Nest 1 notwendig (Abbildung 13). Reaktionsbedingungen für PCR und RFLP und die genauen Primersequenzen der Reaktionen sind unter Abschnitt 4.1 bzw. 4.8.3 aufgelistet.

Abbildung 13:

PCR und RFLP-Schrittsschema zum Nachweis von Mutationen auf dem DHFR- und DHPS Gen von *Plasmodium falciparum*

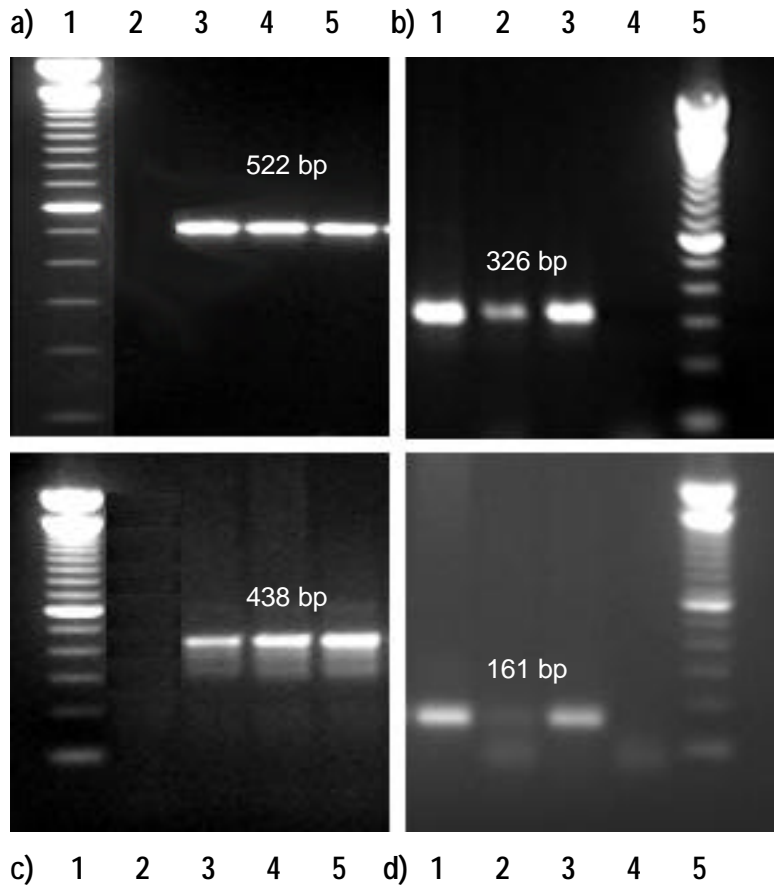


Im Fall des DHFR Genes erfolgte eine Separation und die anschließende Vervielfältigung der DNA mit den Primern M3 und F/ (Bande bei 522 bp) und mit F und M4. Mit dem Paar F und M4 konnte bei positivem Verlauf ein Amplifikat von 326 Basenpaaren abgelesen werden.

Im DHPS Gen erhielt man für K und K/ eine Bande bei 438 bp und für L und L/ eine Bande bei 161 bp (Abbildung 14).

Abbildung 14:

PCR Amplifikationsprodukte der Primerpaare M3+F/ und F+M4, sowie des Primerpaares K+K/ und L+L/



- | | |
|------------------------|------------------------|
| a) <u>Primer M3+F/</u> | b) <u>Primer M4+F</u> |
| 1: DNA Leiter (100 bp) | 1, 2: Patientenproben |
| 2: Negativkontrolle | 3: Positivkontrolle |
| 3, 4: Patientenproben | 4: Negativkontrolle |
| 5: Positivkontrolle | 5: DNA Leiter (100 bp) |

- | | |
|------------------------|------------------------|
| c) <u>Primer K+K/</u> | d) <u>Primer L+L/</u> |
| 1: DNA Leiter (100 bp) | 1, 2: Patientenproben |
| 2: Negativkontrolle | 3: Positivkontrolle |
| 3, 4: Patientenproben | 4: Negativkontrolle |
| 5: Positivkontrolle | 5: DNA Leiter (100 bp) |

4.7.2 DHFR-Gen (Codon 51, 59, 108)

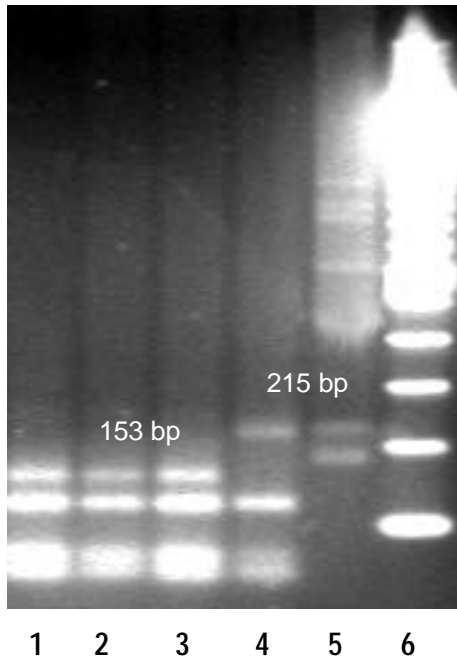
Um die allelischen Polymorphismen der Codons 51, 59 und 108 des DHFR Genes zu untersuchen wurden verschiedene Verdaureaktionen durchgeführt.

Tabelle 4: Aminosäuren des DHFR-Gen

Codon:	51	59	108
Wildtyp:	Asn	Cys	Ser
Mutation:	Ile	Arg	Asn/Thr

➤ Codon 51

Bei positivem Verdau mit dem Enzym *Tsp509I* zeigten sich Banden bei 153 bp und 62 bp. Dazu ergaben sich Fragmente in den Längen 120 bp, 67 bp, 54 bp, 46bp, 10 bp und 5 bp, diese waren jedoch oft nur schemenhaft zu erkennen. Wenn Isoleucin als Mutation anstelle von Asparagin vorlag wurde eine Restriktionsstelle zerstört. Somit ergaben sich nur sechs Schnittstellen für das Enzym mit einer charakteristischen Bande bei 215 bp.

Abbildung 15:Restriktionsverdau mit *Tsp509I*

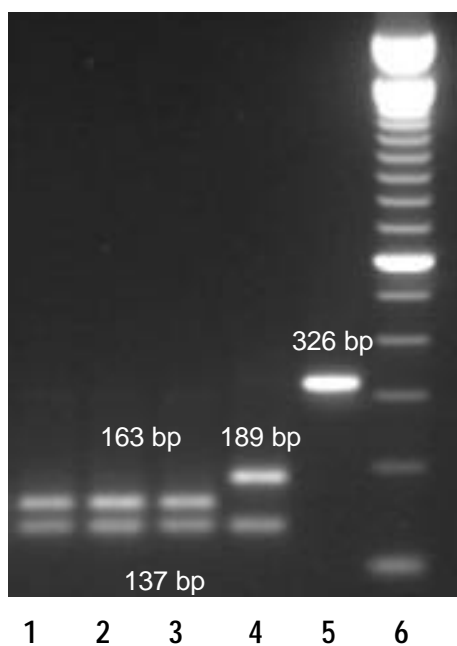
- 1-3: Patientenproben (positiver Verdau: Asn)
- 4: Patientenprobe (negativer Verdau: Isn)
- 5: Negativkontrolle (Isn)
- 6: DNA Leiter (100 bp)

➤ Codon 59

Die *XmnI* Schnittstelle in Codon 59 lag innerhalb eines 189 bp langen Abschnitts. Der Austausch von Cys zu Arg führte zu einer Spaltung dieses Abschnittes in ein 26 bp und ein 163 bp großes Stück. Es gab noch eine weitere Schnittstelle im Bereich von 137 bp. Bei Vorliegen des Aminosäure Wildtyps Cystein wurden dem zur Folge nur 2 Banden bei 189 bp und bei 137 bp sichtbar.

Abbildung 16:

Restriktionsverdau mit *XmnI*



1-3: Patientenproben (positiver Verdau: Arg)

4: Negativkontrolle (Cys)

5: Amplifikationsprodukt M4+F

6: DNA Leiter (100 bp)

➤ Codon 108

Das Codon 108 wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Im Amplifikatverdau mit *AluI* zeigte sich beim Wildtyp Serin eine Bandenabfolge von 326 bp und 196 bp Länge. Im Falle eines Austausches der AS Serin war diese Schnittstelle durch eine Mutation verloren gegangen und es konnte nur ein 522 bp langes Fragment detektiert werden. Um eine eventuelle Mutation genauer spezifizieren zu können wurde ein erneuter „Restriktionscut“ mit den Enzymen *BsrI* und *BstNI* gemacht. Bei positivem Gegenverdau im Falle einer Mutation mit *BsrI* zeigten sich Banden von 332 bp bzw. 190 bp.

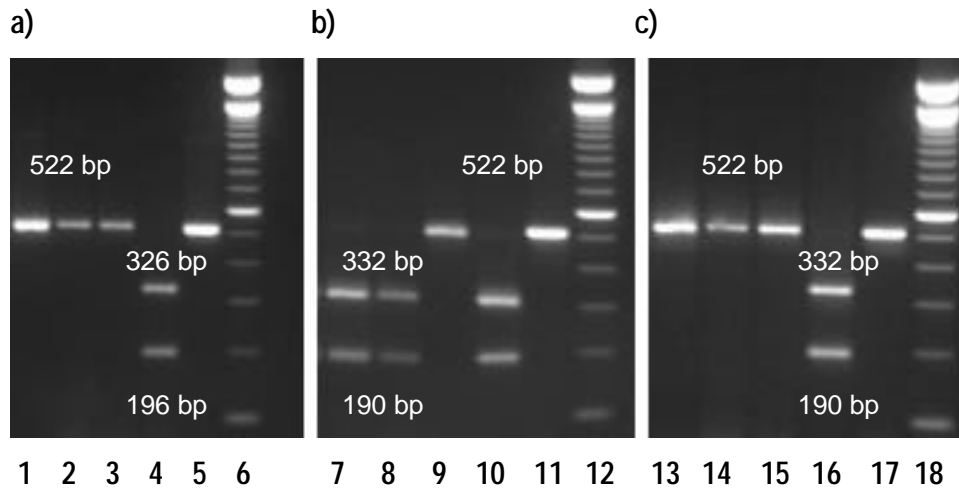
Tabelle 5: Codon 108 Mutation: Primerpaare und Produktgrößen mit zugehörigen Restriktionsenzymen

Codon 108	AS	Primerpaar	Produktgröße (bp)	Restriktions- enzym	Fragment- länge (bp)
Wildtyp	Ser	M3 und F/	ca.522	<i>AluI</i>	326 + 196
Mutation	Asn	M3 und F/	ca.522	<i>BsrI</i>	332 + 190
Mutation	Thr	M3 und F/	ca.522	<i>BstNI</i>	332 + 190
Wildtyp	Ser	M4 und F	ca.326	<i>AluI</i>	181 + 119
Mutation	Asn	M4 und F	ca.326	<i>BsrI</i>	180 + 146
Mutation	Thr	M4 und F	ca.326	<i>BstNI</i>	181 + 145

Der Verdau mit *BstNI* charakteristisch für eine Mutation von Serin nach Threonin, lieferte für keine der Proben ein positives Ergebnis. Lediglich die Positivkontrolle wurde in ein 322 bp- und ein 190 bp langes Stück geteilt.

Abbildung 17:

Restriktionsverdau des erhaltenen Amplifikats mit M3 und F/ durch *AluI*, *BsrI* und *BstNI*

**a) AluI:**

1-3: Patientenproben (negativer Verdau: Asn)

4: Positivkontrolle (Ser)

5: Amplifikationsprodukt M3+F/

6: DNA Leiter (100 bp)

b) BsrI:

7-8: Patientenproben (positiver Verdau: Asn)

9: Patientenprobe (negativer Verdau: Ser)

10: Positivkontrolle (Asn)

11: Amplifikationsprodukt M3+F/

12: DNA Leiter (100 bp)

c) BstNI:

13-15: Patientenproben (negativer Verdau: Ser)

16: Positivkontrolle (Asn)

17: Amplifikationsprodukt M3+F/

18: DNA Leiter (100 bp)

Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse war durch den parallelen Verdau der gleichen Enzyme mit dem „template“ aus Nest 2 mit einer M4-F PCR gewährleistet. Lediglich in den Bandenlängen zeigten sich auf Grund des verkürzten Ausgangsamplifikates Unterschiede. *AluI* schnitt den Wildtyp in zwei Fragmente mit 181 bp und 119 bp. Ein negativer Verdau zeigte etwas verkürzte Banden bei ca. 309 bp. Beim *BstI* Enzym fanden sich die gleichen Ergebnisse wie im Verdau mit dem M3+F/ Amplifikat. Die Untersuchung an Codon 108 mit *BstNI* ergab auch hier für alle Isolate ein negatives Ergebnis bezüglich einer Mutation zu Threonin.

4.7.3 DHPS-Gen (Codon 436, 437, 540, 581, 613)

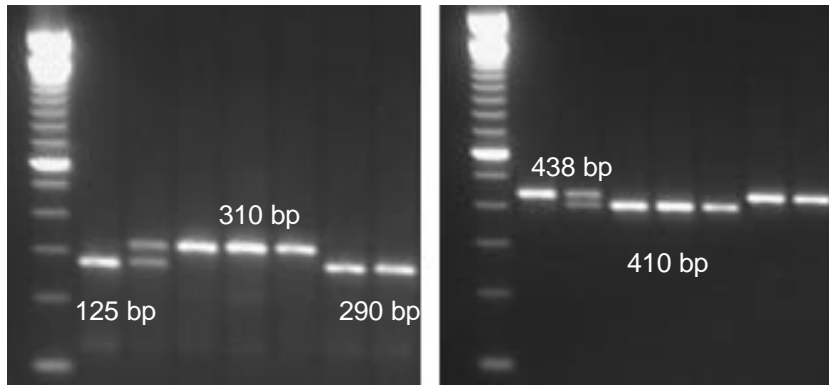
Wie aus Abbildung 13 hervorgeht ergibt sich bei der Bestimmung der DHPS Mutationen eine ähnliche Vorgehensweise wie beim DHFR Codon. In Tabelle 6 sind bekannte Aminosäurewechsel die in einem Zusammenhang mit Resistenz gegen Gruppe II Antifolate stehen aufgelistet.

Tabelle 6: Aminosäuren des DHPS-Gen

Codon:	436	437	540	581	613
Wildtyp:	Ser	Ala	Lys	Ala	Ala
Mutation:	Ala/Phe	Gly	Glu	Gly	Thr/Ser

➤ Codon 436

Auf dem DHPS Gen wurde das 438 bp lange PCR- Produkt von K+K/ durch Zugabe des Restriktionsenzym *MnII* bei Vorliegen des 436-Wildtyps Serin in drei Teile gespalten (20 bp, 125 bp, 290 bp). Bei einer Mutation wurde lediglich eine 310 bp und eine 125 bp Bande sichtbar. Um festzustellen ob es sich hierbei um eine Mutation zu Alanin oder Phenylalanin handelt, wurde das Produkt mit *MspAII* verdaut. Die Schnittstelle für einen Alanintausch lag im Bereich von 410 bp. Um eine Mutation zu Phenylalanin zu beweisen, hätten die Proben mit *HindIII* versetzt werden müssen, was im Falle eines positiven Ergebnisses ebenfalls eine Bande im Bereich von 410 bp ergeben hätte.

Abbildung 18:Restriktionsverdau mit *MnII* und *MspA1I*

a) 1 2 3 4 5 6 7 8 b) 1 2 3 4 5 6 7 8

a) *MnII*:

- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2, 7: Patientenproben (positiver Verdau: Ser)
- 3: Patientenprobe Mischinfektion
- 4-6: Patientenproben (negativer Verdau: Ala/Phe)
- 8: Positivkontrolle (Ser)

b) *MspA1I*:

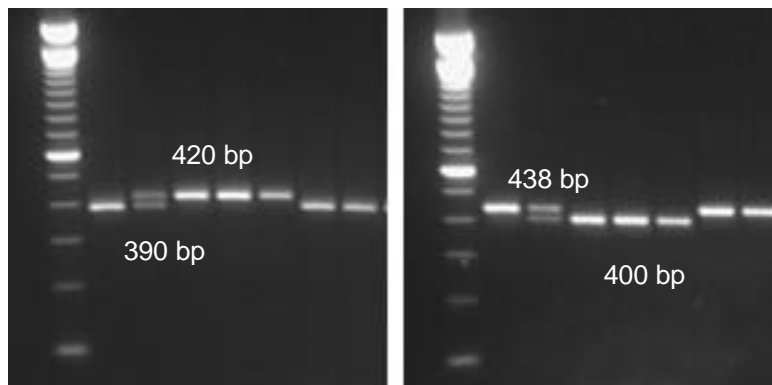
- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2, 7: Patientenproben (negativer Verdau: Ser)
- 3: Patientenprobe Mischinfektion
- 4-6: Patientenproben (positiver Verdau: Ala)
- 8: Negativkontrolle (Ser/Phe)

➤ Codon 437

Zum Nachweis von 437-Glycin wurde mit *AvaII* und für 437-Alanin mit *MwoI* verdaut. Bei positivem Verdau mit *MwoI* erhielt man ein etwa 390 bp langes DNA Stück. Die Proben mit einer Mutation in Position 437 lieferten im Gegenverdau eine ca. 400 bp große Bande.

Abbildung 19:

Restriktionsverdau K mit *MwoI* und *AvaII*



a) 1 2 3 4 5 6 7 8 b) 1 2 3 4 5 6 7 8

a) *MwoI*:

- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2, 7: Patientenproben (positiver Verdau: Ala)
- 3: Patientenprobe Mischinfektion
- 4-6: Patientenproben (negativer Verdau: Gly)
- 8: Positivkontrolle (Ala)

b) *AvaII*:

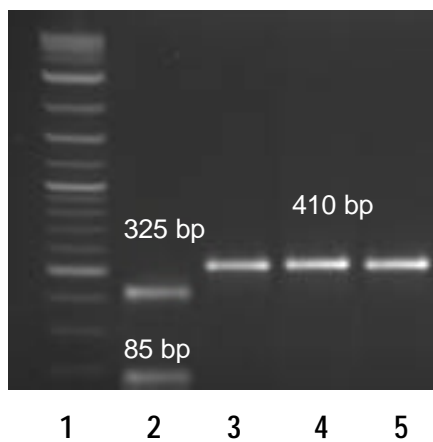
- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2, 7: Patientenproben (negativer Verdau: Ala)
- 3: Patientenprobe Mischinfektion
- 4-6: Patientenproben (positiver Verdau: Gly)
- 8: Negativkontrolle (Ala)

➤ Codon 540

Die *FokI* Schnittstelle lag innerhalb eines etwa 410 Basenpaare langen DNA Stückes. Durch das Restriktionsenzym entstanden bei vorhandener Mutation zu Glutamat zwei Banden im Bereich von 325 bp und 85 bp.

Abbildung 20:

Restriktionsverdau mit *FokI*



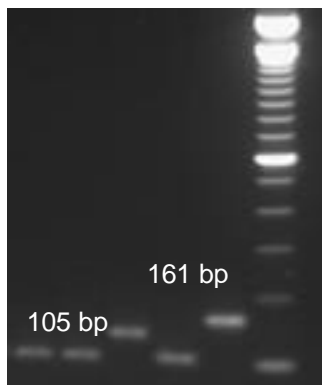
- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2: Positivkontrolle (positiver Verdau: Glu)
- 3-5: Patientenproben (negativer Verdau: Lys)

➤ Codon 581 und 613

Das 161 bp lange PCR Produkt von L+L/ wurde zum Nachweis von Alanin in Position 581 des DHFR Genloci herangezogen. Das Produkt hatte nach einem positiven Verdau mit *Bst*UI eine Größe von etwa 105 bp.

Abbildung 21:

Restriktionsverdau mit *Bst*UI für Codon 581



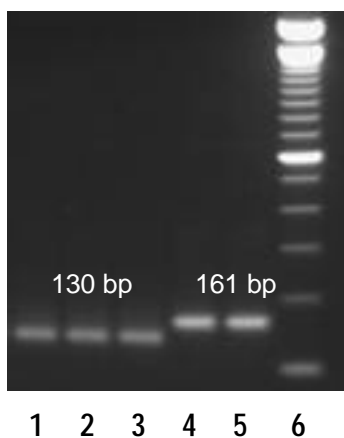
1 2 3 4 5 6

- 1, 2, 4: Patientenproben (positiver Verdau: Ala)
- 3: Negativkontrolle (negativer Verdau: Gly)
- 5: Amplifikationsprodukt von L+L/
- 6: DNA Leiter (100 bp)

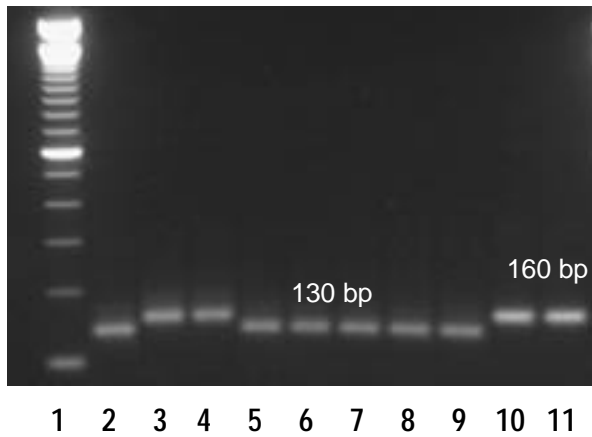
Zum Nachweis des Codon 613 Wildtyp Alanin konnten die Proben auch mit dem Bakterienenzym *MwoI*, *BsaWI* und *AgeI* verdaut werden. Beim Verdau mit *MwoI* erhielt man Banden bei etwa 130 bp und 30 bp. Beim Kontrollverdau mit *BsaWI* das Gleiche nur in umgekehrter Konstellation hier blieb der Wildtyp unverdaut. Ein zusätzlicher Verdau mit *AgeI* ermöglichte die Unterscheidung zwischen einer Threonin bzw. einer Serin Mutation. Während bei einer Mutation zu Thr eine Bande bei 128 bp erschien blieb das Amplifikat im Falle einer Serin Mutation unverdaut bei 161 bp.

Abbildung 22:

Restriktionsverdau mit *MwoI*, *BsaWI* und *AgeI* für Codon 613

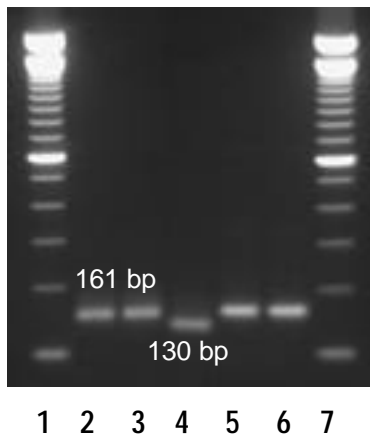
Verdau mit *MwoI*:

- 1-3: Patientenproben (positiver Verdau: Ala)
- 4: Negativkontrolle (negativer Verdau: Ser/Thr)
- 5: Amplifikationsprodukt von L+L/
- 6: DNA Leiter (100 bp)



Verdau mit *BsaWI*:

- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2: Positivkontrolle (Ser/Thr)
- 3, 4, 10: Patientenproben (negativer Verdau: Ala)
- 5-9: Patientenproben (positiver Verdau: Ser/Thr)
- 11: Amplifikationsprodukt von L+L/



Verdau mit *AgeI*:

- 1, 7: DNA Leiter (100 bp)
- 2, 3, 5, 6: Patientenproben (negativer Verdau: Ser)
- 4: Positivkontrolle (Thr)

4.7.4 Pfcrt-Gen

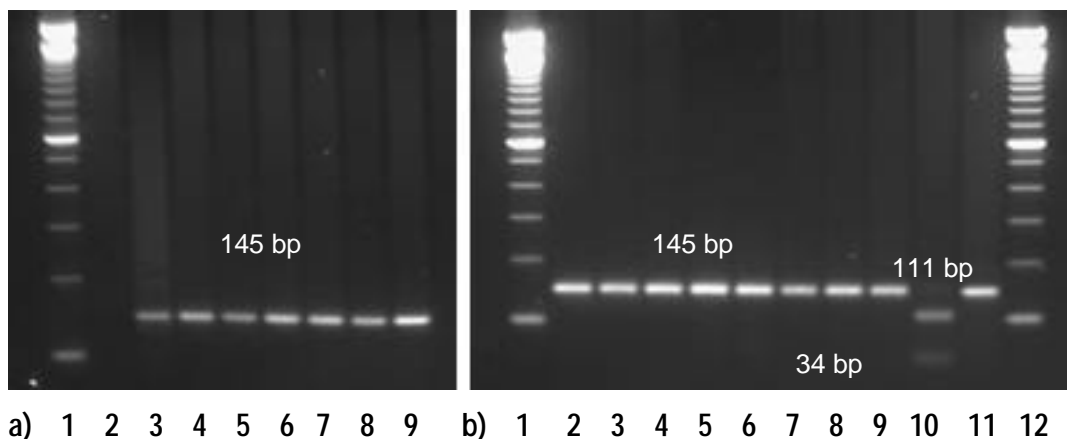
Das Pfcrt (*Plasodium falciparum* chloroquine resistance transporter) Gen auf Chromosom 7 gilt als eines der Hauptgene die Chloroquin Resistenz *in vitro* also auch *in vivo* verursachen. Eine Mutation in Codon 76 von K nach T wird in vielen Studien als einer der Hauptmarker für Resistenz beschrieben.

Die Mutationsbestimmung erfolgte mit Hilfe einer „verschachtelten“ PCR. Auf Nest1 mit dem Primerpaar TCRP1 und 2 folgte eine Nest2 Amplifikation mit den Primern TCRD1/2.

Das in etwa 145 bp lange Endprodukt wurde dann einem Enzymschnitt mit *ApoI* unterzogen. Die erwartete Bandenlänge für die Mutation also für potentiell resistente Stämme lag bei 145 bp (ungeschnitten). Für einen positiven Verdau des Restriktionsenzymys d.h. den Wildtyp waren Banden von etwa 111 bp und 34 bp zu erwarten.

Abbildung 23:

PCR und Restriktionsverdau von Pfcrt Codon 76



a) PCR:

- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2: Negativkontrolle
- 3-9: Patientenproben (positives Amplifikat)

b) Restriktionsenzymverdau:

- 1, 12: DNA Leiter (100 bp)
- 2-9: Patientenproben (negativer Verdau: Thr)
- 10: Positivkontrolle (Lys)
- 11: Negativkontrolle (Thr)

4.7.5 Pfmdr-Gen (Codon 86, 1042 und 1264)

Für das *Plasmodium falciparum* multi drug resistance Gen wurden im einzelnen 3 Genabschnitte, Codon 86, 1042 und 1246 untersucht. Für die weiteren Untersuchungen zum Nachweis von Polymorphismen auf dem Pfmdr1-Gen wurde eine PCR-Methode mit nachfolgender RFLP angewendet.

Punktmutationen auf Codon 86 wurden zunächst durch Vervielfältigung eines 320 bp langen DNA Stückes mit den Primern pfmdr1-1 und pfmdr1-2 und anschließendem Verdau mit *AflIII* und *ApoI* bestimmt. Nach erfolgter Elektrophorese konnten bei positivem Verdau mit *AflIII* und dem Vorliegen der 86-Tyrosin Mutation zwei Banden, eine von etwa 100 bp und eine Bande von 220 bp erkannt werden. Beim Wildtyp (86-Asn) erfolgte keine Restriktion. Es bestand die Möglichkeit eines Kontrollverdau mit Hilfe von *ApoI*. Hier wird der Wildtyp und nicht die Mutation geschnitten.

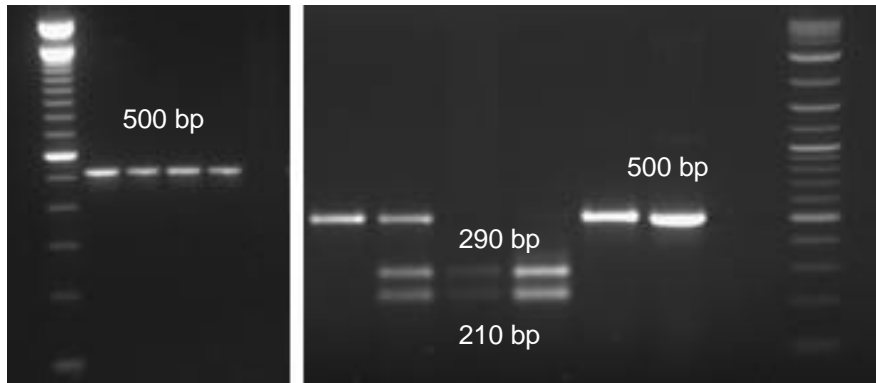
Im Laufe der Arbeit kam eine neue Methode zur Bestimmung der Mutation N86Y zum Einsatz. In einer 2-stufigen PCR wurde mit den Primerpaaren MDR1 und 2 sowie MDR3 und 4 ein ca. 500 bp langes DNA Stück amplifiziert. Durch Wiederholung einiger bereits getesteter Proben wurde somit die Ergebnissicherheit nochmals sichergestellt. Wie bei der alten Methode wurde auch mit den Enzymen *ApoI* und *AflIII* geschnitten. Die Auswertung der Banden erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 7: Restriktionsenzyme und Fragmentlängen Codon 86

Enzym	Aminosäure	Fragmentlänge in bp
<i>Apo I:</i>	Mutation:	~ 464 bp und 36 bp
	Wildtyp:	~250 bp, 214 bp und 36 bp
<i>Afl III:</i>	Mutation:	~290 bp und 210 bp
	Wildtyp:	~500bp

Abbildung 24:

PCR und Restriktionsverdau von Pfmdr Codon 86



a) 1 2 3 4 5 6 b) 1 2 3 4 5 6 7 8

a) PCR:

- 1: DNA Leiter (100 bp)
- 2-5: Patientenproben (positives Amplifikat)
- 6: Negativkontrolle

b) Restriktionsenzymverdau mit *AflIII*:

- 1, 5: Patientenprobe (negativer Verdau: Asn)
- 2: Patientenprobe Mischinfektion
- 3, 4: Patientenprobe (positiver Verdau: Tyr)
- 6: Negativkontrolle (Asn)
- 7: Negativkontrolle
- 8: DNA Leiter (100 bp)

Für Codon 1042 wurde eine PCR mit den Oligonucleotidsequenzen pfmdr1-3 und 1-4 bzw. für Codon 1246 mit pfmdr1-5 und 1-6 unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie für Codon 86 durchgeführt.

Unter gleichen Bedingungen wurde für Codon 1042 ein 400 bp langes Produkt und für Codon 1246 ein Amplifikat der Länge 500 bp erhalten. Für beide Genloci stand jeweils nur ein Restriktionsenzym *VspI* für Codon 1042 bzw. *EcoRV* für Codon 1246 zur Verfügung.

4.7.6 Cytochrom - b - Gen

In der neu entwickelten Methode [149] wird eine PCR mit den „outer Primern“ CYTb1 und CYTb2 und drei unterschiedlichen „inneren Primerpaaren“ zur und anschließender RFLP zur Differenzierung der 268-Mutationen herangezogen.

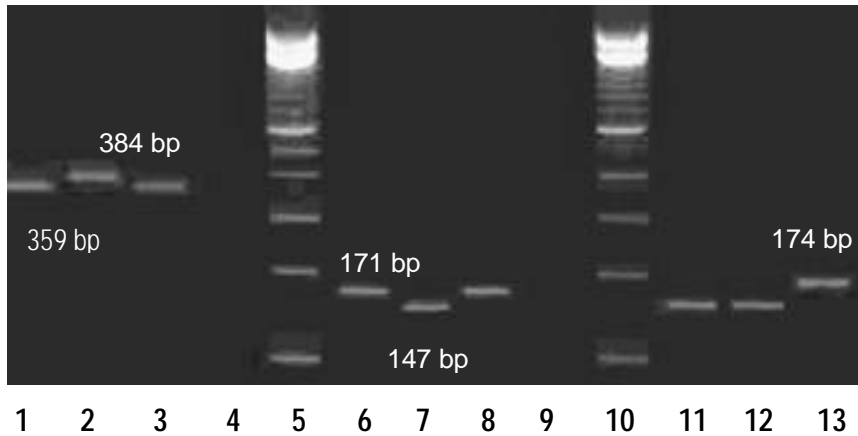
Tabelle 8 zeigt die verwendeten Primerpaare und Restriktionsenzyme sowie die Produktgrößen. Die Sequenz der Oligonukleotide, Reaktionsbedingungen und die Schnittstellen sind in den vorigen und folgenden Abschnitten aufgeführt.

Tabelle 8: Primerpaare und Produktgrößen mit zugehörigen Restriktionsenzymen für die Mutation auf Codon 268

Codon 268	AS	Primerpaar	Produktgröße	Restriktionsenzym	Fragmentlänge
Wildtyp	Tyr	CYTb3/ CYTb5	384 bp	<i>NsiI</i>	359 + 25 bp
Mutation1	Ser	CYTb2/ CYTb6	171 bp	<i>AlwNI</i>	147 + 24 bp
Mutation2	Asn	CYTb2/ CYTb7	174 bp	<i>SspI</i>	174 bp

Um die Mutation auf Codon 268 nachzuweisen mußte zur Analyse der Cytochrom-b-Sequenz zuerst eine Schnittstelle für ein passendes Enzym kreiert werden.

Die Durchsicht der Cytochromsequenz auf Restriktionsschnittstellen ergab kein Enzym, das die Polymorphismen am Codon 268 unterscheiden konnte. Daraufhin wurden in Nachbarschaft der Mutation Nukleotide ausgetauscht, um Erkennungssequenzen für spezifisch-schneidende Enzyme zu schaffen. Für den Wildtyp (TAT) konnte bei Ersatz von A durch T an Position 808 eine spezifische Restriktion mit *NsiI* eingeführt werden. Für die Mutation 1 (TCT) wurde durch Austausch von T durch G an Position 799 eine Erkennungssequenz für *AlwNI* geschaffen. Für die Mutation 2 (AAT) erfolgten 2 Nukleotidwechsel, von T nach A an Position 800 und von C nach A an Position 798. Die damit erhaltene Erkennungssequenz für *SspI* ist bei Wildtyp und Mutation 1 vorhanden, nicht aber bei Mutation 2 (AAT). Daher wird falls eine Mutation zu Asn vorhanden ist ein 174 bp langes Fragment (ungeschnitten) erhalten.

Abbildung 25:Restriktionsenzymverdau Codon 268 mit *NsiI*, *AlwNI* und *SspI*Verdau mit *NsiI*:

- 1: Stamm K1 (Wildtyp)
- 2: Patientenprobe TN 352 (Mutation1)
- 3: Laborstamm (Mutation2)
- 4, 9: Negativkontrolle
- 1, 5, 10: DNA Leiter (100 bp)

Verdau mit *AlwNI*:

- 6: Stamm K1 (Wildtyp)
- 7: Patientenprobe TN 352 (Mutation 1)
- 8: Laborstamm (Mutation 2)

Verdau mit *SspI*:

- 10: Stamm K1 (Wildtyp)
- 11: Patientenprobe TN 352 (Mutation 1)
- 13: Laborstamm (Mutation 2)

4.8 Reaktionsansätze mit Amplifikationsbedingungen für Polymerase-Kettenreaktion und RFLP-Methoden

Bei den hier verwendeten Polymerase chain reactions handelte es sich überwiegend um sog. „nested PCR’s“ (verschachtelte PCR). Dazu setzt man das PCR Produkt der ersten Reaktion in eine zweite PCR ein. Das Primerpaar der zweiten PCR liegt dabei zwischen den Primern der ersten Reaktion. Dadurch werden falsche Amplifikationen der ersten PCR ausgesondert.

4.8.1 Plasmodien Spezies Bestimmung durch PCR

Nest1	
Reagenz:	Vol. pro sample
H ₂ O	2,92 µl
Primer rPLU5+6 (je 5µM)	2,00 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5mM)	2,00 µl
dNTP's (125µM)	10,00 µl
Taq (0,4U)	0,08 µl
Nest2	
H ₂ O	3,92 µl
¹ Primer Spezies (je 5µM)	2,00 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5mM)	2,00 µl
dNTP's (125µM)	10,00 µl
Taq (0,4U)	0,08 µl

Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1: 95°C für 5 Minuten
- Schritt 2: 58°C für 2 Minuten
- Schritt 3: 72°C für 2 Minuten
- Schritt 4: 94°C für 1 Minute

→ Schritte 2 bis 4: 24 mal wiederholen

- Schritt 5: 58°C für 2 Minuten
- Schritt 6: 72°C für 5 Minuten
- Schritt 7: 20°C für 10 Minuten

Spezies	¹ Primer
<i>P. falciparum</i>	rFAL1 und rFAL2
<i>P. vivax</i>	rVIV1 und rVIV2
<i>P. ovale</i>	rOVA1 und rOVA2
<i>P. malariae</i>	rMAL1 und rMAL2

17 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → 3 µl DNA-Template (Ansatz 20µl/ Tube)

Bei Nest2 18 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → 2 µl PCR-Produkt aus Nest1. Die PCR Bedingungen ändern sich in der Form daß → Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholt werden.

4.8.2 Genotypisierung der MSP 1 und 2 Gene durch PCR

Beide Ansätze Nest1 und 2 der Genotypisierungsreaktion für *Plasmodium falciparum* sind in den Volumina, den Konzentrationen der verwendeten Lösungen und den Reaktionsbedingungen identisch zur *Plasmodium*-Speziesbestimmung von Nest1. Für Nest2 erfolgt lediglich in Schritt 2 und 5 eine Korrektur der Annealingtemperatur auf 61°C für 2 Minuten mit einer Gesamtzyklenzahl von 30 Zyklen.

4.8.3 Nachweis von Mutationen auf dem DHFR-Gen (PCR und RFLP)

Nest1	
Reagenz:	Vol. pro sample
H ₂ O	33,3 µl
Primer Paare (je 5µM)	5,0 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5mM)	5,0 µl
dNTP's (200mM)	4,0 µl
Taq (1,0U)	0,2 µl
Tween20 (1%)	0,5 µl
Nest2	
H ₂ O	51,28 µl
Primer Paare (5µM)	8,00 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5µM)	8,00 µl
dNTP's (200mM)	6,40 µl
Taq (1,6U)	0,32 µl
DMSO	4,0 µl

Nest1:

- Schritt 1: 94°C für 3 Minuten
- Schritt 2: 94°C für 1 Minute
- Schritt 3: 50°C für 2 Minuten
- Schritt 4: 72°C für 2 Minuten

→ **Schritte 2 bis 4: 39** mal wiederholen

- Schritt 5: 72°C für 10 Minuten
- Schritt 6: 20°C für 10 Minuten

48 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **2 µl** DNA-Template (Ansatz 50µl/ Tube)

Nest2:

- Schritt 1: 94°C für 2 Minuten
- Schritt 2: 94°C für 1 Minute
- Schritt 3: 45°C für 2 Minuten
- Schritt 4: 72°C für 2 Minuten

→ **Schritte 2 bis 4: 4** mal wiederholen

- Schritt 5: 94°C für 1 Minute
- Schritt 6: 45°C für 1 Minute
- Schritt 7: 72°C für 1 Minute

→ **Schritte 5 bis 7: 34** mal wiederholen

- Schritt 8: 72°C für 10 Minuten
- Schritt 9: 20°C für 10 Minuten

78 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **2 µl** DNA-Template (Ansatz 80µl/ Tube)

Reaktionsansatz für PFLP:

Ansatz für 10 µl :	z.B. Enzym :	1,00 µl
	Puffer Nr. 1:	2,00 µl
	Aqua dest.:	2,90 µl
	*BSA:	0,19 µl

Insgesamt: **6 µl** je Ansatz und **4 µl** je PCR-Produkt.

* BSA Zusatz optional in Abhängigkeit vom Enzym. Wird kein BSA zugesetzt ergänzt man mit H₂O auf das Gesamtvolumen (ohne DNA) von 6 µl.

4.8.4 Nachweis von Mutationen auf dem DHPS-Gen (PCR und RFLP)

Die Ansätze sowie die Bedingungen für die „polymerase chain reaction“ sind identisch zu denen der DHPS Arbeitsanleitung. Volumen für die RFLP-Ansätze gleichen denen bei DHFR.

4.8.5 Punktmutation auf dem Pfcrt-Gen mit PCR und anschließendem EnzymverdauPCR-Ansatz für Nest1 und Nest2:

Reagenz:	Vol. pro sample
H ₂ O	23,75µl
Primer Paare (je 5µM)	8,00 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5mM)	5,00 µl
dNTP's (125mM)	10,00 µl
Taq (2,5U)	0,25 µl
H ₂ O	23,75µl

Amplifikationsbedingungen:

- Schritt 1: 94°C für 3 Minuten
 - Schritt 2: 94°C für 30 Sekunden
 - Schritt 3: 56°C für 30 Sekunden
 - Schritt 4: 60°C für 1 Minute
 - Schritt 5: 60°C für 3 Minuten
 - Schritt 6: 20°C für 10 Minuten
- Schritte 2 bis 4: 44 mal wiederholen**

47 μl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **3 μl** DNA-Template (Ansatz 50 μl / Tube). Bei **Nest2** gleiches Volumen für Master Mix und **3 μl** PCR-Produkt aus **Nest1** verwenden.

- Schritt 1: 92°C für 2,5 Minuten
 - Schritt 2: 92°C für 30 Sekunden
 - Schritt 3: 48°C für 30 Sekunden
 - Schritt 4: 65°C für 30 Sekunden
 - Schritt 5: 65°C für 3 Minuten
 - Schritt 6: 20°C für 10 Minuten
- **Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholen**

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz :	Enzym <i>ApoI</i> (0,5 U):	0,5 μl /Tube
	Puffer NE 3:	1,00 μl /Tube
	Aqua dest.:	1,40 μl /Tube
	*BSA:	0,10 μl /Tube

Insgesamt: je **3,0 μl** pro Ansatz plus **7 μl** PCR-Endprodukt und 1 Tropfen Öl / Tube.

Vorbereitete Tubes für mindestens 6 Stunden oder über Nacht in ein auf 50°C geheiztes Wasserbad stellen.

4.8.6 Nachweis einer Punktmutation auf dem Pfm_{dr}-Gen durch PCR und RFLP-Technik

PCR-Ansatz für Primer:

pfmdr1-1 und pfmdr1-2

pfmdr1-3 und pfmdr1-4

pfmdr1-5 und pfmdr1-6

Reagenz:	Vol. pro sample
H ₂ O	2,92 µl
Primer Paare (je 5µM)	2,00 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5mM)	2,00 µl
dNTP's (125µM)	10,00 µl
Taq (0,6U)	0,08 µl

17 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **3 µl** DNA-Template . Für beide Ansätze jeweils 25µl.

Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1: 94°C für 2,5 Minuten
 - Schritt 2: 94°C für 45 Sekunden
 - Schritt 3: 47°C für 1 Minuten
 - Schritt 4: 72°C für 2 Minuten
 - Schritt 5: 72°C für 10 Minuten
 - Schritt 6: 20°C für 10 Minuten
- **Schritte 2 bis 4: 37 mal wiederholen**

17 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **3 µl** DNA-Template . Für beide Ansätze jeweils 25µl.

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz : Enzym: 0,5 µl/Tube
 Puffer NE 3: 1,00 µl/Tube
 Aqua dest.: 1,40 µl/Tube
 *BSA: 0,10 µl/Tube

Insgesamt: je **3 µl** pro Ansatz plus **7 µl** PCR-Endprodukt und 1 Tropfen Öl / Tube.

* BSA Zusatz optional in Abhängigkeit vom Enzym. Wird kein BSA zugesetzt ergänzt man mit H₂O auf das Gesamtvolumen (ohne DNA) von 3 µl.

Neuer PCR-Ansatz Nest 1(Primer MDR1+2) und Nest 2(Primer MDR3+4)

Reagenz:	Vol. pro sample
H ₂ O	12,38 µl
Primer Paare (5µM)	5,00 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5µM)	2,50 µl
dNTP's (125µM)	2,00 µl
Taq (0,6U)	0,12 µl

22 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **3 µl** DNA-Template. Für beide Ansätze jeweils 25µl.

Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1: 95°C für 3 Minuten
 - Schritt 2: 92°C für 30 Sekunden
 - Schritt 3: 48°C für 45 Sekunden
 - Schritt 4: 65°C für 1 Minute
- **Schritte 2 bis 4: 44 in Nest 1** mal wiederholen
- **Schritte 2 bis 4: 29 in Nest 2** mal wiederholen
- Schritt 5: 65°C für 5 Minuten
 - Schritt 6: 20°C für 10 Minuten

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz : Enzym: 0,5 µl/Tube
 Puffer NE 3: 1,00 µl/Tube
 Aqua dest.: 1,40 µl/Tube
 *BSA: 0,10 µl/Tube

Insgesamt: je **3,0 µl** pro Ansatz plus **7 µl** PCR-Endprodukt und 1 Tropfen Öl / Tube.

4.8.7 Nachweis einer Mutation auf Codon 286 des Cytochrom-b Gen von *P. falciparum*

Reagenz:	Vol. pro sample
H ₂ O	9,9 µl
Primer Paare (0,5µM)	5,0 µl
PCR Puffer (MgCl ₂ 1,5µM)	2,0 µl
dNTP's (je 2 mM)	2,0 µl
Taq (0,025U)	0,1 µl

19 µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → **1 µl** DNA-Template (Ansatz 20µl/ Tube)

Nest1:

- Schritt 1: 94°C für 5 Minuten
 - Schritt 2: 94°C für 50 Sekunden
 - Schritt 3: 50°C für 50 Sekunden
 - Schritt 4: 70°C für 1 Minute
- **Schritte 2 bis 4: 34** mal wiederholen
- Schritt 5: 70°C für 5 Minuten
 - Schritt 6: 20°C für 10 Minuten

Nest2:

Probenansatz ist identisch zu Nest1, mit folgenden Reaktionsbedingungen:

Primer CYTb 3+5 und 2+6		
94°C	5 Min.	
95°C	30 Sec.	} x 30
55°C	30 Sec.	
72°C	30 Sec.	
72°C	5 Min.	

Primer CYTb 2+7		
94°C	5 Min.	
95°C	30 Sec.	} x 35
45°C	30 Sec.	
72°C	30 Sec.	
72°C	5 Min.	

Verdau für Codon 268 Cytochrom-bc1-Gen (*in vivo* Mutation):

	Pro sample
Enzym
Puffer Nr: ___	2,2 µl
H ₂ O
DNA	5 µl
Total Volumen	22 µl

Enzyme *NsiI* und *AlwNI* jeweils 0,1 µl und für *SspI* beträgt das Volumen pro Probe 0,2 µl. Wasser jeweils optional in Abhängigkeit vom Enzym Volumen auf ein Gesamtvolumen von 22µl zugeben.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der *Plasmodien* Spezies

Im Rahmen der Querschnittsuntersuchung wurden insgesamt 574 Patienten und deren Blutproben untersucht. Bei allen Patienten lag das Probenmaterial auf Whatman™-3MM Filterpapier zur Untersuchung vor. Bei ihrem Besuch wurden anamnestische Angaben zu verschiedenen Beschwerden, Symptomen und Daten über die Reise und potentielle Infektionsgebiete über einen standardisierten Fragebogen erhoben (siehe Anhang Punkt 11).

Bei 18 Patienten ließ sich keine Infektion mit einer der vier krankmachenden *Plasmodien* Arten mehr nachweisen. 9 Patienten erkrankten an einer Malaria *tertiana* (5 *P.vivax*, 3 *P.ovale*) oder *quartana*.

Die 27 Probanden ohne eine nachweisbare *Plasmodium falciparum* Infektion wurden aus der Studie ausgeschlossen und nachfolgend nicht mehr berücksichtigt. Von den ursprünglich 574 rekrutierten Teilnehmern erfüllten letztlich 547 die Aufnahmekriterien einer Monoinfektion mit *Plasmodium falciparum*.

5.2 Patientenkollektiv und Daten von TropNetEurop

In die Studienkohorte wurden Kinder und Erwachsenen beider Geschlechts im Alter von 5 Monaten bis 79 Jahren (Median 36 Jahre) aufgenommen. Weitere Daten zum Patientenkollektiv sind den folgenden Tabellen und Abbildungen zu entnehmen.

Tabelle 9: Patientendaten

	N	%
Anzahl der Isolate:	547	100.0
Geschlecht		
keine Daten	168	30.7
männlich	266	48.6
weiblich	113	20.7
Reiseberatung:		
keine Daten	301	55.0
Ja	59	10.8
Nein	187	34.2
Prophylaxe:		
keine Daten	242	44.2
keine	243	44.4
Chloroquin	10	1.8
Proguanil	2	0.4
Proguanil + Chloroquin	24	4.4
Mefloquin	18	3.3
Proguanil + Atovaquon	1	0.2
andere	7	1.3
Patientenklassifikation:		
keine Daten	214	39.1
Immigranten/Flüchtlinge	140	25.6
ausländische Besucher	24	4.4
Europäer die in der EU leben	149	27.2
Europäer die nicht in der EU leben	20	3.7
Versorgungsstatus:		
keine Daten	227	41.5
ambulant	56	10.2
stationär	264	48.3
Komplikationen:		
keine Daten	283	51.7
Ja	43	7.9
Nein	221	40.4
Exitus:		
keine Daten	233	42.6
Ja	9	1.7
Nein	305	55.8

	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Alter (Jahre)	508	37.0	14.4	0	29	36	47.5	79
Reisedauer (Tage)	288	144.9	521,6	0	15	30	60	5475

Um im folgenden Abschnitt die Auswertung zu erleichtern erfolgte eine Einteilung der Studienpopulation in zwei Gruppen:

- Immigranten, Flüchtlinge und ausländische Besucher aus nicht EU Ländern werden im weiteren Verlauf als „semiimmune Patienten“ oder Immigranten bezeichnet

Voraussetzung für das Überleben des Menschen in Hochendemiegebieten ist eine sich langsam entwickelnde Semiimmunität. Nach vielen wiederholten Plasmodieninfektionen wird eine Infektion toleriert und führt dazu, daß die Erkrankungen zunehmend leichter verlaufen und das Ausmaß der Parasitämie begrenzt wird. Die Parasitämie wird mit zunehmendem Alter niedriger und sinkt teilweise in den submikroskopischen Bereich ab. Da der Großteil der untersuchten Isolate aus Afrika stammt konnte eine solche Einteilung getroffen werden.

- Europäische Touristen und Reisende als „nichtimmune Patienten“

Die genetische Grundlage und die entscheidenden Faktoren zum Erwerb einer Teilimmunität sind bereits im Säuglingsalter von Bedeutung, sodaß Europäer allgemein als „Nichtimmune“ gelten.

Durch die Auswertung der TropNetEurop Fragebögen war es möglich bei 333 Patienten genaue Angaben über vorhandene Beschwerden bzw. die Symptomatik beim Vorstellungstermin zu erhalten.

149 (44,7%) der 333 Erkrankten bestätigten an Fieber und Kopfschmerzen zu leiden. 18,6% der Befragten klagten über eine Kombination der Symptome Fieber, Kopfschmerz und Müdigkeit.

92,2% (n=307) aller per Fragebogen identifizierbaren Studienteilnehmer kamen aus Gebieten südlich der Sahara. Bei der Häufigkeit der vier Hauptsymptome (Tabelle 10) gab es keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen ($p > 0,05$ Fisher exact test).

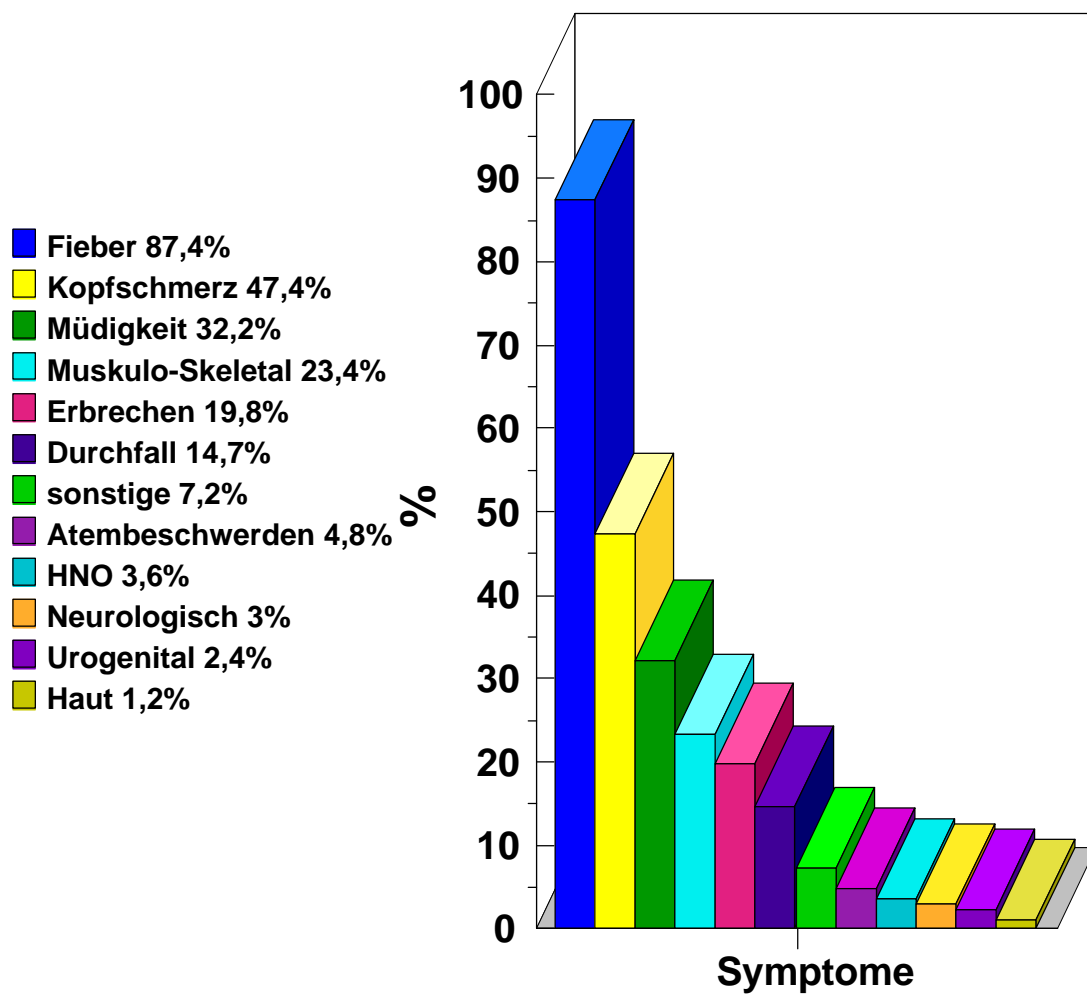
Tabelle 10: Symptome bei einer *Plasmodium falciparum* Infektion bei Immigranten und Europäern:

Symptome	Immigranten (n=164)	Europäer (n=169)
Fieber	147 89,6%	144 85,2%
Kopfschmerz	84 51,2%	74 43,8%
Müdigkeit	47 28,7%	61 36,1%
Muskulo-Skeletale Beschwerden	43 26,2%	35 20,7%

Die Einnahme einer Chemoprophylaxe um eine eventuelle Malariaerkrankung zu verhindern lag bei 333 Patienten bei unter 20% (18,6%). Von 169 Europäern konnte bei 103 (61%) Personen definitiv eine Medikation zur Prophylaxe ausgeschlossen werden. Lediglich 29,6% der befragten Europäer gaben an etwas zur Malariavorsorge eingenommen zu haben, 24 Personen machten darüber keine Angaben. Die erfaßten Komplikationen waren unterschiedlicher Art und reichten von Hyperparasitämie, Organ Manifestationen bis zur zerebralen Malaria. Als Grundlage für die Verschlüsselung diente ein internationaler ICD10 Code.

Abbildung 26:

Prozentuale Häufigkeit von Beschwerden von europäischen Reisenden und Immigranten/ausländischen Besuchern (n=333) mit einer Malaria tropica Erkrankung (Mehrfachnennungen sind möglich)



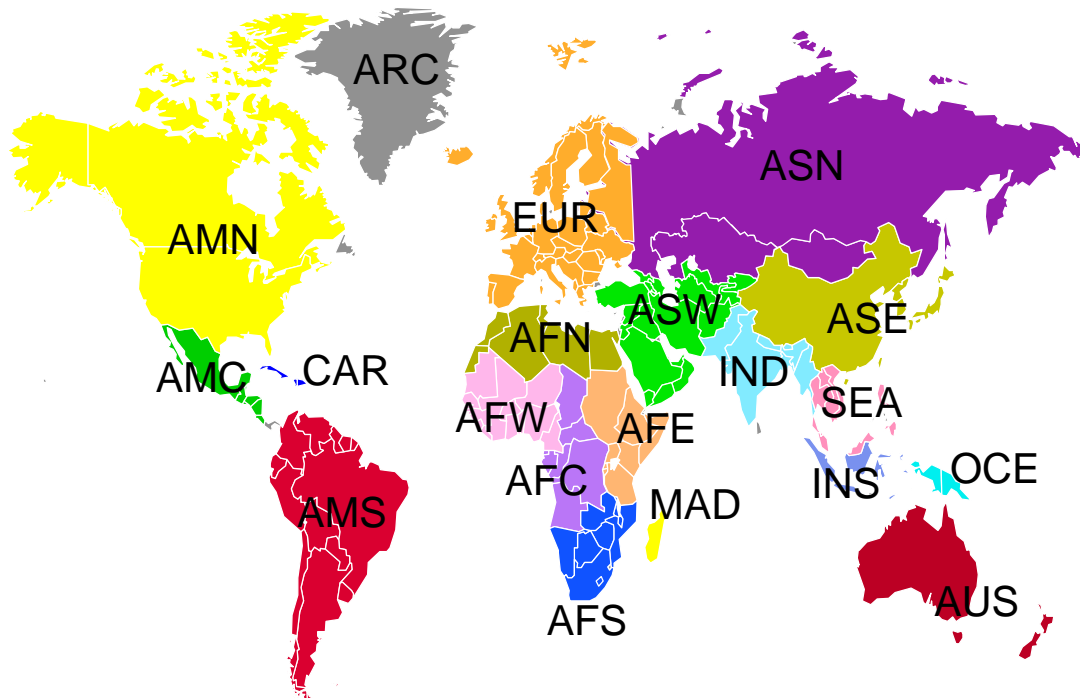
5.3 Verteilungsstudie der importierten *Plasmodium falciparum* Infektionen

5.3.1 Geographische Verteilung der importierten Infektionen

Mit der Hilfe der Patientenangaben konnten die positiv getesteten Infektionen bestimmten Ländern oder Regionen zugeordnet werden. Bei 522 Isolaten konnte eine eindeutige Zuordnung der Infektionsregion erfolgen. Die Verteilung ergibt sich aus Abbildung 27

Abbildung 27:

Geographische Verteilung der importierten *Plasmodium falciparum* Infektionen nach Europa



Region	Anzahl	%
Zentralafrika(AFC)	77	14,8
Ostafrika (AFE)	78	14,9
Südafrika (AFS)	29	5,6
Westafrika (AFW)	298	57,1
Madagaskar & afrikanische Inseln (MAD)	4	0,8
Zentralamerika (AMC)	1	0,2
Karibik (CAR)	2	0,4
Südamerika (AMS)	3	0,6
indischer Subkontinent (IND)	5	1,0
Indonesien (INS)	15	2,9
Südostasien (SEA)	5	1,0
Ozeanien (OCE)	4	0,8
Europa (EUR)	1	0,2
insgesamt:	522	100

5.3.2 Prävalenz von EBA-175

Aus der gesamten Studienpopulation von 547 Patienten wurden insgesamt 518* Isolate untersucht.

Nach Auswertung der Ergebnisse ergab sich folgende Verteilungsfrequenz für den gesamten Studienraum. 25 Proben (4,8%) ergaben ein negatives PCR Ergebnis, d.h. es konnte keines der beiden Fragmente vervielfältigt werden. Ein Ablese- oder Meßfehler kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da für diese Proben die EBA-175 Amplifikation wiederholt vorgenommen wurde. Bei 50% (n=259) der „samples“ wurde ein F-Fragment gefunden, 171 (33%) der zu testeten Isolate enthielten mindestens einen *Plasmodium* Stamm der für das C-Segment codiert.

Eine Mischinfektion mit mindestens einem cAMP und einem FCR Stamm konnte bei 63 (12,2%) Patienten festgestellt werden.

*Bei 29 Proben wurde keine EBA-175 Bestimmung durchgeführt, da die Filterpapiere für weitere Untersuchungen zu Herrn Dr. Michael Alifrangis in das PANUM Institut nach Kopenhagen geschickt wurden.

5.3.3 Prävalenz von MSP1/2

Insgesamt wurden auch hier 518^{*} Proben auf Längenpolymorphismen in den MSP1 und 2 Genen genotypisiert. Bezüglich des Genes MSP1 zeigten 480 Proben, hinsichtlich des MSP2 Gen 473 Proben, mindestens eine Bande. Bei 15 Testisolaten konnte auch nach mehrmaliger Wiederholung der PCR keinerlei Amplifikationsprodukt erreicht werden. 30 Blutproben zeigten Banden für MSP1 jedoch keine für MSP2, ferner wurde bei 23 Proben wenigstens ein Längenpolymorphismus für MSP2 jedoch keiner für MSP1 detektiert.

Die Amplifizierung ergab für MAD20 205 (39,6%) positive Ergebnisse mit bis zu 21 verschiedenen Fragmentgrößen. In der Allelfamilie K1 wurden 311 Proben (60%) positiv getestet wobei dort ebenfalls 21 verschiedene Fragmente anzutreffen waren. Bei Proben 140 (27%) mit nur 3 unterschiedlichen Fragmentlängen war RO33 die am wenigsten polymorphe Familie. In 69,3% (97 Isolaten) der Fälle war 160 bp die vorherrschende Bandenlänge.

Mit den Oligonukleotiden M2-ICF/ICR, welche für die Indochina (IC) Allelfamilie amplifizieren, konnten 388 Proben, das entspricht 74,9%, als positiv gewertet werden. 32 unterschiedliche Bandenlängen charakterisieren den hohen „Polymorphismegrad“. 293 (56,6%) positive FC27 Patienten produzierten bis zu 30 differente Längenbanden.

Insgesamt wurden durch die Genotypisierung von *Plasmodium falciparum* 1665 Fragmente mit 107 verschiedenen Bandenlängen aufgedeckt.

^{*}Bei 29 Proben wurde keine MSP1/2 Genotypisierungs PCR durchgeführt, da die Filterpapiere für weitere Untersuchungen zu Herrn Dr. Michael Alifrangis in das PANUM Institut nach Kopenhagen geschickt wurden.

5.3.4 Multiplizität von MSP1 und MSP2

Nur bei 174 (33,6%) Patienten in MSP1 und bei 278 (53,7%) Patienten in MSP2 konnte eine multiclone Infektionen mit mindestens 2 Clonen pro Gen festgestellt werden. Der Mittelwert der Clone pro Infektionen der PCR positiven Proben lag für MSP1 (n=480) bei 1,5 mit bis zu 6 Clonen pro Person und auf MSP2 (n=473) bei 2,0 mit bis zu 7 Parasitenclonen pro Patient.

5.4 Importierte *Plasmodium falciparum* Malaria aus Afrika

Die Mehrzahl der Fälle unserer Studie 92,3% (siehe Abbildung 27) wurden aus sog. „sub-Saharan countries“ importiert. Diese Verteilung deckt sich mit Berechnungen und Beobachtungen der WHO wonach über 90% der Todesfälle und Erkrankungen aus dem tropischen Afrika, d.h. Regionen südlich der Sahara, kommen [182].

Aufgrund der großen Bedeutung und ob des sozio-ökonomischen Einflusses der Malaria in diesen Gebieten erfolgte eine gezielte Auswertung der Regionen Zentral-, Ost-, Süd-, und Westafrika.

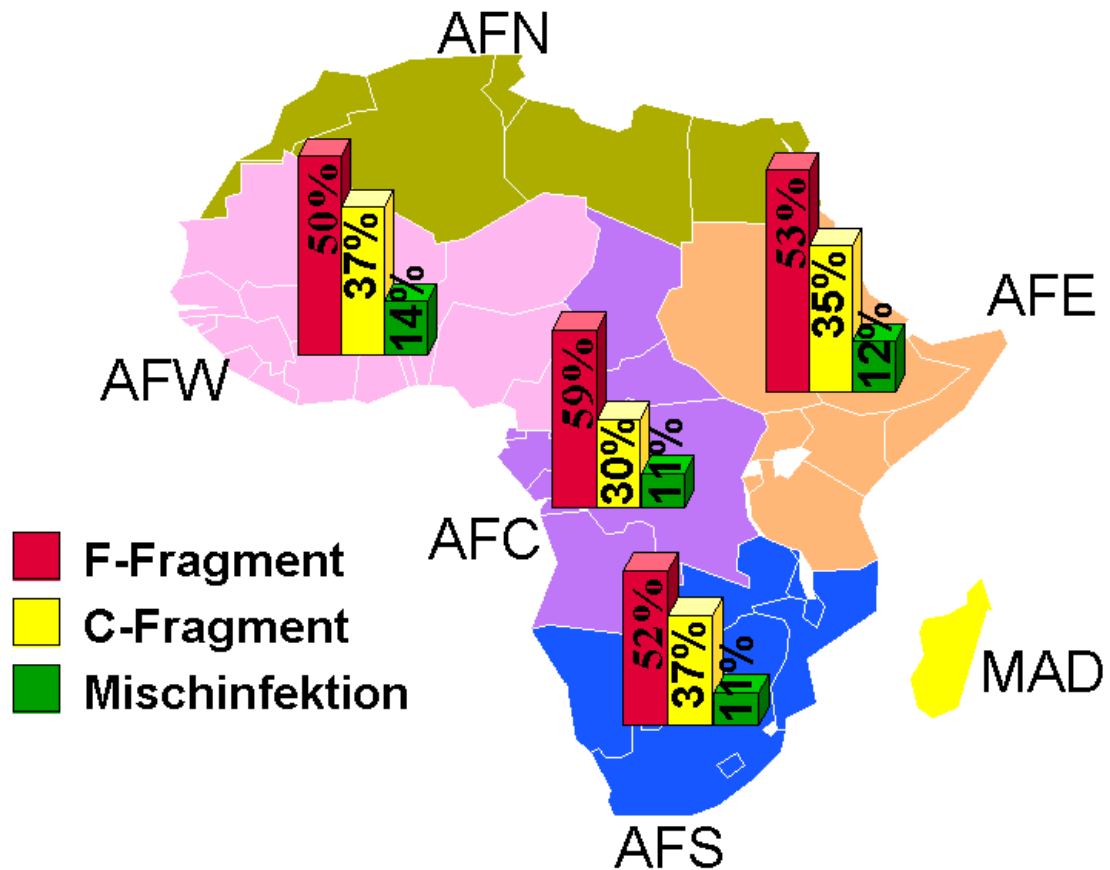
Da die Anzahl der Proben aus anderen Gebieten der Erde zu klein war, waren aussagekräftige Verteilungsstudien nicht möglich.

5.4.1 Prävalenz von EBA-175 in Afrika

441 Patienten erfüllten die Kriterien einer eingeschleppten *Plasmodium falciparum* Infektion aus einer der vier afrikanischen Hauptregionen (AFC, AFE, AFS, AFW) mit gleichzeitiger Detektion von mindestens einem EBA-175 Segment. 13 Proben lieferten trotz positivem Spezies-Nachweis kein Amplifikat von 795bp (FCR) oder 714bp (cAMP) bei der PCR Bestimmung. Die Verteilung, welche sich nach der Auswertung für die zwei Fragmente ergab ist in Abbildung 28 visualisiert.

Abbildung 28:

Die prozentuale Verteilungsfrequenz der EBA-175 Fragmente in Abhängigkeit vom Infektionsgebiet

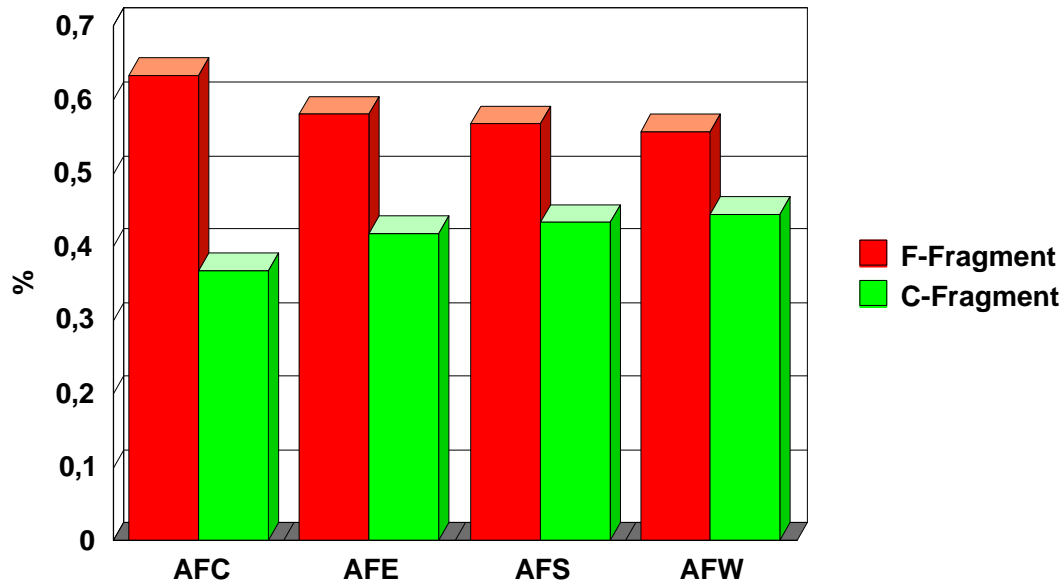


Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Fragmentverteilung in den Studienregionen einen signifikanten Unterschied ergibt wurde ein Chi²-Test durchgeführt. Hierzu wurden zunächst alle Mischinfektionen wie zwei Einzelinfektionen gewertet. (Abbildung 29)

Wie aus dem folgenden Diagramm ersichtlich ist, konnte eine weitestgehend gleiche Verteilung der Einzelfragmente in den vier Regionen festgestellt werden. Die größten Differenzen ergaben sich zwischen AFC (F-Fragment 63,3%, C-Fragment 36,7%) und AFW (F-Segment 55,6%, C-Segment 44,4%). Die Allelverteilung in den Studiengebieten ergab keinen signifikanten Unterschied (Chi²-Test p= 0,214).

Abbildung 29:

Prozentuale Verteilung der EBA-175 Fragmente in den verschiedenen Regionen (n=498*):



Zentralafrika (AFC) n=79, Ostafrika (AFE) n=74, Südafrika (AFS) n=30, Westafrika (AFW) n=315

*Mischinfektionen wurden wie Einzelinfektionen behandelt und zu den beiden Fragmenten addiert.

5.4.2 Prävalenz der Merozoiten-Oberflächen Proteine 1 und 2

Bei 454 Proben aus Afrika wurde für 442 (97,4%) entweder ein positiver Nachweis für die MSP1 oder die MSP2 Familie erzielt. 30 Isolate ergaben keinen Nachweis für eine Allelfamilie des Oberflächenprotein 1, bei 38 Proben gelang kein Nachweis einer der Block 3 Familien des MSP2 Gens. Insgesamt wurden somit 12 Patientenblutproben nicht in die Auswertung mit aufgenommen da bei beiden Oberflächenantigenen kein auswertbares Ergebnis erzielt wurde.

Von 442 Patienten konnte bei 178 (40,3%) ein MAD20-, bei 285 (64,5%) ein K1-, und bei 130 (29,1%) ein RO33-Parasit festgestellt werden. Aus 442 Isolaten ergaben 253 Proben (57,2%) positive Ergebnisse für FC27 und in 349 Patienten (79%) wurden Resultate erzielt, die für einen 3D7 Parasiten sprachen.

Die Allelverteilung zeigt eine Dominanz der „K1- und IC-Typen“. Einen Überblick über die genauen Daten zeigt Tabelle 11.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Allelverteilung in einem der Studiengebiete bewiesen werden (Chi²-Test alle p Werte > 0,1). Bezogen auf alle Proben aus Afrika konnten in 36,3% (n=165) der Fälle multiple Genotypen von MSP1 festgestellt werden. Eine multiclonale Infektion mit mindestens 2 unterschiedlichen Genotypen für MSP2 ließ sich in 248 (54,6%) Proben nachweisen.

Tabelle 11: Resultate der Genotypisierungs-PCR von MSP1 und 2 Allelfamilien bei importierten *Plasmodium falciparum* Isolaten aus Afrika:

MSP1/2	MAD20	K1	RO33	IC	FC27
Allelhäufigkeit (%):	C:40; E:43 S:36; W:38	C:69; E:59 S:56; W:65	C:36; E:32 S:32; W:26	C:81; E:81 S:88; W:77	C:68; E:48 S:56; W:57
Maximale Zahl der detektierten Clone:	C:2; E:2 S:2; W:2	C:2; E:2 S:2; W:2	C:2; E:1 S:1; W:1	C:3; E:3 S:3; W:4	C:3; E:4 S:1; W:4
Längenpolymorphismus:	C:11; E:13 S:7; W:17	C:17; E:16 S:9; W:17	C:2; E:2 S:2; W:3	C:18; E:16 S:10; W:26	C:18; E:17 S:8; W:21
Produktgröße (bp):	100-300	100-350	160-240	330-1200	180-700
MOI ¹ :	C:1,0; E:1,0 S:1,1; W:1,1	C:1,1; E:1,2 S:1,4; W:1,1	C:1,0; E:1,0 S:1,0; W:1,0	C:1,4; E:1,3 S:1,4; W:1,4	C:1,6; E:1,3 S:1,0; W:1,5

C: Zentralafrika (n=72), E: Ostafrika (n=69), S: Südafrika (n=25), W: Westafrika (n=276)

¹ Bei der Berechnung der MOI (**m**ultiplicity of **i**nfection) wurden die Nullwerte nicht berücksichtigt

Signifikante Differenzen ergaben sich in der MOI für K1 (Kruskal-Wallis p =0,02) und für FC27 (Kruskal-Wallis p =0,02) bezogen auf die ganze afrikanische Studienregion. Bei der „mean number of clones“ für das K1 Allel ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ländern in Zentralafrika und Südafrika (p =0,003) und zwischen AFW und AFS (p =0,014) beweisen.

Genauso verhält es sich mit der MOI der Allelfamilie FC27. Auch hier gab es signifikante Abweichungen zwischen den Gebieten in Südafrika und AFC (p =0,007) respektive AFW (p =0,008). Aus obiger Tabelle ergibt sich das die durchschnittliche Zahl der Clone für die Familie K1 im MSP1 Gen und der für die FC27 Familie im MSP2 Gen in allen Gebieten am höchsten war. Die einzige Ausnahme war im südlichen Afrika zu finden wo überraschender Weise nur ein Durchschnittswert von 1,0 für die MOI von FC27 errechnet werden konnte.

Die minimale Anzahl der Clone für MSP1 aus AFC und AFW war 1,5 pro Blutprobe und bei Isolaten aus AFE bzw. AFS 1,6 Clone je Probe (Kruskal-Wallis p =0,46).

Signifikanz der MOI (engl. **multiplicity of infection**) für das Merozoiten-Oberflächen Protein 2 konnte ebenfalls nicht erzielt werden (Kruskal-Wallis $p = 0,06$). Die durchschnittliche Zahl der Genotypen für MSP2 lag jedoch in allen Gebieten mit 2,2 (AFC), 1,8 (AFE), 1,9 (AFS) und 2,1 für AFW höher als beim Oberflächeneiweiß MSP1.

Tabelle 12: Anzahl der Clone von MSP1/2 und die MOI in Afrika

Clonverteilung/Probe	AFC	AFE	AFS	AFW
MSP1:				
1	45 (62,5%)	35 (52,2%)	12 (52,2%)	167(63,7%)
2	20 (27,8%)	27 (40,3%)	8 (34,8%)	68 (26,0%)
3	6 (8,3%)	5 (7,5%)	3 (13,0%)	22 (8,4%)
4	0	0	0	3 (1,1%)
5	0	0	0	2 (0,8%)
6	1(1,4%)	0	0	0
Total :	72	67	23	262
MOI von MSP1 :	1,51	1,55	1,61	1,49
MSP2 :				
1	22 (31,4%)	35 (53,0%)	9 (39,1%)	102 (39,7%)
2	26 (37,1%)	19 (28,8%)	9(39,1%)	83 (32,3%)
3	11 (15,7%)	8 (12,1%)	4(17,4%)	39 (15,2%)
4	7 (10,0%)	1 (1,5%)	1(4,3%)	23 (8,9%)
5	4 (5,7%)	3 (4,5%)	0	6 (2,3%)
6	0	0	0	3 (1,2%)
7	0	0	0	1 (0,4%)
Total :	70	66	23	257
MOI von MSP2 :	2,21	1,76	1,87	2,07

Die erhaltenen p-Werte für die MOI waren für MSP1 $p = 0,4578$, und für MSP2 $p = 0,0640$.

5.4.3 Polymorphismen in der DHFR und DHPS Gensequenz

Wie bereits mehrfach angesprochen kam die Mehrzahl der importierten Malariainfektionen aus Afrika, südlich der Sahara. Auf Grund der geringen Anzahl der Proben aus Asien und Amerika, wurden bei der Ermittlung der Prävalenzraten von Punktmutationen auf den entsprechenden Genabschnitten nur die 482 afrikanische Proben ausgewertet.

5.4.3.1 DHFR-Codon 51

In Ostafrika waren 46,4% (n=26) der Isolate mit einem mutierten Parasitenstamm infiziert. Bei 124 (52,1%) Proben aus Westafrika ergab sich ein positiver Verdau mit *Tsp509I*, dies spricht für den Wildtyp. Bei 29,5% der Patienten aus einem zentralafrikanischen Territorium konnte eine Mischinfektion mit mindestens einem mutierten Parasiten und einem Wildtyp detektiert werden.

Tabelle 13: Ergebnisse für Codon 51

DHFR Codon 51	AFC n=61	AFE n=56	AFS n=22	AFW n=238	Gesamt n=377
Iso	23 37,7%	26 46,4%	9 40,9%	75 31,5%	133 35,3%
Asn	20 32,8%	18 32,1%	10 45,5%	124 52,1%	172 45,6%
Asn/Iso	18 29,5%	12 21,4%	3 13,6%	39 16,4%	72 19,1%

Unter Verwendung eines Chi²-Test und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden ergab sich der p-Wert =0,092.

5.4.3.2 DHFR-Codon 59

Die *XmnI* Schnittstelle in Codon 59, die eine Mutation zu Arginin charakterisiert, wurde bei über 65% der Blutproben aus Zentralafrika gefunden. Bei den westafrikanischen Proben lag in 31 Fällen der Wildtyp und in 2 Fällen beide Genotypen vor.

Tabelle 14: Ergebnisse für Codon 59

DHFR Codon 59	AFC n=66	AFE n=67	AFS n=22	AFW n=252	Gesamt n=407
Arg	43 65,2%	34 50,7%	13 59,1%	138 54,8%	228 56,0%
Cys	23 34,8%	31 46,3%	8 36,4%	109 43,3%	171 42,0%
Cys/Arg	0 0%	2 3,0%	1 4,5%	5 2,0%	8 2,0%

Unter Verwendung eines Chi²-Test und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden, ergab sich der p Wert =0,428.

5.4.3.3 DHFR-Codon 108

Um die in Codon 108 möglichen drei Aminosäurevarianten voneinander unterscheiden zu können, wurde ein 522 bp langes Produkt des Primerpaares M3-F/ oder ein 326 bp großes Amplifikat der Primer M4-F einem Enzymverdau, mit den Restriktionsendonukleasen *AluI*, *BsrI* und *BstNI* zugeführt.

In Folge der Resistenztestung kamen die in Tabelle15 aufgeführten Daten zustande.

Tabelle 15: Ergebnisse für Codon 108

DHFR Codon 108	AFC n=69	AFE n=68	AFS n=22	AFW n=261	Gesamt n=420
Asn	49 71,0%	53 77,9%	14 63,6%	146 55,9%	262 62,4%
Ser	10 14,5%	9 13,2%	5 22,7%	79 30,3%	103 24,5%
Ser/Asn	10 14,5%	6 8,8%	3 13,6%	36 13,8%	55 13,1%
Thr	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%

Unter Anwendung des Chi²-Test und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden, ergab sich ein p-Wert =0,008. Bei genauerer Untersuchung mittels einem Chi²-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen West- und Zentralafrika (p =0,0273) bzw. AFW und AFE (p =0,0291).

5.4.3.4 DHPS-Codon 436

Einen gelungener Nachweis der Wildtyp-Aminosäure Serin mit *MnlI* ergab sich bei insgesamt 234 Proben. Davon waren 31 (54,4%) aus AFC, 48 (77,7%) aus AFE, 16 (80%) aus AFS und 139 (63,8%) aus AFW. Die restlichen 122 Proben zeigten entweder bei 310 bp eine zusätzliche Bande oder eine Bandenkonstellation (n=22), welche für eine Mischinfektion sprach. Ob es sich bei der Mutation um ein Austausch der AS Serin nach Alanin handelte wurde durch einen weiteren Enzymverdau geklärt. Bei der Restriktion mit *MspA1I* wurden erneut alle in Frage kommenden Proben getestet.

Bei unklarer Ergebnislage d.h. bei widersprüchlichem Ergebnis wurden die Proben nochmals einer PCR und einem erneuten Verdau unterzogen.

Tabelle 16: Ergebnisse für Codon 436

DHPS Codon 436	AFC n=57	AFE n=61	AFS n=20	AFW n=218	Gesamt n=356
Ala	23 40,4%	10 16,4%	2 10,0%	65 29,8%	100 28,1%
Ser	31 54,4%	48 78,7%	16 80,0%	139 63,8%	234 65,7%
Ser/Ala	3 5,3%	1 1,6%	1 5,0%	11 6,4%	16 4,5%
Ser/X	0 0%	1 1,6%	1 5,0%	3 1,4%	5 1,4%
X	0 0%	1 1,6%	0 0%	0 0%	1 0,3%

(X= unbekannte Mutation)

Bei der Mutation X handelt es sich mit ziemlicher Sicherheit um einen Aminosäuretausch von Serin nach Phenylalanin.

Unter der Anwendung des Chi²-Test und der Voraussetzung das Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden, ergab sich ein p-Wert =0,0225.

Für den weiteren Vergleich zwischen den einzelnen Gebieten wurde ebenfalls ein Chi²-Test verwendet. Die Auswertung ergab signifikante Unterschiede in Bezug auf das Vorkommen einer Mutation oder das Vorliegen des Wildtyps zwischen AFC und AFE ($p = 0,0068$), AFC und AFS ($p = 0,0362$) und zwischen AFE und AFW ($p = 0,0418$).

5.4.3.5 DHPS-Codon 437

Codon 437 wurde ebenfalls mit zwei Enzymen überprüft. Bei positivem *MwoI* Verdau erhielt man ein 387 bp langes DNA-Stück. Dies trat bei 16 (80%) der Proben aus einer südafrikanischen Region und bei 72,6% ($n=45$) der ostafrikanischen Isolate auf. Einen negativen Verdau mit *MwoI* und damit eine Mutation, wiesen 47,2% ($n=168$) der Proben auf. Durch einen Kontrollverdau mit *AvaII* gelang eine Bestätigung des Ergebnisses und ferner konnten 5 Isolate als Mischinfektionen identifiziert werden.

Tabelle 17: Ergebnisse für Codon 437

DHPS Codon 437	AFC n=57	AFE n=62	AFS n=20	AFW n=217	Gesamt n=356
Gly	34 59,6%	17 27,4%	4 20,0%	113 52,1%	168 47,2%
Ala	22 38,6%	45 72,6%	16 80,0%	100 46,1%	183 51,4%
Ala/Gly	1 1,8%	0 0%	0 0%	4 1,8%	5 1,4%

Durch die Anwendung eines Chi²-Test und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden, ergab sich ein p-Wert =0,0001.

Ein Vergleich zwischen AFC und AFE ($p = 0,008$) oder AFC und AFS ($p = 0,0012$), ergab ebenso wie der Chi²-Test zwischen den östlichen und westlichen Teilen Afrikas ($p = 0,006$), signifikante Differenzen.

In Westafrika konnte durch die Untersuchung ein signifikant höherer Prozentwert der 437-Gly Mutation, im Gegensatz zu AFS ($p = 0,0048$), nachgewiesen werden.

5.4.3.6 DHPS-Codon 540

Auf Codon 540 ließ sich für keine der Proben aus AFS eine Mutation nachweisen. Lediglich drei Proben codierten nur für die Aminosäure Glutamat, alle Proben stammten ausnahmslos aus Ostafrika. Insgesamt 16 der getesteten Blutproben wiesen genetische Mischbilder auf.

Tabelle 18: Ergebnisse für Codon 540

DHPS Codon 540	AFC n=54	AFE n=61	AFS n=19	AFW n=217	Gesamt n=351
Glu	0 0%	3 4,9%	0 0,0	0 0,0	3 0,9%
Lys	51 94,4%	57 93,4%	19 100,0%	205 94,5%	332 94,6%
Lys/Glu	3 5,6%	1 1,6%	0 0%	12 5,5%	16 4,6%

Nach der Berechnung mit einem Chi²-Test und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden, ergab sich ein p Wert von 0,986.

5.4.3.7 DHPS-Codon 581

Auf Codon 581 bestand die Möglichkeit des Nachweises einer Mutation zu 581-Gly ebenfalls mit einem spezifischen Restriktionsenzym und einem weiteren Wildtyp-spezifischen „Enzymcut“ (*Bst*UI).

Ausnahmslos bei Isolaten aus den westlichen Teilen Afrikas (n=209) waren eine Mutation (0,4%) bzw. 3 Mischinfektionen (1,4%) zu finden. Bei allen anderen 331 (AFC n=52; AFE n=54; AFS n=20) Patienten trat allein der Wildtyp Alanin auf.

5.4.3.8 DHPS-Codon 613

Bei den Tests auf Resistenzmarker in Codon 613 wurde mit *MwoI* und *BsaWI* verdaut. Mit beiden Enzymen konnte man zwar auf den Wildtyp Alanin und eine Mutation testen, diese aber nicht genau spezifizieren. Fünf (1,5%) der insgesamt 337 samples reagierten positiv, dies läßt den Schluß das eine Mutation vorliegt zu. Alle 5 Proben stammen aus Gebieten im westlichen Afrika (n=211). Ob es sich bei den potentiell resistenten Stämmen um 613-Threonin oder 613-Serin Mutanten handelt, wurde durch den Versatz mit *AgeI* getestet. Alle Proben zeigten die charakteristische unverdaute Bande bei 161 bp, dies spricht für die Aminosäure Serin.

5.4.4 Polymorphismus auf Codon 76 des Pfcrt-Gens

Die Mutation des Pfcrt76_{Lys/Thr} Locus spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung und Entwicklung von Resistenz gegen Chloroquin. Bei 440 Patienten erfolgte eine Untersuchung von Codon 76. Mit einem spezifischen Enzymverdau wurde folgende Verteilungshäufigkeit der Mutation festgestellt:

Tabelle 19: Ergebnisse für Codon 76

Pfcrt	AFC	AFE	AFS	AFW	Gesamt
Codon 76	n=71	n=69	n=24	n=276	n=440
Thr	54 76,1%	58 84,1%	16 66,7%	174 63,0%	302 68,6%
Lys	15 21,1%	9 13,0%	8 33,3%	97 35,1%	129 29,3%
Lys/Thr	2 2,8%	2 2,9%	0 0%	5 1,8%	9 2,0%

Unter Verwendung des Chi²-Test und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden ergab sich ein p-Wert =0,0024.

Chi²- p-Wert Test für AFW versus AFC (p =0,0360) und AFW mit AFE (p =0,008)

5.4.5 Polymorphismen auf dem Pfmdr-Gen

Um die Prävalenz allelischer Polymorphismen des Pfmdr-Gens zu testen wurden nested PCR's mit anschließendem Restriktionsenzymverdau für die Codons 86, 1042 und 1246 durchgeführt.

5.4.5.1 Codon 86

An 313 Proben wurde das Vorliegen von Pfmdr86_{Asn/Tyr} Polymorphismus untersucht. Das bisher mit Resistenz assoziierte Allel 86-Tyr wurde bei 44,7% der gesamten Proben nachgewiesen. 33 (10,5%) Isolate zeigten eine Mischinfektion bestehend aus einem mutierten Stamm und einem Wildtyp.

Tabelle 20: Ergebnisse für Codon 86

Pfmdr Codon 86	AFC n=45	AFE n=52	AFS n=15	AFW n=201	Gesamt n=313
Tyr	22 48,9%	34 65,4%	10 66,7%	74 36,8%	140 44,7%
Asn	19 42,2%	14 26,9%	5 33,3%	102 50,7%	140 44,7%
Lys/Tyr	4 8,9%	4 7,7%	0 0%	25 12,4%	33 10,5%

Bei der Berechnung der Signifikanz mit Hilfe eines Chi²-Tests und der Voraussetzung, daß Mischinfektionen wie Einzelinfektionen behandelt wurden, ergab sich ein p-Wert =0,006. Bei genauerer Untersuchung ebenfalls durch einen Chi²-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Westafrika und Ostafrika (p =0,0013).

5.4.5.2 Codon 1042 und 1246

Von 350 durch Polymerase-Kettenreaktion getesteten Proben konnten für Codon 1042 nur 134 (38,3%) Proben und für 1246 nur 160 (48,8%) der Isolate amplifiziert werden. Auf Grund technischer Schwierigkeiten war es nicht möglich einen höheren Prozentsatz an positiven Ergebnissen zu erzielen.

Die Auswertung erfolgte nur für die einwandfrei amplifizierten Proben. Somit ist eine allgemeine Aussage über die Verteilung der Mutationen in den einzelnen Regionen nur bedingt möglich. Acht (Codon 1042) bzw. neun (Codon 1246) der PCR positiven Proben ergaben beim Verdau ein negatives Ergebnis. Die getesteten Patienten ergaben folgendes Verteilungsmuster für die Pfm_{dr}1042_{Asn/Asp} und Pfm_{dr}1246_{Asp/Tyr} Mutationen.

Tabelle 21: Ergebnisse für Codon 1042 und 1246

Pfm _{dr} Codon1042	AFC n=13	AFE n=24	AFS n=9	AFW n=80	Gesamt n=126
Asp	0 0%	3 12,5%	2 22,2%	8 10,0%	13 10,3%
Asn	13 92,9%	21 87,5%	7 77,8%	71 88,8%	112 88,9%
Asn/Asp	0 0%	0 0%	0 0%	1 1,2%	1 0,8%
Pfm _{dr} Codon1246	AFC n=15	AFE n=24	AFS n=9	AFW n=103	Gesamt n=151
Tyr	0 0%	7 29,1%	0 0%	3 2,9%	10 6,6%
Asp	15 100,0%	16 66,7%	7 77,8%	100 97,1%	138 91,4%
Asp/Tyr	0 0%	1 4,2%	2 22,2%	0 0%	3 2,0%

Ein Chi²-Test Signifikanztest wurden wegen der geringen Anzahl positiver Proben nicht durchgeführt

5.5 Mutationsanalyse an Codon 268 des Cytochrom-b Gen

5.5.1 Sensitivität der PCR sowie des Enzymverdau

Die Sensitivität der PCR, sowie des Verdau zeigte Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar. Sie ist für die PCR mit 80% am größten mit CYTb3/CYTb5, sowie am schwächsten für CYTb2/CYTb7 mit 67%. Bei dem darauffolgenden Enzymverdau wurden für alle 3 Reaktionen in Abhängigkeit vom PCR-Ergebnis ähnliche Prozentzahlen erzielt. Die größte Ausbeute mit 79,5% lag für das Primerpaar CYTb3/CYTb5 und das Enzym *NsiI* vor.

Tabelle 22: Sensitivität der PCR sowie des Enzymverdau in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar und Restriktionsenzym

	CYTb3/CYTb5 n=487		CYTb2/CYTb6 n=487		CYTb2/CYTb7 n=471	
	PCR	Verdau	PCR	Verdau	PCR	Verdau
n	391	387	332	320	313	292
%	80,3	79,5	68,2	65,7	66,5	62,0

5.5.2 Prävalenz des Codon 268 Polymorphismus

Bei der Restriktion mit *NsiI* wurden 99,7% geschnitten, d.h. alle diese Proben zeigten die Wildtypsequenz. Ein deutscher Tourist, der sich bei einer Reise nach Mali in Westafrika mit *Malaria tropica* infizierte zeigte ein Restriktionsmuster welches auf eine Mutation in Codon 268 schließen ließ. Beim nachfolgenden Verifizierungsverdau mit *AlnWI* wurde diese Probe geschnitten, dadurch konnte eine TCT Mutation detektiert werden. Somit wurde für die gefundene Mutation einen Aminosäuretausch von Tyr nach Ser in Codon 268 bewiesen. Die restlichen 319 Proben blieben mit *AlnWI* unverdaut. Beim schneiden mit *SspI* wurden 292 Proben geschnitten, d.h. es war keine AAT Mutation vorhanden. Damit ergab die Analyse der Polymorphismen an Codon 268 für alle, bis auf eine der verdauten Proben, die Wildtypsequenz TAT welche für die Aminosäure Tyrosin codiert.

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Resistenzuntersuchung in Afrika

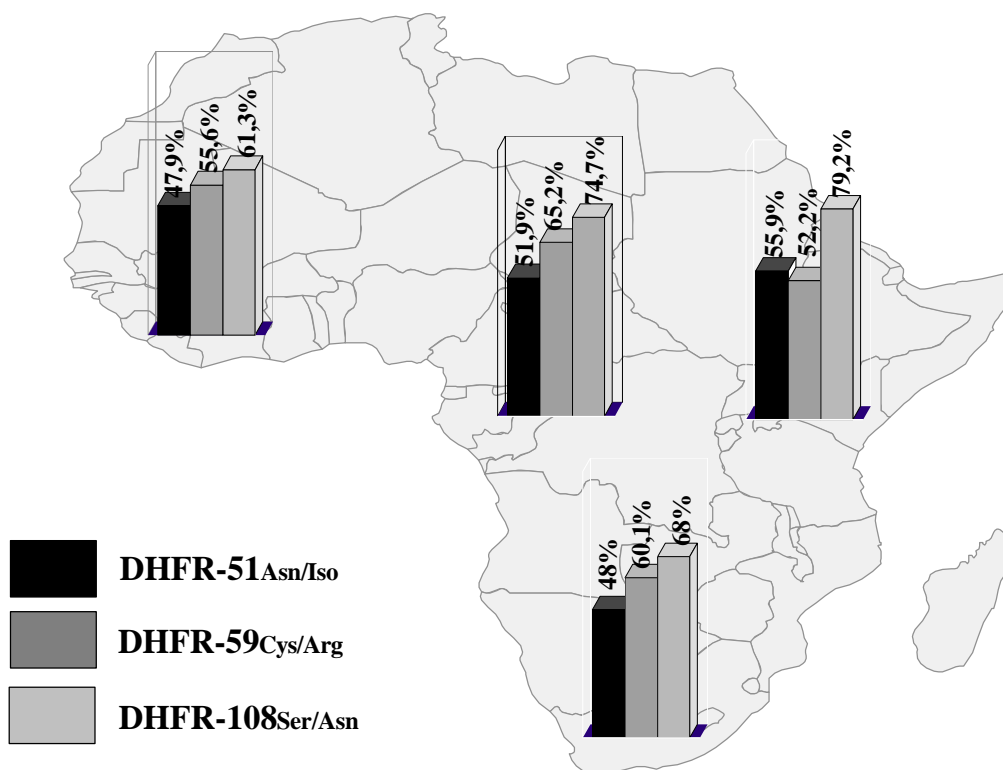
Die nachfolgenden Unterpunkte zeigen eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Resistenzuntersuchungen aus Abschnitt 5.4.

5.6.1 DHFR-Gen

Bei der Entwicklung von Resistenz gegen Gruppe I Antifolate wurde der Mutation auf Codon 108 des DHFR Gens eine entscheidende Rolle beigemessen. Die anderen Mutationen auf Codon 51 bzw. auf Codon 59 üben einen modulierenden Effekt auf die Entwicklung von Resistenzen aus. In Abbildung 30 wurden die Ergebnisse der DHFR-Resistenzgene zusammengefaßt.

Abbildung 30:

Verteilung von Punktmutationen in Codon 51, 59 und 108 des DHFR-Gen in Regionen südlich der Sahara

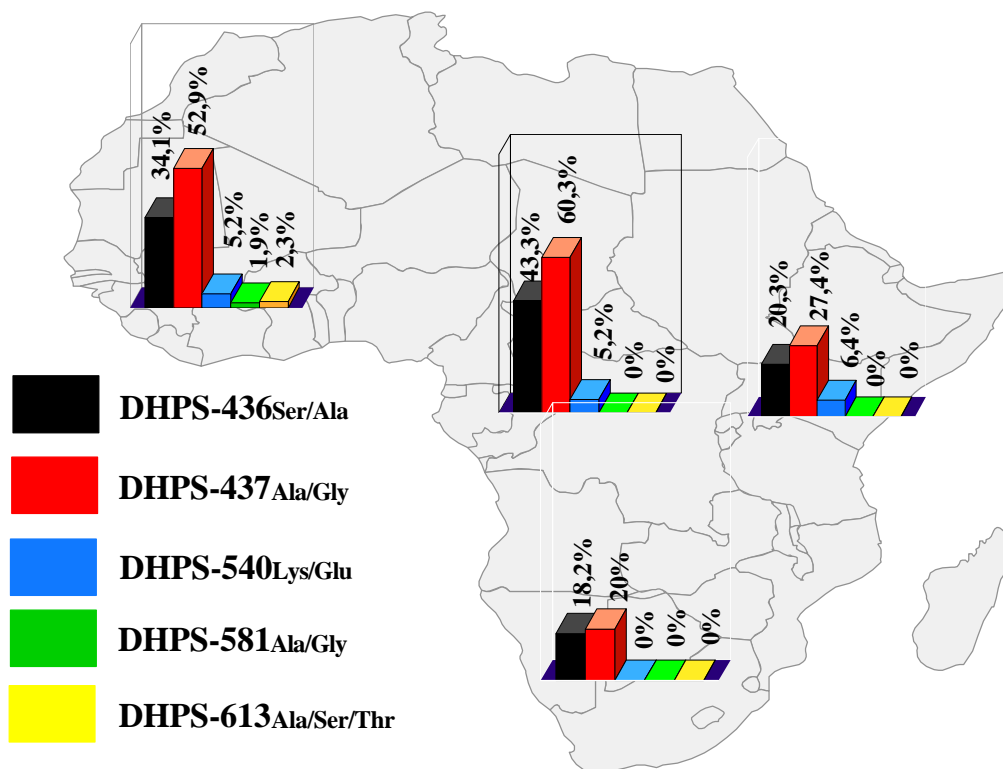


5.6.2 DHPS-Gen

In ähnlicher Weise verhält es sich beim DHPS-Gen. Hier scheinen die Mutation 436_{Ser/Gly} und 437_{Ala/Gly} einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung und die phänotypische Prädisposition von Resistenz gegen Gruppe II Antifolate zu haben.

Abbildung 31:

Verteilung von Punktmutationen der Codons 436, 437, 540, 581 und 613 des DHPS-Gen in afrikanischen Regionen



5.6.3 Pfcrf und Pfmdr-Gen

Chloroquin Resistenz wurde mit Mutationen auf Codon K76T des Pfcrf-Gen und mit Mutationen der Pfmdr1 Loci, Codon 86, 1042 und 1246 in Verbindung gebracht. Für die genetischen Veränderungen des Pfcrf bzw. Pfmdr Gens ergibt sich folgendes Verteilungsmuster in Tabelle 23 Auf Grund der geringen Anzahl an positiven Proben für die Positionen 1042 und 1246 werden diese in dieser Auswertung nicht berücksichtigt

Tabelle 23: Prozentuale Verteilung von Punktmutationen auf dem Pfcrf-und Pfmdr-Resistenzgen in Regionen südlich der Sahara

Mutation	AFC	AFE	AFS	AFW
Pfcrf-76	76,7%	84,5%	66,7%	63,7%
Pfmdr-86	53,1%	67,9%	66,7%	43,8%

5.6.4 Kombinationen der Einzelmutationen

Durch Kombination bestimmter Mutationen kann ein höherer Grad an Resistenz erreicht werden. Zusätzlich kann eine Kombination aus Mutationen im DHPS- und DHFR-Gen ein therapeutisches Versagen bei sogenannten Kombinationsmedikamenten wie Fansidar® oder Cotrimoxazol® bewirken. Eine Übersicht über die wichtigsten vorgefundenen Kombinationen zeigt Tabelle 24.

Es kann sich in dieser Tabelle auch um sog. Mischinfektionen d.h. Infektionen mit mehreren Parasitenstämmen pro Patient handeln. Deshalb ist es nicht möglich daraus auf einzelne *Plasmodium falciparum* Stämme zu schließen.

Die Dreifach-Mutation DHFR (108_{Ser/Asn}, 51_{Asn/Iso} und 59_{Cys/Arg}) wurde in 143 (37,9%) der getesteten Blutisolate gefunden. Auf dem DHPS Gen konnten keine Tripelmutionen der Kombination 436/437/581 und 436/540/613 und 436/540/581 gefunden werden. Eine DHPS 437_{Ala/Gly} und DHPS 540_{Lys/Glu} - Kombination konnte in einigen Studien als genetische Veränderung verifiziert werden, welche eine eine Resistenz gegen Sulfonamide verursacht. Der Anteil der in dieser Erhebung positiv getesteten Proben bezogen auf die Gesamtmenge betrug 3,7%. DHFR (108_{Ser/Asn}, 51_{Asn/Iso} und 59_{Cys/Arg}) zusammen mit DHPS 437_{Ala/Gly} zeigten nur 28,1% der zentral- und 20,3% der westafrikanischen Proben.

Bei 57,7% der Proben aus den östlichen Teilen Afrikas konnte eine Kombination aus Pfcrt76_{Lys/Thr} und Pfm_{dr86}_{Asn/Tyr} detektiert werden, wobei ein Teil der Proben (24,4%) keine der beiden Mutationen zeigte.

Tabelle 24: Kombinationen der wichtigsten vorgefundenen Einzelmutationen in Abhängigkeit zu den Studiengebieten

Resistenzgen/Codon	AFC n(%)	AFE n(%)	AFS n(%)	AFW n(%)
51/59/108	27(44,3%)	22(39,3%)	8(36,4%)	86(36,1%)
51/59	27(44,3%)	22(39,3%)	9(40,9%)	87(36,6%)
51/108	40(65,6%)	37(66,1%)	10(45,5%)	105(44,1%)
59/108	40(65,6%)	34(60,7%)	13(59,1%)	134(56,3%)
436/437	8(14,0%)	4(6,6%)	3(15,0%)	46(21,2%)
436/437/540	0	1(1,6%)	0	5(2,3%)
437/540	3(5,5%)	3(4,9%)	0	7(3,2%)
108/51/436	16(28,1%)	10(19,2%)	0	26(11,9%)
108/51/437	24(42,1%)	18(32,1%)	1(5,0%)	52(23,9%)
108/51/436/437	4(7,0%)	3(5,4%)	0	16(7,4%)
108/51/437/540	1(1,9%)	2(3,6%)	5(25,0%)	8(3,7%)
108/59/436	15(26,3%)	6(10,7%)	1(5,0%)	31(14,3%)
108/59/437	19(33,3%)	12(21,4%)	2(10,0%)	62(28,6%)
108/59/436/437	4(7,0%)	3(5,3%)	0	16(7,4%)
108/51/59/437	16(28,1%)	11(17,9%)	1(5,0%)	44(20,3%)
108/51/59/436/437	3(5,3%)	1(1,8%)	1(5,0%)	13(6,0%)
76/86	24(54,5%)	30(57,7%)	7(46,7%)	75(37,3%)

5.7 Assoziation verschiedener molekularer Marker mit dem Verlauf einer importierten Malariainfektion

Um eventuell Aussagen über den Verlauf einer Malariaerkrankung oder Zusammenhänge zwischen Patientengruppen und den getesteten Markern machen zu können, wurden verschiedene molekulare Marker mit Patientendaten korreliert.

5.7.1 Komplizierte Fälle versus unkomplizierte Verläufe

Eine Abgrenzung von komplizierten gegen nicht komplizierte Malariaverläufe war in 320 (58,5%) Fällen möglich. Bei 35 (11%) Patienten kam es zu einem komplizierten Verlauf der Malaria tropica, wobei sieben daraus der bereits definierten Untergruppe „semi-immun“ zugeordnet wurden. Die Kriterien für einen schweren Verlauf wurden anhand des ICD10 Codes bestimmt. Dadurch konnte zwischen einer

- Malaria tropica mit schwerer Form der Erkrankung oder Komplikationen und
- Malaria tropica mit zerebralen Komplikationen

unterschieden werden.

Bei 6 Patienten (3 weiblichen und 3 männlichen) kam es zu zerebralen Komplikationen. Vier dieser sechs Fälle infizierten sich in westlich gelegenen Regionen des afrikanischen Kontinents. Ein Patient aus der Gruppe der „zerebralen Komplikationen“ und acht aus der Gruppe der „sonstigen Komplikationen“ verstarben an der Schwere einer Malariainfektion. Alle 9 Verstorbenen der durch TropNetEurop gemeldeten Fälle, waren ausnahmslos Europäer.

30 (85,7%) aller komplizierten Verläufe wurden durch Infektionen verursacht, bei welchen sich Patienten mit Malariaparasiten aus den Gebieten südlich der Sahara infiziert hatten. 48,6% (n=17) aller komplizierten Verläufe ließen auf sich auf die Länder in AFW zurückführen.

12 (34,3%) der 35 schweren Malariafälle waren Frauen. Bei den unkomplizierten Verläufen teilte sich die Studienpopulation in 173 (69,2%) Männer und 77 (30,8%) Frauen auf. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Bezug zwischen dem Geschlecht und dem „klinischen outcome“ (p =0,5 Fisher-exact-two-tailed-test).

In der Gruppe „Komplikationen“ und „Exitus“ waren die Personen signifikant älter als in der Vergleichsgruppe.

Nach Auswertung der Altersvariable ergab sich für beide Klassen ein p-Wert von 0,0001 (Mann-Whitney/Wilcoxon) im Vergleich zu den Personen der unkomplizierten Gruppe.

Tabelle 25: Altersverteilung in den 3 unterschiedlichen Gruppen

Alter (Jahre)	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
kompliziert	35	45,7	13,6005	22,0	34,0	49,0	55,0	72,0
unkompliziert	285	34,5	14,6524	0,0	27,0	33,0	43,0	76,0
Exitus*	9	55,0	7,9687	45,0	59,0	54,0	58,0	72,0

Für die weitere Auswertung von möglichen Assoziationen zu molekularen Markern des *Plasmodium* Parasiten mußten Einschränkungen getroffen werden um eine gleiche Basispopulation zu erhalten. Als Einschlußkriterium war ein positiver Nachweis für mindestens eine Familie des MSP1 und MSP2 Genes sowie eine Gelbande nach erfolgter EBA-PCR nötig. Ein Auswertung nach verschiedenen Parasit spezifischen Merkmalen erbrachte folgendes Ergebnis

*Alle 9 Patienten sind ebenfalls in der Gruppe der komplizierten Fälle enthalten.

Tabelle 26: Molekulare Marker, komplizierte versus unkomplizierte Fälle

	kompliziert	unkompliziert	Exitus
Anzahl	27	213	8
MSP1- Allel(%)			
MAD20	40,4	42,7	75,0
K1	48,1	69,0	62,5
RO33	51,9	29,1	50,0
MSP2- Allel(%)			
IC	96,3	85,9	100
FC27	44,4	62,4	75,0
EBA-175(%)			
F-Fragment	51,9	53,1	50,0
C-Fragment	37,0	34,3	25,0
Mischinfektion*	11,1	12,7	25,0
Zahl der Klone			
MSP1	1,56	1,50	2,37
MAD20	1,18	1,05	1,33
K1	1,15	1,09	1,40
RO33	1,00	1,00	1,00
MSP2	2,19	2,12	2,75
IC	1,54	1,40	1,75
FC27	1,58	1,48	1,33

Für die Allelhäufigkeit in Abhängigkeit zur Verlaufsform ergibt sich bei den Allelfamilien MAD20, IC und FC27 kein signifikanter Unterschied ($p > 0,1$). Beim Vergleich zwischen kompliziertem und unkompliziertem Verlauf in Abhängigkeit zur Allelfamilie RO33, erhält man nach Fisher-exact-two-tailed Testung einen p-Wert von 0,0264. Ebenfalls einen signifikanten Unterschied beobachtete man nach Prüfung der Verteilungsprävalenz bei der Familie K1 ($p = 0,0490$), die sich häufiger bei Patienten mit milden Verläufen fand.

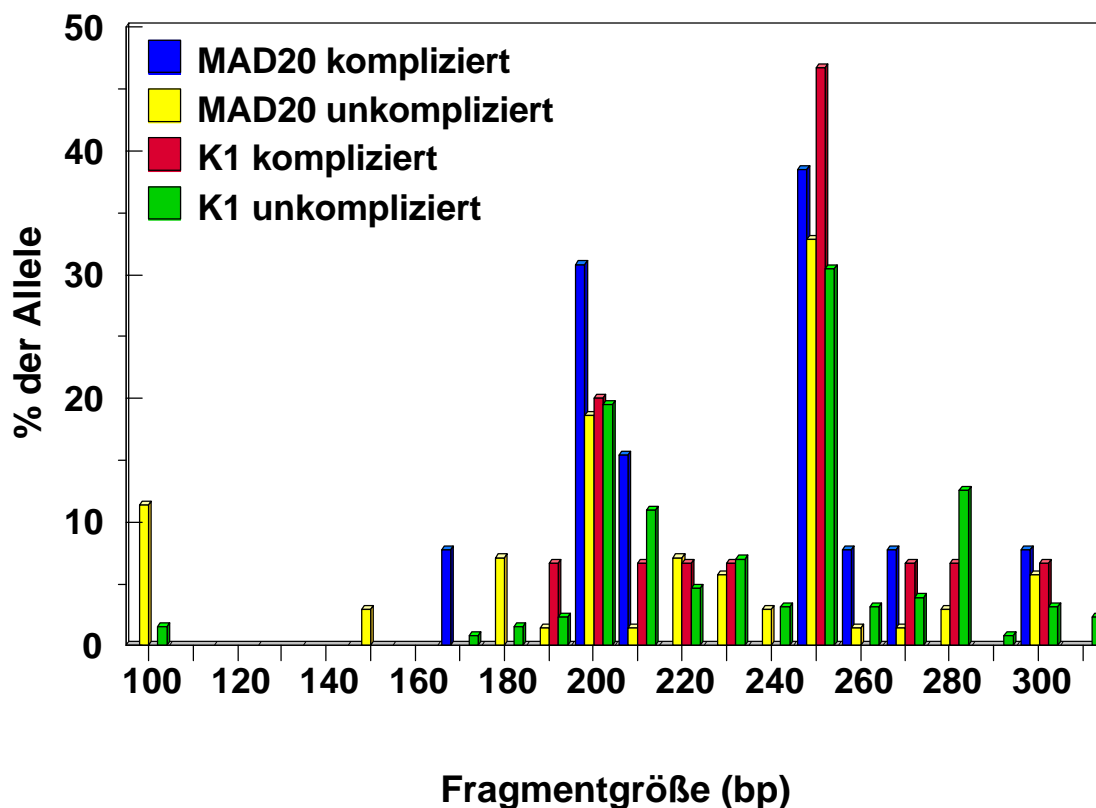
Die EBA-Auswertung, Mischinfektionen wurden als Einzelinfektionen gewertet, ergab keine signifikante Assoziation zwischen den einzelnen EBA-175 Fragmenten und einem komplizierten bzw. unkomplizierten Verlauf ($p > 0,1$ Fisher-exact-test). Dies läßt auf keine bevorzugte Prävalenz in einer der Gruppen schließen.

Die Signifikanzprüfung auf Anzahl der Clone von MSP1 und MSP2 ließ keinerlei Rückschlüsse auf einen erhöhten oder erniedrigten Wert in den beiden Gruppen zu ($p > 0.05$ Kruskal-Wallis Test).

Im Vergleich der Exitusgruppe mit unkomplizierten Verläufen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Durchschnittswerte für MAD20 ($p = 0,0111$) und K1 ($p = 0,0295$) Clone.

Abbildung 32:

Prävalenz der Allelfamilien MAD20 und K1 des MSP1 Gen im Vergleich zum klinischen Verlauf



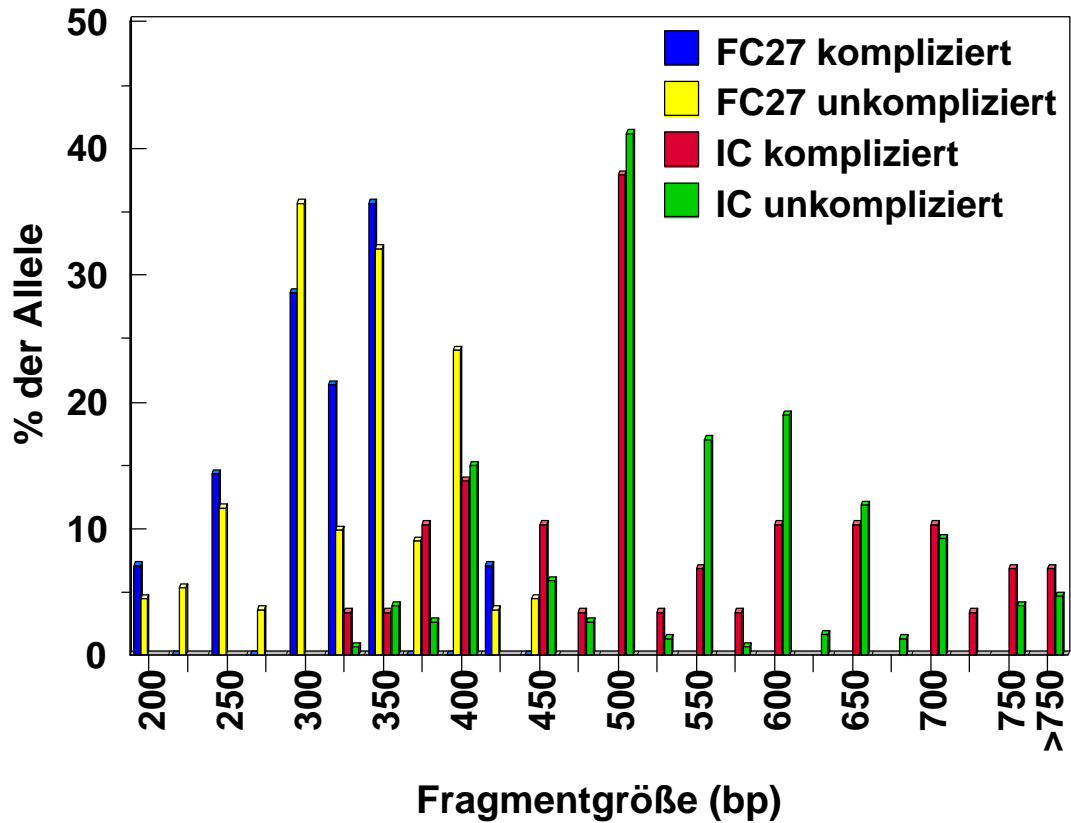
Die Allelfragmente der Familie RO33 sind nicht dargestellt, da alle untersuchten Proben entweder eine Bande bei 160bp, 170bp oder 180bp aufwiesen. Alle 3 Fragmenttypen waren in den zwei Gruppen nahezu identisch verteilt, wobei die Bande bei 160bp beide Male mit über 85% dominierte.

In den Kollektiven zeigt sich eine nahezu systematisch verlaufende Verteilung. Sowohl in der Gruppe mit Komplikationen als auch in der anderen waren die Parasitenclone für MAD20 mit einer Bande bei 250 bp am häufigsten. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen klinischen Verläufen und dem prozentualen Vorkommen der einzelnen Fragmente (Fisher-exact-test $p > 0,1$).

Bei Betrachtung der K1 Familie gab es Parallelen zu MAD20, denn auch hier dominierte eine Bande bei 250bp, ohne jedoch signifikant verteilt zu sein (Fisher-exact-test $p > 0,1$).

Abbildung 33:

Prävalenz der Allelfamilien FC27 und IC des MSP2 Gen im Vergleich zum klinischen Verlauf



Bei den Familien der MSP2 Gene konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung gefunden werden, obwohl bei den komplizierten Fällen das FC27 bei 350bp und bei den unkomplizierten Fällen das 300bp Fragment gehäuft auftrat (Fisher-exact-test $p > 0,1$).

Ein Signifikanztest für die IC Familie ergab keinerlei Unterschiede, da auch beide Gruppen die 500bp verstärkt zeigten.

5.7.2 Malariainfektionen von Immigranten versus importierte Infektionen durch Europäer

Für eine weitere Analyse wurden die Patienten nach zwei Gruppen klassifiziert :

- Immigranten, Flüchtlinge und ausländische Besucher als „semiimmune Patienten“
- Europäische Reisende als „nichtimmune Patienten“

Bei 333 (60,9%) Probanden konnte eine Einteilung nach oben genannten Kriterien erfolgen. Die Definition „semi-immuner Patient“ erfüllten 164 Patienten, davon waren 47 (29%) Frauen und 71% (n=117) Männer. Das Durchschnittsalter lag bei 32,2 Jahren (Median=32 Jahre; Intervall: 0-57 Jahre).

Die Begriffserklärung „nichtimmuner Reisender“ wurde von 60 (36%) Frauen und 109 (64%) Männern (n=169) erfüllt. Bei dieser Gruppe lag das Durchschnittsalter bei 39,2 Jahren (Median=38 Jahre; Intervall:1-79 Jahre).

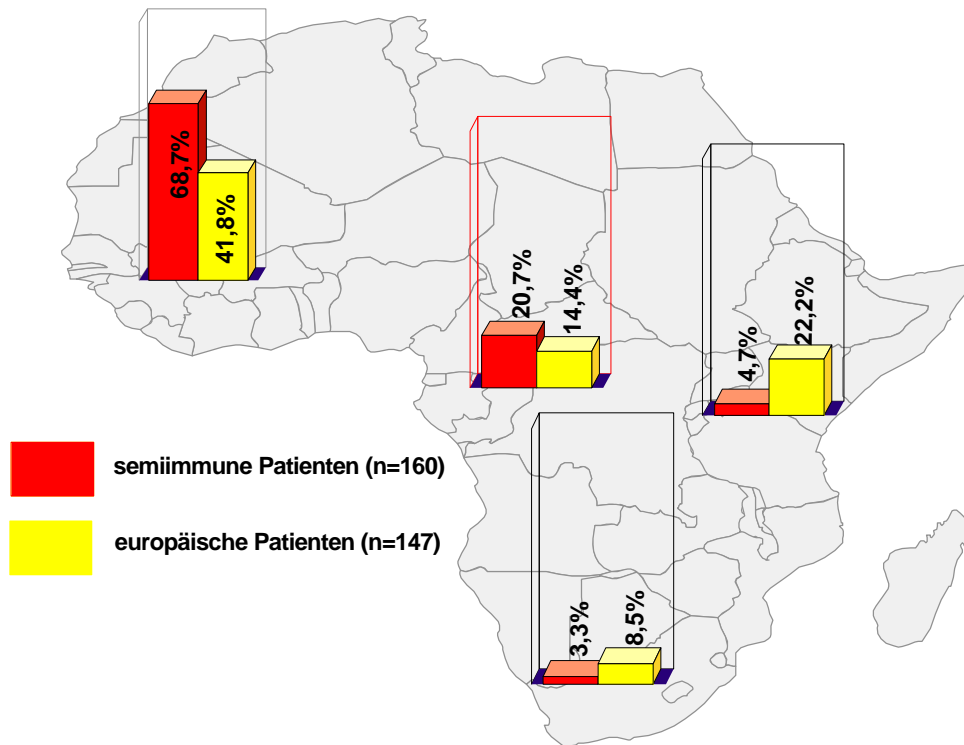
Sieben ausländische Patienten und 23 der Europäer entwickelten die im unter Punkt 5.7.1 abgehandelten Komplikationen.

Bei 307 (92,2%) der Isolate konnte eine erworbene Infektion einer der vier afrikanischen „main areas“ zugeordnet werden.

Insgesamt wurden von 164 „semiimmunen Patienten“ 160 (97,3%) aus Ländern südlich der Sahara rekrutiert. Während Westafrika die meisten Isolate zu beiden Gruppen beisteuerte, stellten sich Europäer relativ gesehen häufiger nach Reisen aus Süd-bzw. Ostafrika bei den angeschlossenen TropNetEurop Instituten vor (Abbildung 34). INS und Madagaskar stellten mit je 8 bzw. 4 „nicht-immunen“ Reisenden den größten Teil der außerhalb der afrikanischen Regionen infizierten Patienten.

Abbildung 34:

Patientengruppen (n=307) mit prozentualer Häufigkeit und der Infektionsregion



Die prozentuale Verteilung der EBA Fragmente, Mischinfektionen wurden wie Einzelinfektionen behandelt und somit je zum F- bzw. zum C-Fragment Wert addiert, ergab folgende Unterschiede.

Bei europäischen Patienten die nach einer Reise nach AFW vorstellig wurden, waren die F-Fragmente signifikant häufiger vorhanden als das C-Segment ($p = 0,0087$ Fisher-exact-test).

Bei den „semiimmunen“ Immigranten, Flüchtlingen bzw. ausländischen Besuchern aus nichteuropäischen Ländern war festzustellen, daß in AFC und Ostafrika eine signifikant höhere Zahl mit den FCR-Stämmen infiziert waren (AFC $p = 0,0374$ und AFE $p = 0,0476$ Fisher-exact-test).

Anschließend wurde die Gruppe der „Nichtimmunen“ gegen die der „Semiimmunen“, arealspezifisch auf die unterschiedlichen EBA-Fragmente verglichen. Sowohl bei der Verteilung des F- wie auch bei der Häufigkeit des C-Fragmentes unterschied sich die „Immigrantengruppe“ in den 4 afrikanischen Territorien nicht von der europäischen Gruppe ($p > 0,1$).

Tabelle 27: Molekulare Marker der Patientengruppen und aufgeteilt nach afrikanischen Regionen

	AFC	AFE	AFS	AFW
semiimmun (n=160)	34	10	6	110
EBA-175 (%) ¹				
F-Fragment	63,3	80,0	40,0	49,2
C-Fragment	33,3	0	60,0	39,4
Mischinfektion*	3,3	20,0	0	11,1
MSP1- Allel (%) ²				
MAD20	38,2	20,0	33,3	30,9
K1	64,7	30,0	33,3	59,1
RO33	26,5	40,0	50,0	18,2
MOI MSP1	1,45	1,29	1,60	1,43
MSP2-Allel (%) ²				
IC	76,5	50,0	83,3	67,3
FC27	61,8	10,0	66,7	50,0
MOI MSP2	2,27	1,00	2,60	2,03
nichtimmun (n=147)	23	38	14	72
EBA-175 (%) ¹				
F-Fragment	50,0	53,1	53,8	54,0
C-Fragment	27,3	46,9	38,5	27,0
Mischinfektion*	22,7	0	7,7	19,0
MSP1- Allel (%) ²				
MAD20	47,8	31,6	21,4	38,9
K1	60,9	44,7	28,6	56,9
RO33	39,1	28,9	21,4	29,2
MOI MSP1	1,76	1,43	1,22	1,68
MSP2-Allel (%) ²				
IC	78,3	71,1	57,1	72,2
FC27	52,2	34,2	28,6	51,4
MOI MSP2	2,2	1,87	1,33	2,12

¹Bei der Berechnung wurden nur Proben berücksichtigt die ein positives Ergebnis bei einer EBA-PCR lieferten.

²Zur Auswertung wurden nur Proben herangezogen bei denen die Anzahl der Clone für MSP1 oder MSP2 mindestens gleich eins war.

Um auf signifikante Unterschiede in der Allelverteilung zwischen potentiell als „semi-immun“ geltenden Patienten und europäischen Reisenden zu schließen, wurden die Gruppen gebietspezifisch miteinander verglichen.

Mittels eines Chi² Testes sollte ermittelt werden ob es zwischen den Gruppen zu signifikanten Differenzen in der Allelhäufigkeit gekommen ist. Alle errechneten p Werte waren $>0,05$.

Durch Bestimmung des Wahrscheinlichkeitswertes nach Kruskal-Wallis waren in einheimischen Patienten aus AFE signifikant weniger Clone von MSP2 zu finden ($p=0,0273$).

Im Gegensatz zu Gebieten aus Südafrika wo Reisende signifikant geringere MOI MSP2 Werte besaßen ($p=0,0053$).

6 Diskussion

6.1 Patientendaten

Bei den 333 Reisenden gaben 92,8% an, in irgendeiner Form Krankheitssymptome während oder nach der Reise bemerkt zu haben. Zunächst ist zu beachten, daß in die Studie europäische Touristen und Reisende sowie Immigranten, Flüchtlinge und ausländische Besucher (aus Nicht-EU Ländern) aufgenommen worden sind. Multifaktorielle Ursachen können für die importierten Erkrankungen verantwortlich sein. Faktoren wie Reiseland, Reisezeit, Endemiegrad und der Erfolg einer eventuellen Expositionsprophylaxe spielen eine entscheidende Rolle. Für „nicht-immune Europäer“ birgt das tropische Afrika, mit einer generell höheren Endemizität, weiterhin ein erhöhtes Malaria Risiko [131, 95, 85]. Wie diese Studie belegt, waren 92,2% aller gesammelten Blutproben mit einem Protozoen aus Afrika infiziert. Die Exposition eines Urlaubers bzw. Touristen gegenüber dem Vektor, der die Parasiten überträgt, ist abhängig von der Reiseart (z.B. Pauschalreise oder Rucksacktourismus) aber auch vom Zeitpunkt der Reise.

Patienten die sich in Westafrika infizierten, steuerten zu dieser Studie bei weitem die den größten Anteil an Isolaten bei (Abb. 27). Es ist schwierig aus diesen Daten Vorhersagen über das Infektionsrisiko in einem der untersuchten Gebiete zu machen. Wir haben keinerlei Informationen über Reiseaktivitäten und oftmals nur ungenaue Angaben des Patientenkollektivs bezüglich des Infektionslandes. Es wäre denkbar, daß die große Anzahl an *P. falciparum* Infektionen nur eine erhöhte Reiseaktivität in oder aus AFW widerspiegelt, nicht jedoch ein erhöhtes Infektionsrisiko. Dennoch existieren Berichte der WTO (World Tourism Organisation), daß nur wenige Europäer in westafrikanische Länder reisen. Daraus kann geschlossen werden, daß man bei Reisen in westafrikanische Gebiete bei ungenügender Expositionsprophylaxe, einem erhöhten Risiko ausgesetzt ist, an einer *Falciparum* Malaria zu erkranken. Im Umkehrschluß hieße das auch, daß bei vergleichbar höherer Anzahl der Reisenden nach Asien, das Infektionsrisiko in den Gebieten Südostasiens ungleich geringer ist. In unserer Studie stammten gerade 5 Proben aus Südostasien. Den größten Anteil an „Blutspots“ welche nicht einer afrikanischen Region zugerechnet werden konnten, machten 15 (2,9%) Patienten aus. Diese hielten sich zeitweilig im indonesischen Raum auf. Solche Ergebnisse konnten auch durch andere Studien belegt werden [108, 122].

Eine weitere Komponente die differenziert betrachtet werden muß, ist die Gruppe der Immigranten. Zu dieser Gruppe liegen keine exakten Daten bezüglich der genauen Reise- bzw. Immigrationsrouten der Patienten vor. Es ist durchaus denkbar, daß Patienten während der Flucht, die sich oft über einen Zeitraum von mehreren Jahren erstrecken kann, sich in einem Dritt- oder Transitland mit *Plasmodium falciparum* infiziert haben [21].

Die wenigsten der hier beschriebenen Probanden (unter 20%) nahmen eine für das Reisgebiet geeignete und der Resistenzlage vor Ort angepaßte Chemoprophylaxe ein. Durch geeignete Medikamente kann die Schutzrate vor einer Infektion über 90% betragen, abhängig vom Aufenthaltsgebiet der Reisenden [159, 74]. Es ist davon auszugehen, daß zumindest bei den europäischen Touristen eine Infektion mit einer entsprechenden Expositionsprophylaxe hätte verhindert werden können.

Obwohl es keinen signifikanten Unterschied bei der Häufigkeit der Symptome zwischen der „semiimmunen“ und der „nichtimmunen Gruppe“ gab, war doch auffallend, daß bei den am häufigsten genannten Beschwerden die Immigranten mit drei von vier Symptomen prozentual häufiger betroffen waren (Tab. 10).

Von den 333 ausgewerteten Fragebögen bestätigten 24 Personen, keinerlei Krankheitssymptome bemerkt zu haben, obwohl eine *Falciparum* Infektion zweifelsfrei nachgewiesen wurde. 8 der asymptomatischen Patienten waren Immigranten. Nur einer der 24 Probanden bestätigte die Einnahme einer Chemoprophylaxe.

Eine mögliche Erklärung für den Ausbruch der Erkrankung wäre, daß Patienten die als Immigranten in dieser Studie geführt sind, schon über einen längeren Zeitraum keinem Malariaerreger mehr ausgesetzt waren, bzw. schon längere Zeit in malariafreien Gebieten leben und ggf. nur Reisen in ihr Heimatland unternommen haben. In beiden Fällen kann es zum Verlust der entwickelten Semiimmunität kommen, welche eine etwaige Infektion toleriert und vor einer Erkrankung schützt.

Obwohl die Zahl der eingeschlossenen Immigranten mit Komplikationen mit 3,4% wesentlich geringer war als die der Europäer mit 6,9%, befanden sich doch einige von ihnen in einem kritischem Zustand. Alle neun an einer Malaria Infektion verstorbenen Patienten waren Europäer. Davon wurden sieben (77,8%) in afrikanischen Ländern mit Protozoen der Spezies *falciparum* infiziert.

6.2 Verteilungsfrequenz der EBA-175 Fragmente in Isolaten aus Afrika

Wie bereits mehrfach erwähnt konnte eine sinnvolle Auswertung der Daten aus Mangel an Proben aus anderen geographischen Regionen nur bedingt erfolgen. Hier wurden nur afrikanische Isolate berücksichtigt.

Durch Interaktion und „Brückenbildung“ zwischen parasitären Merozoitenoberflächenliganden und Erythrozytenrezeptoren dringt *P. falciparum* in die Wirtszellen ein [2, 30]. Das Erythrozyten-bindende-Antigen-175 spielt dabei eine entscheidende Rolle, es scheint die Invasion über Sialsäure an den Glykophorin A Rezeptor zu modulieren [152]. Durch eine dimorphe Struktur in Region III kann zwischen einem F-Fragment (FCR-Stamm) und einem C-Segment (cAMP-Stamm) unterschieden werden [176].

Mit einer etablierten PCR-Methode [42, 165] wurde die Verteilung der beiden unterschiedlichen EBA-175 Fragmente von *Plasmodium falciparum* in Afrika untersucht.

Ergebnis sollte die Verteilungsfrequenz der Fragmente in den einzelnen Studiengebieten in Afrika sein, da bis dato keine großen Studien über eine EBA-175 Prävalenz gemacht wurden.

Es wurden 441 Patienten aus afrikanischen Infektionsgebieten zur EBA-Bestimmung herangezogen. Bezogen auf ganz Afrika wurde bei 57,2% der Proben der F-Typ und bei 42,8% das C-Fragment gefunden. Wie aus diesen Werten zu schließen ist, kam es zu keiner gravierenden Immunselektion hinsichtlich eines der Allele. Nach gesonderter Betrachtung der einzelnen Studiengebiete ist aus Abb. 28 und 29 ersichtlich, daß auch hier in allen Gebieten das F-Fragment eine dominantere Rolle spielt. In Zentralafrika war der Unterschied der Verteilung mit 63,3% für das F- und 36,7% für das C-Segment am höchsten ohne jedoch einen signifikanten Wert zu erreichen.

Diese Untersuchungen stehen in Einklang mit einer erst kürzlich durchgeführten Studie in Laos [42]. Auch hier kam es nicht zu einer stark vermehrten Detektion eines Fragmentes, dennoch war das 794 bp lange F-Fragment häufiger vertreten. Die Ergebnisse für Nordlaos mit 35% C-Allelhäufigkeit sind mit unseren Ergebnissen für AFC vergleichbar. Im Gegensatz dazu steht die von Binks et al. (2001) veröffentlichte Studie. Hier kam es in vier (Gambia, Nigeria, Gabun und Südafrika) von fünf untersuchten Arealen zu einer klar höheren Prävalenz der FCR-Fragmente.

Eine Ausnahme bildete der Sudan, hier fand sich die umgekehrte Situation in der Form, daß 73% der Isolate ein C-Segment aufwiesen. In allen Erhebungen ist die Tendenz erkennbar, daß sich ein F-Fragment häufiger durchsetzt.

In der vorliegenden Studie konnte bei zwei Patienten der Sudan als ausschließliches Infektionsland festgestellt werden. In beiden samples waren nur Parasiten des cAMP-Stammes zu finden was die Ergebnisse von Binks et al. (2001) zu bestätigen scheint [19]. Mehr Proben aus dem Sudan könnten helfen diese Tendenz zu bestätigen.

In einer im Herbst 2002 in Ghana durchgeführten Studie (Mockenhaupt et al. unpublished data) wurde ebenfalls die Verteilung der EBA-Fragmente untersucht (Cramer et al. 2004 *Malaria Journal in print*). Auch dort war das F-Segment in beiden Studienkohorten mit 70% bzw. 61 % weitaus häufiger präsent. Bei einem ebenfalls vergleichbaren Prozentsatz (11%) konnte auch hier eine Mischinfektion festgestellt werden. Diese Prävalenzen sind konform zu denen von Binks et al. (2001) veröffentlichten westafrikanischen Daten.

Der Vergleich bereits vorliegender und gewonnener Daten ist schwierig und läßt keine einfache Interpretation zu. Alle bisherigen Studien bezogen sich auf kleine Gebiete innerhalb eines Landes, mit einer ethnisch relativ gleichen Studienpopulation. Die Bevorteilung eines der Fragmente könnte mehrere Gründe haben. Zum einen ist anzunehmen das verschiedene Parasitenpopulationen in den Regionen vorliegen, zum anderen ist es wie die Gruppe um Binks et al. (2001) bereits formulierte wahrscheinlich, daß Unterschiede in den Wirtspopulationen eine Rolle bei der Selektion hinsichtlich eines der Fragmente spielen können. Die Theorie, daß eine unterschiedliche genetische Prädisposition für die Selektion

verantwortlich sein könnte, kann auch in unserer Studie von Bedeutung sein. Wir haben nicht nur ethnisch unterschiedliche Völker innerhalb eines Kontinentes vergleichen, sondern auch „nichtimmune Europäer“ mit in die Studienpopulation eingeschlossen.

Ein weiterer Grund für eventuelle Unterschiede in der Verteilungsfrequenz, könnte durchaus auch ein zufälliger Wechsel in der Allelhäufigkeit sein.

Dennoch bleibt fest zuhalten, daß obwohl Unterschiede in den Populationen bestanden und die einzelnen Gruppen verschieden verteilt waren, immer eine vermehrte Selektion des F-Fragments nachgewiesen wurde.

EBA-175 ist ein Antigen Kandidat der in multikomponenten Malariavaccinen enthalten ist [27]. Alle Versuche einen Impfstoff zu entwickeln befinden sich noch in prä- oder klinischen Phasen (I-III), bzw. sind über *in vitro* Versuche nicht hinausgegangen [68, 195, 196]. Es besteht dennoch die Hoffnung, daß in ferner Zukunft ein Impfstoff gegen Malaria existieren wird und EBA-175 als einer der entscheidenden Hauptliganden der Erythrozyteninvasion in modifizierter Form darin enthalten sein könnte.

6.3 Prävalenz und Multiplizität von MSP1 und MSP2 Allelfamilien

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die Parasitenvielfalt mittels Genotypisierung polymorpher Regionen von zwei *P. falciparum* Genen (MSP1 und MSP2) und deren Allelfamilien zu beweisen, die Anzahl multipler Infektionen festzustellen und eventuelle Unterschiede hinsichtlich der Malariaexposition nachzuweisen.

Der praktikable Einsatz der PCR Methode für diese Art der Untersuchung wurde in vielen Studien belegt. Es ist schon seit langem bewiesen, daß sich die Gene des Merozoiten Surface Protein 1 und 2 wegen ihres hochgradigen Polymorphismus als genetische Marker zur Genotypisierung von *Plasmodium falciparum* Populationen eignen [84, 90, 130, 143].

Bei Verteilungsstudien der Allelfamilien und der Bestimmung von eventuellen Doppelinfektionen ist entscheidend, daß bei einem einzelnen Clon nur je eine Allelfamilie auf MSP1 und MSP2 darstellbar sein kann. Die genannten Genabschnitte haben den Vorteil, daß konservierte Regionen mit hypervariablen Abschnitten verbunden sind und somit durch Amplifikation eine hohe Variabilität und Einzigartigkeit der PCR Produkte gewährleistet wird. Diese ermöglicht es zwischen individuellen Clonen zu differenzieren. Diese Art der Bestimmung einer Parasitenpopulation, erlaubt eine Unterscheidung zwischen Therapieversagern, Neuinfektionen oder rekrudeszenten Stämmen.

Unsere Blutisolate enthielten verschiedenste Clone mit polymorphen MSP1/2 Sequenzen, in den variablen Blöcken der Gene, die sich in Größe und Nukleotidsequenz unterschieden.

In der Allelverteilung der beiden Merozoiten-Oberflächen Antigene zeigte sich mit 64,5 % eine Dominanz der K1 und mit 79% eine deutliche Häufung der IC Familie. Beide Werte erreichten jedoch nicht statistische Signifikanz, wie auch in den Studien von Babiker et al. (1997) und Jordan et al. (2001). Konträre Beobachtungen wurden in PNG und Indonesien gemacht [48, 107].

Beide Gene sind außerordentlich vielgestaltig was auf Grund des großen Studiengebietes und der Studienpopulation auch zu erwarten war. Der MSP2 Locus ist hoch polymorph und die FC27 und 3D7 Familien waren stärker präsent als die Allelfamilien des MSP1 Genes.

Diese Beobachtung deckt sich mit andern Genotypisierungsstudien, allerdings sind diese meist auf kleinere Gebiete beschränkt worden [6, 53, 77, 191, 197].

Hier wie auch im Senegal [191], Thailand [156] und anderen diversen Studiengebieten war die Familie R033 am wenigsten polymorph [5, 90, 130].

Obwohl die Anzahl der getesteten Isolate der einzelnen Region unterschiedlich war, ergab sich eine annähernd analoge Verteilung (Tab.11). Auch in der minimalen Anzahl der Clone ergaben sich keinerlei signifikanten Unterschiede. Obwohl aus AFW die meisten infizierten Patienten in die Studie aufgenommen wurden, konnte dort bei MSP1 die niedrigste MOI gefunden werden. Es ist durchaus vorstellbar das ein Clon in einer Infektion dominiert und die anderen Stämme unterdrückt. Die **multiplicity of infection** war durchweg für MSP1 kleiner als für MSP2.

Obwohl es in den Isolaten maximal bis zu sieben detektierbare Clone gab, war die durchschnittliche MOI für MSP2 mit 2,2 Clone pro sample in AFC doch relativ gering. Dies fällt insbesondere dann auf, wenn man unsere Resultate mit anderen Kontrollerhebungen vergleicht [5, 84].

Untersuchungen in Mauretaniien und im Senegal lassen ebenfalls ähnliche Ergebnisse zu unserer Erhebung erkennen [90, 143].

165 Patienten, das entspricht 36,3%, hatten eine multiple Infektion mit mindestens zwei MSP1 Clonen.

In 54,6% der Isolate konnte eine Infektion mit mindestens zwei MSP2 Allelen bestätigt werden. Somit bleibt anzunehmen das die Prozentzahlen von MSP2 einen genaueren Aufschluß über die Multiplizität von Parasitenclonen geben. Das Risiko sich bei einer Reise mit mindestens 2 unterschiedlichen Clonen von *P. falciparum* zu infizieren scheint in Zentralafrika am größten zu sein (Tab.12). Der hohe prozentuale Anteil von Mehrfachinfektionen wurde schon früher mehrfach belegt [34, 136].

MSP2 mit seinen beiden Allelgruppen FC27 und 3D7 hat sich als der informativste, molekulare Marker für eine Clonalitätsbestimmung herausgestellt [112]. Dies konnte bestätigt werden, da die Werte der MOI für MSP2 höher waren und somit als aussagekräftiger einzuschätzen sind als die Werte für MSP1.

Eine geringere Durchschnittszahl an Parasitenclonen könnte auf eine kleinere und limitierte Parasitenpopulation schließen lassen. Es ist jedoch schwierig mit der vorliegenden Studie eine konkrete

Aussage über Populationsgrößen in den einzelnen Gebieten zu machen. Viele Gründe, wie zum Beispiel Transmissionsrate, Wirtsfaktoren oder Jahreszeit nehmen darauf Einfluß. So ist eine erhöhte EIR (entomological inoculation rate) oftmals mit einem Anstieg von Malaria Parasiten und dadurch u.U. auch von Clonen im Wirt verbundenen [4, 8]. Ebenso ist es möglich, daß die relativ geringe MOI mit der gemischten Studienpopulation zusammenhängt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß der „Immunstatus“ der Patienten einen entscheidenden Einfluß auf die MOI ausübt, bzw. eine wichtige Rolle bei der Selektion einzelner Allelfamilien spielt. Die Größe der Studienregionen könnte ebenfalls als limitierender Faktor gelten, da Patienten die eine identische Region in Afrika besuchten, sich trotzdem in Gebieten mit unterschiedlichen Malariaendemizitäten befunden haben könnten.

Neben dem Sporozoiten ist der Merozoit die einzige Lebensform im Vermehrungszyklus von *Plasmodium falciparum* in welcher der Parasit extrazellulär vorliegt. Diese Tatsache macht den Merozoiten zu einem Hauptziel von Antikörpern. Die Verweilzeit des Merozoiten als freier Organismus, vor einer erneuten Invasion in einen Erythrozyten, ist zwar sehr kurz aber dennoch stellen die MS-Proteine ein Hauptziel für die Entwicklung eines Impfstoffes dar [66, 98, 147].

Es bleibt abzuwarten ob sich nach anfänglichen Erfolgen und zum Teil widersprüchlichen und kontrovers diskutierten Ergebnissen, die Impfstoffentwicklung weiter an MSP-Allelen orientiert.

Abschließend bleibt zu sagen daß die Untersuchung epidemiologische Informationen über die Prävalenz und die MOI von MSP1 und 2 in ganz Afrika liefern kann. Sie zeigt den hohen Polymorphismus der untersuchten Gene und bietet eine gute Grundlage für weitere Studien.

6.4 Polymorphismen molekularer Marker zum Nachweis von Medikamentenresistenz bei importierten *P. falciparum* Infektionen

Malaria ist immer noch eine der gefährlichsten Tropenkrankheiten weltweit. Nach Schätzungen sterben jährlich bis zu 2,5 Millionen Menschen an einer Infektion durch einen der humanpathogenen Malariaerreger, 75% davon sind afrikanische Kinder [25]. Durch die wachsende Anzahl von Fernreisen in malariagefährdete Gebiete in den letzten Dekaden, stieg auch die Zahl der importierten Malariafälle in Europa. Es wird geschätzt, daß dadurch mehr als 10.000 Europäer pro Jahr betroffen sind. In Europa nimmt Deutschland mit Italien, Frankreich und den UK-Staaten einen der vordersten Plätze in der Statistik bei importierten Malariaerkrankungen ein [118]. Wie bereits durch eine frühere Auswertung der TropNetEurop Daten bestätigt wurde [87], bleibt Westafrika mit über 57% (Abb.27) aller an der Studie beteiligten Personen eines der Hauptrisikogebiete für eine Infektion. Die Zahl der importierten Malariafälle, aber auch die Schwere und der Verlauf der Erkrankung scheint von einer Reihe intrinsischer (Immunitätsgrad, Vektor und *Plasmodien* Spezies) aber auch extrinsischer (soziale -, politische-,

wirtschaftliche-, umweltökologische Bedingungen) Faktoren abzuhängen. Für europäische Reisende stellt das tropische Afrika, mit dem an vielen Destinationen vorhandenen hohen Infektionsdruck, die Hauptquelle für den Erwerb einer Malaria tropica dar [87, 95, 131]. Die Inzidenz der importierten Malaria ist stark mit der jahreszeitlich unterschiedlichen Endemizität in den Reiseländern, aber auch vom Erfolg prophylaktischer Maßnahmen abhängig. Im Vordergrund stehen die Mückenabwehr (Expositionsprophylaxe) und die Chemoprophylaxe. Medikamentenresistenz ist somit oftmals nicht nur in den betroffenen endemischen Ländern ein Public-Health-Problem, sondern auch in den Ländern der ersten Welt. Der Erfolg oder Mißerfolg einer Chemoprophylaxe/-therapie hängt vom Ausmaß der Medikamentenresistenz im besuchten Reiseland ab.

Eines der Ziele dieser Studie ist es, die Prävalenz von Polymorphismen der verschiedenen mit Medikamentenresistenz assoziierten *Plasmodium falciparum* Gene in importierten Isolaten festzustellen. Es gibt zahlreiche Studien die Zusammenhänge von *in vitro* und *in vivo*-Resistenz gegen Antimalariamittel aufzeigen. Durch Wellems et al. (2001) wurde der Gebrauch von molekularen Markern zur Bestimmung von Medikamentenresistenz bei Malaria als unterstützendes „Tool“ zu *in vivo* Studien bestätigt. Alle Methoden haben Vor- und Nachteile, so sind z.B. nicht alle *in vitro* Ergebnisse direkt auf das *in vivo* „outcome“ einer Infektion zu übertragen. Verschiedene Faktoren wie Medikament, Einnahmemuster, Wirtsfaktoren, Parasitencharakteristika, Vektor und Umweltfaktoren können eine Rolle spielen und die Studien unterschiedlich beeinflussen.

6.4.1 Resistenz gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin

Von Resistenz gegen Sulfadoxin und Pyrimethamin (S/P) wurde erstmals Mitte der 60er Jahre in Thailand an der Grenze zu Kambodscha berichtet. Heute finden wir eine high-level-Resistenz vor allem in großen Gebieten Südostasiens und im Amazonasbecken [170, 184]. In Afrika nahm die S/P Sensitivität erstmals gegen Ende der 80er Jahre ab. Die Wirkstoffkombination in Fansidar[®] wird häufig als Alternative in der Behandlung Chloroquin-resistenter unkomplizierter Malaria eingesetzt. Anfänglich zeichnete sich die Antifolatkombination durch große Effektivität und niedrige Resistenzraten aus. In einigen Studien in Bukina Faso, Kenia, Äthiopien und Äquatorialguinea lagen die Zahlen sogar unter 5% [31, 40, 144, 169]. Andererseits waren aber auch schon früh Berichte über eine geringe Wirksamkeit von Pyrimethamin und Sulfadoxin z.B. in Kenia und Tansania [111] aufgetreten.

Durch den weit verbreiteten Gebrauch in den endemischen Gebieten wird seine Wirkung durch die Entwicklung resistenter *Plasmodium*-Stämme zunehmend beeinträchtigt. Zur Aufklärung der genetischen Grundlagen der S/P Resistenz von *Plasmodium falciparum* sind eine Reihe von Studien durchgeführt worden [12, 61, 128, 141, 167]. Die molekulare Basis der Resistenz gegen die Antifolatkombination in Fansidar[®] ist vermutlich diejenige, welche am besten untersucht wurde. Sulfadoxin und Pyrimethamin

wirken synergistisch. Die Sulfonamid-Komponente inhibiert mit der Dihydropterotsynthetase (DHPS) und Pyrimethamin interagiert mit der DHF Reduktase (DHFR). Beide Enzyme spielen im Folatezyklus eine entscheidende Rolle.

Ziel der vorliegenden Studie ist es die Prävalenz von Polymorphismen in den Genen der DHPS und DHFR festzustellen.

Insgesamt wurden zu diesem Zweck acht Codons auf Punktmutationen untersucht und ihre Verteilung in den einzelnen Gebieten ausgewertet.

Während bei der Resistenz gegen den Dihydrofolsäurereduktasehemmer Pyrimethamin als Monotherapie mit dem Vorhandensein von 108-Asparagin auf dem DHFR Gen assoziiert zu sein scheint, sind bei der Ausbildung von S/P-Resistenz mehrere Möglichkeiten denkbar. Die wohl wahrscheinlichste ist, daß diese durch mehrfache Mutationen im DHFR und dem DHPS Gen verursacht werden.

Wie schon erwähnt scheint der Mutation in Codon 108 des DHFR Gens eine Schlüsselrolle in der Resistenz gegen Pyrimethamin zuzukommen. So wurden in verschiedenen afrikanischen Ländern auch unterschiedliche Prävalenzen der 108-Asn Mutation festgestellt. In Mali wurden niedrige Level des mutierten Genotyps gefunden [41]. Aus dem Niger, Nigeria und dem Senegal wurde vom Auftreten von Resistenzraten von um 50% berichtet.

In der vorliegenden Studie war die durchschnittliche Prävalenz eines AS Tausches in Codon 108_{Ser/Asn} in Ostafrika mit 79,2% am höchsten und in Westafrika mit über 61% am niedrigsten (Abb.30). Aus der Verteilung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gebieten (Tab.15). Diese Ergebnisse sind konform mit Studien in einigen ostafrikanischen Ländern wie in Tansania und Uganda wo eine sehr hohe Prävalenz der Mutation von über 95% vorlag.

Eine Mutation zu Threonin im Codon 108 konnte auch hier, wie in zahlreichen anderen Fallstudien auf dem afrikanischen Kontinent nicht festgestellt werden [12, 39, 46, 86].

Zusätzliche Mutationen in den Codons 51 und 59 des DHFR Gens, üben einen synergistischen und additiven Effekt auf die Entwicklung von Resistenzen aus, was in der Literatur vielfach beschrieben wurde [35, 123, 154].

Mutationen in Codon 51 (Ile) waren in unserer Studie ähnlich verteilt wie bei Codon 108, wo auch in AFE die höchste Prävalenz zu finden war (Abb.30). Bisher liegen nur wenige Daten über die Westküste Afrikas vor, so daß die Studie einen guten Anhaltspunkt über die Gesamtverteilung der Ile-51 Mutation liefern kann. Die Verteilungsvielfalt in den einzelnen Gebieten ließ keine signifikanten Unterschiede erkennen (Tab.13).

Anders verhielt es sich bei der Veränderung in der Codierungssequenz 59 des DHFR Gens. Hier war erstmals der prozentuale Maximalwert der Prävalenz nicht in Ost- sondern in Zentralafrika zu finden (Abb.30).

Die Mutationen in Codon 51 zu Isoleucin und in Codon 59 zu Arginin kommen in ganz Afrika vor, die Tendenz zeigt jedoch eine höhere Prävalenz im Osten.

Die Kombination der drei Mutationen 51-Ile, 59-Arg und 108-Asn wurde in einigen Studien in 60% bis 75% der Isolate gefunden. Das Vorkommen dieser Tripelmutation DHFR (108_{Ser/Asn}, 51_{Asp/Iso} und 59_{Cys/Arg}) war mit 44,3% in AFC am höchsten und lag in allen anderen Gebieten unter der 40%-Marke (Tab.24).

Die *in vivo* Resistenz gegen S/P wird wahrscheinlich durch multifaktorielle Wirkungen von Mutationen im DHFR und DHPS Gen bewirkt. Letztere sind für die Unwirksamkeit der Sulfonamidkomponente verantwortlich. Im Laufe der Jahre erhärtete sich der Verdacht, daß es sich bei den wichtigsten Positionen im Gen um Codon 436, 437, 540, 581 und 613 handelt.

Brooks et al. (1994) stellten erstmals einen Zusammenhang zwischen zwei verschiedenen Punktmutationen auf dem DHPS Gen in Position 436 bzw. in Codon 613 und *in vitro* Resistenz gegen Sulfadoxin her.

Vor allem der Austausch von Serin nach Phenylalanin und Alanin scheint die Resistenz zu begünstigen [175]. Die Verteilung ergab signifikante Unterschiede (Tab.16) in Bezug auf die Mutationen in Codon 436. In AFC wurde die höchste Prävalenz an 436 Mutanten gefunden. Die Mutation scheint in Afrika weit verbreitet zu sein, so orientieren sich die Werte im Osten und Süden an der 20 % Grenze wie auch in einigen Studien in Tansania, Malawi und Kenia bestätigt wurde [86, 134]. Dennoch ist hier eine Verschiebung in Richtung Zentralafrika zu beobachten. Die Verbindung 436-Phe trat bisher immer mit einer gefundenen Mutation in Codon 613 oder mit einer 436-Ala Mutante auf.

Alle in dieser Kohorte gefundenen DHPS 613_{Ala/Ser} Mutationen stammten aus Westafrika und das Auftreten dieser Mutation scheint sich auf den westlichen Kontinent zu konzentrieren. Bekräftigt wird dieser Trend durch Plowe et. al. (1998) und andere [16, 41], hingegen wurde in anderen afrikanischen Ländern bisher hauptsächlich der Wildtyp gefunden [86, 134].

Die Beteiligung von DHPS 437_{Ala/Gly} an der Entwicklung von Resistenzen gegen Sulfadoxin bleibt weiterhin umstritten. In einer Erhebung von Brooks et. al. (1994) wiesen diese u.a. nach, daß bei den von Ihnen untersuchten Stämmen diese Mutation keine Rolle spielt. Sie trat sowohl bei Sulfadoxin-sensitiven als auch bei Sulfonamid-resistenten Stämmen auf. Einige andere Forschergruppen konnten dagegen Assoziationen aufdecken [97, 168, 175]. Die Mutationen zeigen eine geographische Korrelation, so besaßen die südostasiatischen Stämme die AS Glycin und Stämme aus Südamerika den AS-Wildtyp. In Afrika treten beide Genotypen auf, dennoch war das Vorkommen der potentiell resistenten Stämmen in AFC mit 60,3% am größten (Abb.31).

Codon 540 wurde erst in letzter Zeit verstärkt Bedeutung zugemessen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß einige Gruppen eine signifikante Korrelation zu *in vivo* resistenten Proben gegen S/P zeigen konnten [97, 134]. Außer in AFS betrug der Durchschnitt an 540-Glu positiven Proben zwischen 5% und 6,4%. Damit liegen die Werte weit unter den bereits gefundenen 85,2% in Tansania [86], aber im Rahmen von Prävalenztestungen wie sie in Mali verzeichnet wurden [134].

Wie auch auf Codon 613 traten Mutationen in Codon 581 nur in Westafrika auf. In „surveys“ konnte zwar zu 100% der 581-Gly-Typ in bolivianischen Isolaten gefunden werden, doch waren bisher alle Proben aus Afrika negativ. In der vorliegenden Erhebung sind 4 Proben positiv getestet worden.

Da es sich bei den verwendeten Proben um Blutisolate von Reisenden oder Immigranten/Flüchtlingen handelt, kann nicht ausgeschlossen werden das sich die Patienten auf ihrer Reise nicht mit einem südamerikanischen Stamm infiziert haben.

Die von Kublin et. al. (2002) beschriebene Quinrupelmutation, welche mit hochgradiger Resistenz assoziiert wurde, konnte in keinem der Fälle gefunden werden. Dennoch zeigten 25% der Fälle aus Zentralafrika eine Mutation in den vier Codons DHFR 108_{Ser/Asn}, 51_{Asp/Iso} DHPS 437_{Ala/Gly} und DHPS 540_{Lys/Glu} (Tab.24).

Die Ausbildung einer Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegen Kombinationen von Antifolaten benötigt vermutlich wenigstens je eine Mutation in den relevanten Allelen des DHFR/DHPS Gens. Obwohl die genaue Relation zwischen den einzelnen Mutationen der DHFR und DHPS Gene in klinischer Resistenz unklar und oftmals widersprüchlich ist, geben doch einige Daten Grund zur Annahme, daß ein „sensitives DHFR Allel“ stark mit einem uneingeschränkten Behandlungserfolg von Fansidar® verknüpft ist [151].

Nimmt man nun die Ergebnisse dieser Studie zur Hand und definiert damit die Mutation in Codon 108 des DHFR Gen als einen Hauptindikator für Resistenz gegen S/P, so zeigen die Parasiten aus Ostafrika mit 79,2% das höchste Resistenzpotential. In allen anderen afrikanischen Gebieten lagen die errechneten Werte alle über 61%. In Anbetracht dieser Tatsache und der weiteren Resistenzverteilung kann man somit generell von einer bedenklichen Resistenzsituation sprechen. Es bleibt abzuwarten ob sich das an Hand von anderen Studien manifestieren läßt.

6.4.2 Resistenz gegen Chloroquin

In allen *Plasmodium falciparum* Malaria endemischen Gebieten, außer in Zentralamerika und der Karibik wurde Chloroquin Resistenz bereits beschrieben [184]. Ende der 50er Jahre trat die Resistenz gegen das 4-Aminochinolin erstmals im thailändisch-kambodschanischen Grenzgebiet und in Kolumbien auf [180]. Im Laufe der Zeit entwickelten sich bis 1989 weltweit Chloroquin-resistente Zonen. 1978 wurde erstmals in Afrika eine CQ-Resistenz beschrieben [92]. In den kommenden 11 Jahren breitete sich die Unempfindlichkeit gegen das weithin gebräuchliche Medikament von Zentral-, nach Süd-, bis nach Westafrika über den ganzen Kontinent aus [127]. Resistenzraten von über 70% wurden aus Kenia [23], Tansania [63], Ruanda [150], Kamerun [24] und Äthiopien [169] berichtet. In anderen Ländern wie z.B. Burkina Faso lag die Therapieversagerrate unter 20% [164]. Obwohl der Wirkmechanismus und die Entwicklung der Chloroquin-Resistenz (CQR) nicht vollständig geklärt ist, wurden mehrere molekulare Marker identifiziert. Einige Polymorphismen die mit Chloroquin-Resistenz assoziiert zu sein scheinen wurden beschrieben. Der Austausch von Threonin für Lysin in Codon 76 des Pfcrf- Gens, wurde erst kürzlich als entscheidende *in vitro* Resistenz Mutation in Isolaten aus Afrika, Südamerika, Asien und PNG beschrieben [43, 56]. Diese Resultate werden gestützt durch *in vivo* Ergebnisse aus Mali [43], Kamerun [15], dem Sudan [7], Mozambique [110], Thailand [29], Laos [132] und Brasilien [171]. Dennoch konnte in einer Studie in Uganda kein Zusammenhang zwischen K76T und einer CQR hergestellt werden [44]. In allen Untersuchungen spricht viel für die These das eine Mutation in Codon 76 zwar notwendige Voraussetzung für eine phänotypische Resistenz ist, aber dennoch mehrere Polymorphismen die Ausbildung unterstützen können.

Bei der von uns durchgeführten Studie wurde in 84,3% der ostafrikanischen Fälle mindestens ein Parasitenclon festgestellt der in Codon 76 mutiert war. 76,7% der AFC Proben und 179 (63,7%) der 276 Proben aus Westafrika enthielten eine Aminosäurekombination die für eine Mutation codiert. Somit ergaben sich signifikante Unterschiede im Vorkommen einer Codon 76 Mutation (Tab.19). Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen Studien in denen das Auftreten von Resistenzen gegen Chloroquin in Westafrika am schwächsten ist, gefolgt von AFS und Zentralafrika. Dies deckt sich mit der Geschichte der Ausbreitung der Resistenz in Afrika, wonach die ersten Fälle in den 70er Jahren im ostafrikanischen Kenia entdeckt wurden. Dennoch ist per se nicht zu sagen, daß es sich in Westafrika durchgehend um Gebiete mit einem geringen Resistenzrisiko handelt. Die Intensität variiert auch hier sehr stark, von Ländern mit hohem Resistenzpotential wie z.B. dem Senegal [166] über Länder mit moderatem Level wie Ghana [100] oder Kamerun [142] bis hin zu Regionen mit niedrigem Resistenzniveau wie Mali [43].

Ein weiteres Gen, Pfm_{dr}-1, welches sich auf Chromosom 5 befindet und für ein Pgh1 (P-glycoprotein homologue) codiert, ist bei der Resistenzentwicklung gegen das 4-Aminochinolon Chloroquin von Bedeutung. Der Tausch einer AS in Codon 86 zu Tyrosin war in einigen klinischen Studien, sowie bei *in vitro* Versuchen mit Resistenz assoziiert. In Gambia [174], Uganda [59], Thailand [137] und Brasilien [190] ergaben sich konkrete Assoziationen, welche aber in Laos [132] und anderen Regionen Ugandas [44], Thailands [28] und in Brasilien [135] nicht bestätigt werden konnten. Die Frage einer eindeutigen Verbindung zwischen einer Mutation in Codon 86 und Resistenz ist schwer zu beantworten, da sich Pro und Contra einer Assoziation die Waage halten. In unserer Studie lag das Verteilungsmaximum und -minimum mit signifikanter Differenz der potentiell resistenten Stämme wie bei der vorigen Auswertung von Codon 76 wieder in AFE bzw. AFW (Tab.20).

Andere Pfm_{dr}-1 Mutationen auf Codon 1042 oder 1246 könnten eine modulierende Wirkung ausüben. Dennoch bleibt festzustellen, daß alle Polymorphismen des Pfm_{dr} Gens nicht so überzeugend mit Resistenz assoziiert waren, wie die der K76T Mutation bei Pfcrt.

Auf Grund technischer Schwierigkeiten bei der PCR und den fehlenden eindeutigen Assoziationen wurden die Codons 1042 und 1246 nur teilweise ausgewertet, so daß aus den Werten keine eindeutige Aussage abzuleiten ist.

Von 311 Proben die eine K76T Mutation trugen, waren 134 (43,1%) zusätzlich in Codon 86 des Pfm_{dr} Gens mutiert. Im Gegensatz dazu waren in 78,6% der mutierten Pfm_{dr} Codon 86 „samples“ auch Codon 76 Mutationen zu finden. Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß die Pfm_{dr}-1 Y86 Mutation in Beziehung zum Vorkommen einer Pfcrt T76 Mutation steht. Diese Ergebnisse stehen in Korrelation mit einer in Burkina Faso durchgeführten Studie [163]. Dort wurden wie in einer Erhebung von Lopes et al. (2002) in Sao Tome und Principe die gleichen Tendenzen belegt. Das bestätigt die Hypothese, daß das Auftreten einer Pfm_{dr}-1 Y86 Mutation vom Vorhandensein einer Pfcrt T76 abhängig ist. Einige, frühere Studien belegten die Assoziation von Pfm_{dr} Polymorphismen mit CQ Resistenz [1, 13, 45], diese Ergebnisse erklären sich ggf. durch das zusätzliche oder zeitweise Vorhandensein von Pfcrt 76 Mutanten. Die Rolle der Pfm_{dr}-1 Gene ist bis heute noch nicht völlig geklärt. Die Mutation in Codon 86 alleine, ist dem Anschein nach nicht direkt für eine CQR verantwortlich, durch ihre enge Verknüpfung mit der Pfcrt Codon 76 Mutation ist es jedoch wahrscheinlich, daß sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Chloroquin-Resistenz spielt und möglicherweise die Fitness der Pfcrt 76 Mutanten entscheidend beeinflußt und erhöht. Eine Studie aus dem Senegal zeigte, daß Pfcrt T76 und Pfm_{dr}-1 Y86 in 44% der Chloroquin-resistenten Fälle gemeinsam auftrat, wobei sie nur in 10% der sensitiven Isolate zu finden waren [162]. In Nigeria gab es einen eindeutigen „link“ zwischen Pfcrt Thr76 und Pfm_{dr} Tyr86 und somit Anlaß zur Annahme, daß Konvergenz von Polymorphismen entscheidend zur phänotypischen Entwicklung der Resistenz beiträgt.

Der Test beider Gene kann die Spezifität und die Aussagekraft einer Resistenzstudie erhöhen [81]. In einer Studienpopulation die unter „Chloroquin Druck“ steht müßte eine eindeutige Verschiebung zu Gunsten einer mutierten Spezies stattfinden, was allerdings nicht in allen Studien eindeutig belegt werden konnte.

Abschließend bleibt zu sagen, daß das Vorkommen einer Codon 86_{Asp/Thy} Mutation und die wahrscheinlich daraus resultierende CQR hauptsächlich an das Vorkommen einer PfcrT 76 Mutation gekoppelt ist. Weitere Untersuchungen und Studien auf anderen Genloci werden nötig sein um diese Beziehung endgültig zu klären. Die relativ langsame Entwicklung einer CQ-Resistenz könnte ein Indiz für einen multifaktoriellen Mechanismus sein [178].

Obwohl es mittlerweile in manchen Ländern durch das verstärkte Auftreten von CQR dazu kam als Mittel der ersten Wahl S/P [139] oder Amodiaquin bei einer unkomplizierten Malaria einzusetzen muß auch hier ein genaues Monitoring der Resistenzlage vor Ort erfolgen. In vielen betroffenen Ländern gibt es Gegenden, in den Chloroquin nur wenig von seiner ursprünglichen Effektivität eingebüßt hat. So wurde z.B. aus dem Sudan in einigen Provinzen nur von einer relativ geringen Resistenzrate berichtet [72]. Aus diesen Daten kann nur ein genereller Überblick über die ubiquitäre Resistenzlage in Afrika gewonnen werden.

Anhand der gefunden Ergebnisse scheint auch hier wie im bereits beschriebenen Fall der Resistenz gegen S/P, Ostafrika eine Vormachtstellung im Bereich der sich entwickelnden Resistenzen einzunehmen. Diese Tatsache ist gerade im Hinblick auf Public-Health-Projekte von großer Bedeutung. Im Moment gilt Chloroquin in vielen Ländern Afrikas immer noch als Mittel der Wahl bei der Behandlung einer unkomplizierten Malaria. Auf Grund der prekären Resistenzlage haben jedoch schon zehn afrikanische Länder ihre „first-line treatment“ Empfehlung von Chloroquin auf die Sulfadoxin/Pyrimethamin Kombination umgestellt. In absehbarer Zeit werden wohl weitere Länder diesem Beispiel folgen und ebenfalls auf die kostengünstige Alternative Fansidar[®] umstellen. Wie im vorigen Abschnitt 6.4.1 beschrieben, liegt die Prävalenz für Mutationen, welche die Wirksamkeit solcher S/P Kombinationen beeinträchtigen oder aufheben könnte bereits jetzt vielfach über einer kritischen Grenze. Durch den großflächigen Einsatz von Fansidar[®] wäre auf Grund des verstärkten Medikamentendrucks eine Steigerung der Mutationsrate zu erwarten. Durch die jetzt schon erhöhte Resistenzlage kann davon ausgegangen werden, daß sich hochgradige Resistenz gegen S/P schneller ausbreitet als die Unempfindlichkeit der Parasiten gegen Chloroquin. Es stehen nur wenige sinnvolle, kostengünstige und effektive Medikamente zur Verfügung. Einen Ansatz könnte die Behandlung mit Chlorproguanil-Dapson darstellen.

Nicht nur die Endemiegebiete und die dort lebende Bevölkerung ist von der Zunahme solcher Resistenzen betroffen. Wie die Territorien an der thailändisch-kambodschanischen Grenze oder der Grenze zu Myanmar beweisen sind solche Zonen hochgradig gefährdet sich zu MDR Regionen (multidrug resistance) zu entwickeln.

Afrika ist auf dem besten Wege sich ebenfalls zu einem großflächigen MDR-Areal zu entwickeln. Dies wird wiederum Einfluß auf die Reise- und Chemoprophylaxe von Touristen haben. Die Zeit hat bewiesen, daß sich der Erreger in einigen Fällen schneller, in anderen Fällen langsamer, aber dennoch stetig an ein Medikament „gewöhnen“ kann. Es ist daher nur eine Frage der Zeit wann sich Resistenzen gegen alle bekannten Wirkstoffe entwickeln.

Die Kenntnis dieser molekularen Grundlagen und ihre Umsetzung in Überwachungsmethoden kann helfen entsprechende Resistenzlevel zu beobachten und gegebenenfalls die Ergebnisse in Kontrollprogramme einfließen zu lassen. Damit könnte eine weitere Verbreitung von Medikamentenresistenz verhindert oder zumindest verzögert werden. Der abwechselnde Gebrauch von zwei oder mehreren S/P Kombinationsprodukten könnte helfen weitere Resistenzentwicklungen in diese Richtung aufzuhalten.

Es bleibt zu klären ob andere, noch nicht bekannte Mutationen für die Entwicklung verschiedenster Resistenzmuster verantwortlich sind und wie weit sich diese Mutationen schon verbreitet haben. Weitere Studien sind sinnvoll, notwendig und unabdingbar um diese Fragen in Zukunft zu beantworten.

6.4.3 Resistenz gegen Atovaquon

Der Wirkmechanismus von Atovaquon beruht auf einem Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials und der dadurch bewirkten Hemmung der parasitären Atmungskette [157]. Punktmutationen auf dem Cytochrom-bc₁-Gen von *P. falciparum* wurden mit Atovaquon-Resistenz assoziiert [96]. *In vivo* Therapieversager beim Menschen konnten mit einer Mutation am Codon 268 assoziiert werden. Von sechs bisher beschriebenen Atovaquon-Kombinationstherapie Versagern wiesen 5 eine Mutation am Codon 268 auf.

Ein Reisender aus Mali präsentierte sich im Tropeninstitut München mit einer 1,5% Parasitämie und wurde erfolgreich mit Riamet® (Lumefantrin und Artemeter) behandelt, nachdem eine Therapie mit Malarone® fehlgeschlagen war. Eine Blutprobe auf Filterpapier wurde für molekularbiologische Untersuchungen genommen. Die Sequenzierung des parasitären Cytochrom-bc₁-Genes ergab eine Punktmutation an Position 803 des Cytochrom-Genes, welche zu einem Aminosäureaustausch am Codon 268 von Thyrosin (TAT) zu Serin (TCT) führte. Die gleiche genetische Variante konnte auch bei einem dänischen Patienten nachgewiesen werden, auch er wurde mit Malarone® behandelt. Eine Mutation am Codon 268 ist erstmals bei einer Atovaquon-resistenten Linie von *Plasmodium yoelii* beschrieben [157]. Beim Menschen wurde die erste mit Atovaquon-Resistenz assoziierte Mutation aus Thailand berichtet. Dieser Patient wurde im Rahmen einer Studie mit Atovaquon und Pyrimethamin behandelt. Das parasitäre Cytochrom-b-Gen wies die Y268S Mutation auf (TAT zu TCT) [96]. Fivelmann et al. (2002) beschrieben die erste molekular bestätigte Resistenz nach einer Malarone®-Therapie bei einem Touristen der aus Nigeria zurückkehrte [57]. Die Sequenzierung ergab ebenfalls eine Mutation am Codon 268, allerdings wurde hier Thyrosin durch Asparagin ausgetauscht (TAT zu AAT). Färnet et al. 2003 berichteten von einer Mutter und zwei Kindern, die nach ihrer Rückkehr von der Elfenbeinküste an *Falciparum*-Malaria erkrankten. Während das eine Kind als früher Therapieversager klassifiziert wurde (keine Verringerung der Parasitämie an Tag 2) aber keine Mutation am Cytochrom b-Gen des Parasiten nachweisbar war, zeigte das zweite Kind Rekrudescenz nach 28 Tagen sowie die Y268S Mutation auf den Cytochrom-b-Gen. Bei der Mutter wurde ebenfalls die Y268S Mutation nachgewiesen, die Behandlung mit Malarone® verlief bei ihr erfolgreich. In diesem Fall könnte die Teilimmunität der Mutter eine Rolle gespielt haben. Ein weiterer „case“ wurde in Kopenhagen analysiert. Ein Malariapatient der nach seiner Rückkehr aus Kamerun mit einer Atovaquon/Proguanil Kombination behandelt wurde entwickelte eine Rekrudescenz. Die Sequenzierung der Blutproben ergab vor Therapiebeginn einen Cytochrom-bc₁-Wildtyp und nach Rekrudescenz die Y268S-Mutation.

Der Vergleich dieser Fälle von Malarone®-Therapieversagen bei importierter Malaria nach Europa zeigt, daß alle getesteten Therapieversager eine Mutation in Codon 286 aufwiesen. Schwobel et al. (2003) entwickelten daraufhin einen Test zur Bestimmung einer Y268S Mutation mittels PCR und RFLP.

Alle Isolate wurden getestet und bei allen, bis auf den Patienten aus Mali, konnte keine solche Mutation verifiziert werden (Punkt 5.5.2).

Die meisten in der Fachliteratur aufgeführten Patienten infizierten sich in Westafrika. Die Resistenzentwicklung war damit unabhängig vom Medikamentendruck. Malarone[®] wird aus Kostengründen in Afrika nicht verbreitet eingesetzt. Die Analyse etablierter molekularer Resistenzmarker bei importierten Isolaten in unserer Studie zeigte für Gebiete in Westafrika eine niedrigere Prävalenz von resistenzassoziierten Mutationen im Vergleich zu den übrigen Regionen.

Ein hoher Anteil an vermeintlich multiresistenten Genotypen könnte die Resistenzentwicklung zu mechanisch neu wirkenden Substanzen wie Atovaquon erleichtern. Wie bei Experimenten *in vitro* beschrieben wurde, ist die Frequenz der Resistenzinduktion von der vorhandenen Resistenz in der Vorgeschichte abhängig. So konnte Resistenz zu Atovaquon am leichtesten bei einem hochgradig, multiresistenten Stamm induziert werden, während bei den sensitiven Isolaten keine Resistenzinduktion möglich war [140].

Der Nutzen dieser Resistenzmarker und ihr Vorhersagewert bei epidemiologischen Überwachungen sowie im diagnostischen Einzelfall zur Therapieermittlung, kann erst durch weitere Untersuchungen bei Therapieversagern ermittelt werden. Mit der Etablierung der PCR und des folgenden Enzymverdau, sowie der daraus resultierenden Spezifitäts- und Sensitivitätsprüfung ist es möglich, im Rahmen klinischer Studien oder innerhalb von Netzwerken, die Daten und Blutproben von importierten Infektionen aus praktisch allen Endemiegebieten vor und nach der Behandlung zu sammeln und auszuwerten.

Ausgehend von den Ergebnissen kann gesagt werden, daß die Untersuchung von allelischen Polymorphismen der einzelnen Gene von *Plasmodium falciparum* ein hilfreicher Ansatz zur Fragestellung von potentiellen Resistenzen darstellt. Durch Wahl eines homogenen und spezifischeren Patientenkollektivs in einer überwachten follow-up Studie könnte die Datenlage verifiziert und verbessert werden. Da die Ergebnisse der Studie durchaus mit andern sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Ergebnissen korrelieren erscheinen sie als zuverlässig.

6.5 Identifikation von Assoziationen zwischen molekularen Markern und klinischen Parametern anhand von importierten *P. falciparum* Infektionen

6.5.1 Vergleich zwischen semiimmunen und nichtimmunen Individuen innerhalb eines Endemiegebietes

Die epidemiologischen und klinischen Charakteristika der Malaria bei nicht-immunen (z.B. Reisenden) sind oftmals unterschiedlich zu denen der Malaria bei einer semi-immunen Bevölkerung. Eine erworbene Semiimmunität wird bei Kindern ab 5 Jahren beobachtet. Sie bewirkt, daß in Gebieten mit konstanter Parasitendichte die Malariaepisoden weniger oft auftreten und vielfach weniger gefährlich verlaufen.

Diese Immunität kann aber jedoch mit fehlender „parasitischer Beanspruchung“ des Immunsystemes wieder verlorengehen. Der einzige Schutz eines Europäers der in ein Malaria gefährdetes Gebiet reist, besteht in einer ausreichenden Expositionsprophylaxe und/oder Chemoprophylaxe.

Die Studienpopulation ließ bei 333 Patienten eine Einteilung in die beiden Gruppen zu. Die Verteilung der Isolate als auch die Geschlechterverteilung war in beiden Gruppen ähnlich.

Westafrika steuerte zu beiden Gruppen die meisten Teilnehmer bei. Prozentuale Unterschiede ergaben sich in der Form, daß sich Touristen nach Aufenthalt in ost- bzw. südafrikanischen Ländern häufiger in den angeschlossenen Zentren vorstellten. Mögliche Ursachen hierfür könnten die bevorzugten Reiserouten in AFE (z.B. Kenia) bzw. in Südafrika und den angrenzenden Nationalparks sein. Es ist schwierig, konkrete Aussagen über die Risikowahrscheinlichkeit einer *Plasmodium falciparum* Infektion zu machen. Wir haben in unserer Studie keinerlei Anhaltspunkte betreffend der Reiseaktivitäten unserer Population. Somit besteht die Möglichkeit, daß die vielfach gemeldeten Fälle aus AFW nur eine verstärkte Reiseaktivität reflektieren, nicht aber ein erhöhtes Infektionsrisiko. Dennoch ist die Endemizität und somit auch das Infektionsrisiko in westafrikanischen Ländern höher einzuschätzen. Nach Berichten und Umfragen der WTO (World Tourism Organisation) gaben nur 2,4% der Europäer eine westafrikanische Reisedestination als ihr Ziel an [87]. Die Auswertungen unserer Umfrage geben nur das wahrscheinliche Infektionsgebiet bzw. -land an. Einige der Touristen besuchten jedoch mehrere Länder in Afrika und damit evtl. unterschiedliche Regionen mit differenten Übertragungsintensitäten des Erregers. Bei den Immigranten stellt sich die Situation noch weitaus komplexer dar. Unter den Vertretern der semiimmunen Gruppe kann es, zum Beispiel bei Flüchtlingen, durchaus zu einer Infektion außerhalb ihres Heimatlandes gekommen sein. Die Flucht kann sich über einen längeren Zeitraum evtl. Monate erstrecken, wodurch diese Personen oft über malariaendemische Drittländer nach Europa einreisen [21]. Bei Europäern aber auch bei semiimmunen Immigranten kam es zu einer signifikanten Selektion eines F-Fragmentes in unterschiedlichen Regionen. Es ist deshalb keine Aussage darüber möglich ob eine der Gruppen auf Grund des unterschiedlichen Immunstatus evtl. verstärkt das F-Fragment oder das C-Segment selektiert bzw. eliminiert.

Ein direkter Vergleich beider Gruppen untereinander erschien nur für die vier großen afrikanischen Gebiete sinnvoll.

Es kam zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich der Allelverteilung in den beiden MSP Genen.

In ostafrikanischen Gebieten hatten die früheren Einwohner endemischer Gebiete weniger MSP2 Clone im Blut, dies könnte für eine verstärkte Parasitenclearance gegenüber den europäischen Reisenden sprechen. Im Gegensatz dazu hatten wiederum Touristen aus Südafrika eine hypothetisch geringere Anzahl verschiedener Parasiten in ihrem Blutkreislauf. Die Gründe dafür sind unklar und können mannigfaltig sein. Zum Beispiel wären eine insuffiziente Einnahme von Antimalariamitteln, eine Resistenz und damit eine nicht vollständige Eradikation des Erregers, oder aber eine Parasitenspezies welche andere Clone unterdrückt denkbar.

Ebenso ist die Abnahme von Blut in diesen Fällen nur eine Momentaufnahme in Bezug auf die Parasitenzahl. Durch Zytoadhäsionsphänomene, Sequestration, „rosetting“ und „sludging“ kann die Zahl der im Blut befindlichen bzw. der zirkulierenden Stämme sehr stark variieren. Genauen Aufschluß darüber kann nur eine „follow-up“ Studie geben, die an unterschiedlichen Tagen Blutproben von den infizierten Patienten nimmt.

Abschließend bleibt zu sagen das ein semiimmuner Patient wahrscheinlich besser geschützt ist als ein nichtimmuner, ihn dies aber per se nicht zwingend vor einem schweren Verlauf schützt. Das belegen auch die Zahlen. Immigranten litten weniger (2,1%) unter komplizierten Verläufen als europäische Reisende (6,9%). Es bleibt dennoch festzuhalten, daß es auch in dieser Gruppe zu schwerwiegenden Komplikationen wie zerebrale Malaria kam.

6.5.2 Assoziation zwischen dem klinischen Verlauf der Malaria tropica anhand von Patientendaten und molekularen Markern des Parasiten

Durch den wachsenden internationalen Flugverkehr zu immer außergewöhnlicheren Reisezielen stieg auch die Zahl der importierten Malaria Infektionen an.

Nicht nur in Deutschland sondern auch in anderen Ländern der Europäischen Union ist die Malaria ein gesundheitspolitisches Thema.

Die Zahl der importierten Malariafälle nach Deutschland war zwar in den letzten Jahren stabil, dennoch konnte seit 1972 mit 1.500 bis 1999 mit 13.000 Fällen eine 8-fach erhöhte Importrate von Malariainfektionen verzeichnet werden [145].

In nicht endemischen Ländern kommt es nur selten zu kritischen Verlaufsformen der Malaria. Durch rechtzeitige Therapiemaßnahmen, eine gute medizinische Versorgung und Infrastruktur ist ein schwerer Verlauf meist abzuwenden.

Bei der vorliegenden Fallstudie konnte bei 35 Patienten ein komplizierter Verlauf diagnostiziert werden, neun dieser Fälle verliefen tödlich.

Die Mortalitätsrate bezogen auf die gesamten im Netzwerk gemeldeten Fälle war gering, was damit zusammenhängen könnte, daß es sich bei denen im TropNetEurop Verbund angeschlossenen Zentren um spezielle tropenmedizinische Einrichtungen handelt. Diese sind geschult in der Diagnose von Tropenkrankheiten und haben spezielle Erfahrungen im Umgang mit komplizierten Verläufen der Malaria.

Sowohl bei der Gesamtzahl der importierten Fälle als auch bei den beiden Untergruppen waren Frauen in der Minderzahl. Die Ursachen für das im Durchschnitt zweifach erhöhte Malariarisiko der Männer sind anhand des vorliegenden Datensatzes nicht zu klären.

85,7% der komplizierten Verläufe konnten einem Land südlich der Sahara zugeordnet werden, auch hier waren hauptsächlich importierte Parasitenstämme (48,6%) aus Westafrika zu finden.

Eine Untersuchung der Altersvariable ergab bezüglich der Gruppen „unkompliziert“ versus „kompliziert“ und „unkompliziert“ versus „Exitus“ ein signifikantes Ergebnis. Die Patienten der komplizierten als auch die der tödlich verlaufenden Infektionen waren signifikant älter als die Vergleichsgruppe. In endemischen Regionen wird eine schwere und ernsthafte Erkrankung oftmals nur bei Kindern gefunden [105, 183].

Einige Erhebungen bestätigen unser Ergebnis, daß schwerwiegende Verläufe ebenso bei älteren Patienten zu finden sind [9, 67, 119, 148]. Das Durchschnittsalter in der Rubrik „kompliziert“ lag bei 45,7 Jahren und das der tödlich verlaufenen Infektion bei 55 Jahren.

80% der komplizierten Infektionen konnten Personen zugeordnet werden die in Europa leben. Die Erklärung dafür könnte sein, daß das alternde Immunsystem zu schwach ist sich auf verschiedene neue Infektionen einzustellen. Im Gegensatz hierzu stehen Einwohner von endemischen Gebieten, welche u.U.

täglich neu getriggert werden und damit ständig einer gewissen Parasitenlast ausgesetzt sind, welche vom Immunsystem bekämpft werden muß. Diese Hypothese könnte durch Gjørup und Rønn et al. (2002) gestützt werden, die signifikant höhere Parasitämien bei nicht-immunen älteren Patienten feststellten [67]. Bei der Verteilungshäufigkeit der einzelnen Allelfamilien zeigten RO33 und K1 signifikant positive bzw. negative Assoziation.

Bei Krankheitsverläufen mit mildem Verlauf wird gezeigt, daß die K1 Familie häufiger präsent ist als bei den beiden Vergleichsgruppen.

In den „severe disease“ Patienten war RO33 signifikant mit dem Krankheitsverlauf assoziiert. In der Literatur existieren widersprüchliche Angaben über die Rolle einzelner MSP Familien und dem klinischen „outcome“ einer Infektion [3, 121]. Die Annahme das einige *P. falciparum* Linien vielleicht mehr virulent sind als andere existiert schon lange [70]. Robert et al. (1996) erkannte im Senegal eine Tendenz von RO33 positiven Isolaten, hin zu erhöhten TNF Spiegeln die mit komplizierten Verläufen korrespondieren können [109, 115].

Ebenfalls „inline“ sind Ergebnisse von Felger et al. (1999) die eine erhöhte MOI bei Kindern fanden und dies positiv mit klinischen Malariaepisoden assoziierten. Wir fanden in den unkomplizierten „samples“ durchweg bei allen Allelen geringere MOI als in den beiden Vergleichsgruppen. Aber auch hierfür existieren differente Angaben in der Literatur.

Die MOI für K1 und MAD20 war in der Klasse der unkomplizierten Fälle signifikant erniedrigt, verglichen mit den tödlich endenden Krankheitsgeschichten.

Kein Zusammenhang konnte bei der Verteilung der beiden EBA-175 Fragmente hergeleitet werden.

Bei einer Auswertung von Studiendaten aus Ghana gelang Cramer et al. (2004 *Malaria Journal in print*), aus dem Berliner Tropeninstitut, eine Assoziation des C-Segmentes zum klinischen Verlauf. Die Studienpopulation mit 289 Kindern aus Tamale im nördlichen Ghana wurde in 2 Kohorten aufgeteilt. Kinder mit einem schwerem Verlauf der Malaria wurden gegen eine asymptomatische aber parasitämische Gruppe verglichen. In beiden Gruppen ergab sich eine ähnliche Verteilung der F- bzw. C-Fragmente, lediglich fanden sich in der unkomplizierten Gruppe signifikant mehr Mischinfektionen (22%). In keiner der Gruppen war ein eindeutiger Unterschied bezüglich der Segmentverteilung zu beobachten, jedoch war in der Kohorte der schweren Verläufe ein tödlicher Ausgang der Infektion eindeutig mit dem C-Fragment assoziiert. Abschließend kann gesagt werden, daß bei Infektionen mit einem cAMP-Stamm zwar per se keine unbedingte Verbindung zu einem komplizierten Verlauf besteht, aber in diesem Fall in Ghana dennoch ein erhöhtes Risiko gegeben war, an einer schweren tödlich verlaufenden Form zu erkranken.

Die Prävalenz der Allelfamilien und Fragmentgrößen der Merozoiten Oberflächen Antigene war in unserer Erhebung homogen verteilt so daß sich daraus keinerlei Unterschiede in den untersuchten Gruppen erkennen ließen.

Die Interpretation der gewonnen Daten ist kompliziert was daran liegt, daß zum Teil nur sehr kleine Datensätze zur Verfügung standen. Auch kann auf Grund der unterschiedlichen Immunitätslagen nicht ausgeschlossen werden das manche Parasitenpopulationen eventuell unterrepräsentiert waren. Durch andere Phänomene wie „rosetting“, Sequestration oder Zytoadhärenz die im Detail noch nicht genau verstanden sind, kann es zu täglichen Abweichungen und einer Differenz im Parasitenpool innerhalb eines Wirtes kommen.

7 Zusammenfassung

Die Malaria bleibt auf Grund ihrer geographischen Verbreitung und durch schätzungsweise 500 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr eine der häufigsten Infektionskrankheiten. Sie gehört global gesehen zu den Krankheiten, die u.a. am stärksten die Gesundheitssysteme, die Wirtschaft und nicht zuletzt den betroffenen Patienten selbst beeinflussen. In Hochendemiegebieten verursacht die Malaria jährlich einen enormen Verlust an Wirtschaftskraft und fordert eine große Anzahl an Menschenleben. Die häufigste und oftmals potentiell lebensbedrohlich verlaufende Malaria tropica, verursacht durch *Plasmodium falciparum*, ist in vielen Ländern der Tropen, nicht zuletzt auf Grund des wachsenden Resistenzpotentials der Erreger zu einer großen und zunehmend schwer kontrollierbaren Bedrohung geworden. Auch durch nach Europa importierte Fälle, kommt es immer wieder zu diagnostischen und therapeutischen Problemen. Bedingt durch den wachsenden Tourismus ist die Zahl der nach Deutschland und andere europäische Länder eingeschleppten Malariainfektionen in den letzten Jahrzehnten erheblich angestiegen.

Durch die Gründung des Netzwerkes TropNetEurop 1999 wurde erstmals eine Basis für großflächig angelegte Studien geschaffen. TropNetEurop fungiert weltweit als größter Netzwerkverbund für importierte Infektionskrankheiten. Durch den Zusammenschluß und die Zusammenarbeit von Kliniken und Zentren in ganz Europa gelang es Daten und Blutproben einer bisher einzigartigen Studienpopulation von Fällen importierter Malaria zu sammeln. Dadurch kann auf einen Pool von genetisch enorm diversen Isolaten zurückgegriffen werden.

Bei der Auswertung der vorliegenden Daten und Blutproben von 574 Patienten wurden die afrikanischen Länder südlich der Sahara als Hauptinfektionsgebiete identifiziert. In 92,2% der Fälle konnte eine Infektion mit einem *Plasmodium falciparum* Stamm, einem Land in Zentralafrika, Ostafrika, Südafrika oder Westafrika zugeordnet werden.

Anhand der Angaben der behandelnden Ärzte wurden zunächst Basisdaten, diagnostische Klassifikation, Versorgungsstatus, Komplikationen und die Hauptsymptome aller Patienten erfaßt. Besonders auffallend waren die Angaben bezüglich medikamentöser Prophylaxemaßnahmen. In dieser Rubrik bestätigten nur 18,6% der befragten Personen vorsorglich eine Chemoprophylaxe eingenommen zu haben. Die Studienpopulation bestand aus zwei Hauptgruppen, semi-immunen Immigranten und nicht-immunen Touristen. In der Gruppe der europäischen Reisenden konnte bei 61% definitiv die Einnahme von Antimalariamedikamenten zur Prophylaxe ausgeschlossen werden. Die erfaßten Daten bezüglich auftretender Komplikationen waren umfangreich und wurden mit Hilfe des ICD10 Codes und einiger Zusatzinformationen ausgewertet.

Weitere Ziele der Arbeit waren die Verteilung und Prävalenz unterschiedlicher, pathogenetisch und immunologisch bedeutsamer *Plasmodium falciparum* Proteine an Hand von importierten Infektionen nach Europa zu bestimmen.

Ebenso sollte die Verbreitung und Prävalenz von diversen mit Medikamentenresistenz assoziierten Punktmutationen auf unterschiedlichen *Plasmodium* Genen bestimmt werden.

Zunächst wurden hierzu verschiedene Methoden entwickelt, um mit Hilfe der PCR- und der Restriktionsenzymverdau- Technik ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zu etablieren und zu evaluieren, welche die Punktmutationen in verschiedenen Genabschnitten der Erreger DNA detektiert.

In einer populationsgenetischen Untersuchung wurde geprüft in wie weit sich die Verteilung der Merozoiten-Oberflächen-Proteine 1 und 2 auf dem afrikanischen Kontinent unterscheidet. Die Verteilungsstudie erstreckte sich über ganz Afrika, wodurch es erstmals möglich war einen zuverlässigen Vergleich bezüglich der MSP1- und MSP2- Polymorphismen und der durchschnittlichen Anzahl der Klone (MOI) in nicht lokal begrenzten Arealen und in einer großen, ethnisch differenten Gruppe anzustellen. Diese epidemiologischen Ergebnisse können in Zukunft als Basis für weitere Untersuchungen dienen, zumal die MSP Proteine seit geraumer Zeit in diversen Studien als Impfstoffbestandteile getestet werden. Die Allelverteilung (Häufigkeit) und die Vielgestaltigkeit wurden in Zusammenhang mit unterschiedlichen Regionen gebracht. Es konnte in allen Gebieten eine Dominanz der K1- und IC Familien festgestellt werden, ohne jedoch eine signifikante Tendenz zu erreichen.

Die durchschnittliche Anzahl der Klone bezogen auf die gesamte afrikanische Studienregion unterschied sich signifikant in den Werten für K1- und FC27-Familien ($p < 0,05$).

Der molekulare Marker der MSP2 Oberflächen Antigene scheint auf Grund seiner höheren prozentualen Prävalenz und der MOI für eine Populationsbestimmung besser geeignet zu sein als MSP1.

Um ggf. Aussagen über den klinischen Verlauf der Malaria oder Zusammenhänge zwischen Patientengruppen und einigen molekularen Markern machen zu können wurden diese untereinander korreliert.

So erfolgte eine Einteilung der Patienten in diverse Klassen. Dabei fiel auf, daß das Durchschnittsalter in den Patientengruppen der kompliziert oder tödlich verlaufenden Infektionen signifikant höher war als bei Patienten mit einem unkomplizierten Verlauf der Krankheit (Mann-Whitney/ Wilcoxon $p = 0,0001$). Das steht im Gegensatz zu anderen Ergebnissen in endemischen Gebieten, in denen oftmals nur Kinder mit komplizierten Verläufen assoziiert waren.

Nach dem Vergleich zwischen komplizierten und unkomplizierten Fällen wurde eine signifikante Häufung des RO33 Allels in der komplizierten Gruppe beobachtet. Dagegen war K1 mit einem mildereren Verlauf assoziiert ($p < 0,05$). Die MOI für MAD20 und K1 war jedoch bei den tödlich verlaufenden Infektionen signifikant höher, als bei den unkomplizierten Fällen. Diese Ergebnisse sprechen für Virulenzunterschiede verschiedener *P. falciparum*-Stämme.

Es fand eine Gegenüberstellung der als semi-immun eingestuft Patienten mit nicht-immunen Patienten statt. Beim Vergleich dieser beiden Klassen fiel auf, daß Europäer häufiger nach Aufenthalt in Süd- bzw. Ostafrika in den teilnehmenden TropNetEurop Einrichtungen mit Beschwerden vorstellig wurden. Von allen anderen beobachteten Unterschieden waren zwar einige signifikant auffällig, jedoch wenig aussagekräftig.

In der vorliegenden Erhebung konnte ebenfalls erstmals eine Aussage über die Verteilungsfrequenz der unterschiedlichen EBA-175 Fragmente innerhalb einer großen Studienpopulation gemacht werden.

EBA-175 ist ein 175kDa großes Protein, welches eine entscheidende Rolle bei der Invasion des Merozoiten in die roten Blutkörperchen spielt und daher ebenfalls bereits in Malariavaccinen getestet wurde.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilungsprävalenz bezüglich der territorialen Zonen und einem der beiden Segmente (F- oder C-Fragment) ergeben.

Generell war das Fragment des FCR-Stammes überall häufiger vertreten ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Dies läßt darauf schließen, daß es in Afrika nicht grundsätzlich zur Selektion eines der Fragmente kommt.

Mutationen in bestimmten Genabschnitten von *P. falciparum* können dazu führen, daß sich enzymatisch-biochemische Zielstrukturen verändern und somit eine Medikamentenresistenz gegen Antimalariamedikamente induziert werden kann. So beruht die Resistenz gegen Sulfonamid/Pyrimethamin (SP)-Kombinationen, wie das in Afrika häufig als „first-line-drug“ eingesetzte Fansidar, auf bestimmten Mutationen der für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und die Dihydropteroatsynthetase (DHPS) codierenden Gene.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, daß in der Verteilung der Polymorphismen auf dem afrikanischen Kontinent sowohl Gemeinsamkeiten, als auch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen bestehen. Die erzielten Ergebnisse machen deutlich, daß zahlreiche mit Resistenz gegen SP assoziierte Mutationen auf den untersuchten Genen vorliegen.

Die durchschnittliche Prävalenz eines AS-Tausches in Codon 108 des DHFR Gens war in Ostafrika mit 79,2% am höchsten und in Westafrika mit 61,3% am niedrigsten ($p < 0,05$). Dieses Codon scheint eine Schlüsselrolle in der Resistenzentwicklung gegen Pyrimethamin zuzukommen. Weitere Codons des DHFR Gens zeigten vergleichbare Verteilungsfrequenzen.

In den einzelnen, mit Sulfonamid-Resistenz assoziierten Genloci für das DHPS Gen lagen die Prävalenzwerte niedriger. In Codon 437 des DHPS Gens wurde in 60,2% der Proben aus Zentralafrika eine Mutation festgestellt.

In allen untersuchten Gebieten lagen die entscheidenden Mutationen auf den beiden mit Chloroquin-Resistenz assoziierten Genen *Pfcr1* und *Pfmdr* weit über der kritischen Marke von 20%, wobei auch hier in Ostafrika die höchsten Prozentwerte erreicht wurden (*Pfcr1*-76=84,5% und *Pfmdr*-86=67,9%). Allgemein kann festgehalten werden, daß auf Grund der molekularen Resistenzmarker phänotypisch ein höheres Risiko besteht sich in Ost- und Zentralafrika mit einem Chloroquin bzw. S/P resistenten Stamm zu infizieren.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Untersuchung von allelischen Polymorphismen der einzelnen Gene von *Plasmodium falciparum* ein hilfreicher Ansatz ist, um die Frage nach Resistenzpotentialen in diversen afrikanischen Gebieten zu beantworten und diese in Längsschnittuntersuchungen zu verfolgen.

Ebenso muß der Einsatz von S/P und Chloroquin in den beschriebenen Arealen zur Therapie der unkomplizierten Malaria überdacht werden um eine weitere Ausbreitung der Resistenz zu verhindern und um möglichen MDR Gebieten vorzubeugen.

Diese gewonnenen Daten dienen der Früherkennung sich ausbildender Resistenzen und als Grundlage für Malaria-Kontrollprogramme. Zudem ergibt die Verteilung der EBA-175 Fragmente Hinweise für die Zusammensetzung möglicher Impfstoffkandidaten.

8 Literaturverzeichnis

1. Adagu IS, Warhurst DC. Association of *cg2* and *pfmdr1* genotype with chloroquine resistance in field samples of *Plasmodium falciparum* from Nigeria. *Parasitology* 1999,119: 343-8.
2. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* 1978,77: 72-82.
3. Arieu F, Hommel D, Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A, Sarthou JL, Reynes JM, Fandeur T, Mercereau-Pujalon O. Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana. *J Infect Dis* 2001,184: 237-41.
4. Arnot D. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998,92: 580-5.
5. Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron P. Polymorphism in two merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon. *Malar J* 2003,2: 12.
6. Babiker HA, Lines J, Hill WG, Walliker D. Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in east Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1997,56: 141-7.
7. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. *J Infect Dis* 2001,183: 1535-8. Epub 2001 Apr 13.
8. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999,93 Suppl 1: 11-4.
9. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 1998,92: 367-90.
10. Barnes DA, Foote SJ, Galatis D, Kemp DJ, Cowman AF. Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *Embo J* 1992*,11: 3067-75.
11. Basco LK, de Pecoulas PE, Le Bras J, Wilson CM. *Plasmodium falciparum*: molecular characterization of multidrug-resistant Cambodian isolates. *Exp Parasitol* 1996,82: 97-103.
12. Basco LK, Eldin de Pecoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1995,69: 135-8.
13. Basco LK, Le Bras J, Rhoades Z, Wilson CM. Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharan Africa. *Mol Biochem Parasitol* 1995,74: 157-66.

14. Basco LK, Ramiliarisoa O, Le Bras J. In vitro activity of atovaquone against the African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1995,53: 388-91.
15. Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *J Infect Dis* 2001,183: 1828-31. Epub 2001 May 16.
16. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VIII. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in symptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg* 2001,65: 798-803.
17. Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, Alonso P, Tanner M. Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis* 1997,175: 921-6.
18. Bellamy R, Kwiatkowski D, Hill AV. Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998,92: 312-6.
19. Binks RH, Baum J, Oduola AM, Arnot DE, Babiker HA, Kremsner PG, Roper C, Greenwood BM, Conway DJ. Population genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene. *Mol Biochem Parasitol* 2001,114: 63-70.
20. Binks RH, Conway DJ. The major allelic dimorphisms in four *Plasmodium falciparum* merozoite proteins are not associated with alternative pathways of erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol* 1999,103: 123-7.
21. Bisoffi Z, Matteelli A, Aquilini D, Guaraldi G, Magnani G, Orlando G, Gaiera G, Jelinek T, Behrens RH. Malaria clusters among illegal Chinese immigrants to Europe through Africa. *Emerg Infect Dis* 2003,9: 1177-8.
22. Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995,49: 427-60.
23. Brandling-Bennett AD, Oloo AJ, Watkins WM, Boriga DA, Kariuki DM, Collins WE. Chloroquine treatment of falciparum malaria in an area of Kenya of intermediate chloroquine resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988,82: 833-7.
24. Brasseur P, Kouamouo J, Moyou-Somo R, Druilhe P, Lavoue V, Lavoue P, Turk P, Brandling-Bennett AD, Oloo AJ, Watkins WM, Boriga DA, Kariuki DM, Collins WE. Multi-drug resistant falciparum malaria in Cameroon in 1987-1988. I. Stable figures of prevalence of chloroquine- and quinine-resistant isolates in the original foci. Low prevalence of *P. falciparum* in-vivo resistance to chloroquine in northern Cameroon in 1986. Chloroquine treatment of falciparum malaria in an area of Kenya of intermediate chloroquine resistance. *Am J Trop Med Hyg* 1992,46: 1-7.
25. Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 2001,64: 1-11.

26. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem* 1994,224: 397-405.
27. Carvalho LJ, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol* 2002,56: 327-43.
28. Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwinai P, Looessuwan S, Cowman AF. Analysis of mefloquine resistance and amplification of *pfmdr1* in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1999,61: 780-3.
29. Chen N, Russell B, Staley J, Kotecka B, Nasveld P, Cheng Q. Sequence polymorphisms in *pfcr1* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 2001,183: 1543-5.
30. Chitnis CE. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. *Curr Opin Hematol* 2001,8: 85-91.
31. Clarke D, Odialla H, Ouma J, Kenny V, MacCabe R, Rapuoda B, Watkins WM. A malariometric survey in Turkana District, Kenya: chemosensitivity in vivo of *Plasmodium falciparum* infections and identity of the vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 302-4.
32. Cortese JF, Plowe CV, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Antifolate resistance due to new and known *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *Mol Biochem Parasitol* 1998,94: 205-14.
33. Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988,85: 9109-13.
34. Creasey A, Fenton B, Walker A, Thaithong S, Oliveira S, Mutambu S, Walliker D. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am J Trop Med Hyg* 1990,42: 403-13.
35. Curtis J, Duraisingh MT, Trigg JK, Mbwana H, Warhurst DC, Curtis CF. Direct evidence that asparagine at position 108 of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase is involved in resistance to antifolate drugs in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 678-80.
36. Curtis J, Duraisingh MT, Warhurst DC. In vivo selection for a specific genotype of dihydropteroate synthetase of *Plasmodium falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not chlorproguanil-dapsone treatment. *J Infect Dis* 1998,177: 1429-33.

37. Davies CS, Pudney M, Matthews PJ, Sinden RE. The causal prophylactic activity of the novel hydroxynaphthoquinone 566C80 against *Plasmodium berghei* infections in rats. *Acta Leiden* 1989,58: 115-28.
38. Davies CS, Pudney M, Nicholas JC, Sinden RE. The novel hydroxynaphthoquinone 566C80 inhibits the development of liver stages of *Plasmodium berghei* cultured in vitro. *Parasitology* 1993,106: 1-6.
39. de Pecoulas PE, Basco LK, Le Bras J, Mazabraud A. Association between antifol resistance in vitro and DHFR gene point mutation in *Plasmodium falciparum* isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 181-2.
40. Del Nero L, Nebie I, Soudouem G, Pietra V. Chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine sensitivity in Burkina Faso. In vivo sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine in Burkina Faso. *Trop Geogr Med* 1994,46: 8-10.
41. Diourte Y, Djimde A, Doumbo OK, Sagara I, Coulibaly Y, Dicko A, Diallo M, Diakite M, Cortese JF, Plowe CV. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 1999,60: 475-8.
42. Dittrich S, Schwobel B, Jordan S, Vanisaveth V, Rattanaxay P, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T. Distribution of the two forms of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene in Lao PDR. *Malar J* 2003,2: 23.
43. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2001,344: 257-63.
44. Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* *pfcr* and *pfmdr-1* genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis* 2001,183: 1417-20.
45. Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, Bailey R, Snounou G, Targett GA, Greenwood BM, Warhurst DC. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr 1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology* 1997,114: 205-11.
46. Durand R, Ramiliarisoa O, Secardin Y, Eldin de Pecoulas P, Basco LK, Le Bras J. DHFR gene point mutation as a predictor of *Plasmodium falciparum* resistance to cycloguanil in malaria cases from Africa imported to France. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997,91: 460-1.
47. Eckert J, Kayser FH, Bienz KA, Lindenmann J. *Medizinische Mikrobiologie, Thieme Taschenbuch*. 1989,2: 399-414.
48. Engelbrecht F, Felger I, Genton B, Alpers M, Beck HP. *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol* 1995,81: 90-6.

49. Famin O, Krugliak M, Ginsburg H. Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem Pharmacol* 1999,58: 59-68.
50. Farnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Bjorkman A, Bruce MC, Conway DJ, Day KP, Henning L, Mercereau-Puijalon O, Ranford-Cartwright LC, Rubio JM, Snounou G, Walliker D, Zwetyenga J, do Rosario VE. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001,95: 225-32.
51. Farnert A, Lindberg J, Gil P, Swedberg G, Berqvist Y, Thapar MM, Lindegardh N, Berezcky S, Bjorkman A. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. *Bmj* 2003,326: 628-9.
52. Farnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Bjorkman A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis* 1999,179: 989-95.
53. Felger I, Irion A, Steiger S, Beck HP. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999,93 Suppl 1: 3-9.
54. Felger I, Smith T, Edoh D, Kitua A, Alonso P, Tanner M, Beck HP. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999,93 Suppl 1: 29-34.
55. Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR, Marsh K, Newbold CI. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet* 1997,6: 1357-60.
56. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000,6: 861-71.
57. Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* 2002,1: 1.
58. Fleck SL, Pudney M, Sinden RE. The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 309-12.
59. Flueck TP, Jelinek T, Kilian AH, Adagu IS, Kabagambe G, Sonnenburg F, Warhurst DC. Correlation of in vivo-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Trop Med Int Health* 2000,5: 174-8.
60. Foote SJ, Cowman AF. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop* 1994,56: 157-71.

61. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance, Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990,87: 3014-7.
62. Fowler RE, Billingsley PF, Pudney M, Sinden RE. Inhibitory action of the anti-malarial compound atovaquone (566C80) against *Plasmodium berghei* ANKA in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology* 1994,108: 383-8.
63. Fowler VG, Jr., Lemnge M, Irare SG, Malecela E, Mhina J, Mtui S, Mashaka M, Mtoi R. Efficacy of chloroquine on *Plasmodium falciparum* transmitted at Amani, eastern Usambara Mountains, north-east Tanzania: an area where malaria has recently become endemic. *J Trop Med Hyg* 1993,96: 337-45.
64. Fry M, Pudney M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 1992,43: 1545-53.
65. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Perteua M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002,419: 498-511.
66. Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, Anders RF, Saul A, Baea K, Mellombo M, Taraika J, Brown GV, Pye D, Irving DO, Felger I, Beck HP, Smith TA, Alpers MP. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine* 2003,22: 30-41.
67. Gjorup IE, Ronn A. Malaria in elderly nonimmune travelers. *J Travel Med* 2002,9: 91-3.
68. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2003: CD000129.
69. Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh K, Marsh K, Tulloch S, Oldfield FS, Hayes R. Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987,81: 478-86.
70. Gupta S, Hill AV, Kwiatkowski D, Greenwood AM, Greenwood BM, Day KP. Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994,91: 3715-9.

71. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 1999,5: 340-3.
72. Guthmann JP, Cetre C, Suzan F, Darovare S, Morin F. Field research, relief work and war: does chloroquine-resistance occur in displaced populations of southern Sudan? *Trop Doct* 1996,26: 89-90.
73. Hastings IM, Watkins WM, White NJ. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002,357: 505-19.
74. Hatz FR, Beck B, Blum J, Funk M, Furrer H, Genton B, Holzer B, Loutan L, Markwalder K, Raeber PA, Schlagenhauf P, Siegl G, Steffen R, Sturchler D, Wyss R. [Malaria-chemoprophylaxis 2001]. *Ther Umsch* 2001,58: 347-51.
75. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991,352: 595-600.
76. Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 2002,360: 1468-75.
77. Hoffmann EH, da Silveira LA, Tonhosolo R, Pereira FJ, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto F, Ferreira MU. Geographical patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2. *Ann Trop Med Parasitol* 2001,95: 117-32.
78. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002,298: 129-49.
79. Inselburg J, Bzik DJ, Horii T, Foote SJ, Galatis D, Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA. Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum*: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1987,26: 121-34.
80. Jeffrey, Leach. Roche Lexikon Medizin, Urban und Fischer Verlag, München. Roche Lexikon Medizin, Urban und Fischer Verlag, München 1999,4:
81. Jelinek T, Aida AO, Peyerl-Hoffmann G, Jordan S, Mayor A, Heuschkel C, el Valy AO, von Sonnenburg F, Christophel EM. Diagnostic value of molecular markers in chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Southern Mauritania. *Am J Trop Med Hyg* 2002,67: 449-53.
82. Jelinek T, Grobusch M, Harms-Zwingenberger G, Kollaritsch H, Richter J, Zieger B. *Falciparum* malaria in European tourists to the Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 2000,6: 537-8.

83. Jelinek T, Kilian AH, Curtis J, Duraisingh MT, Kabagambe G, von Sonnenburg F, Warhurst DC. Plasmodium falciparum: selection of serine 108 of dihydrofolate reductase during treatment of uncomplicated malaria with co-trimoxazole in Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg* 1999,61: 125-30.
84. Jelinek T, Kilian AH, Westermeier A, Proll S, Kabagambe G, Nothdurft HD, von Sonnenburg F, Loscher T. Population structure of recrudescing Plasmodium falciparum isolates from western Uganda. *Trop Med Int Health* 1999,4: 476-80.
85. Jelinek T, Nothdurft HD, Loscher T. Malaria in Nonimmune Travelers: A Synopsis of History, Symptoms, and Treatment in 160 Patients. *J Travel Med* 1994,1: 199-202.
86. Jelinek T, Ronn AM, Lemnge MM, Curtis J, Mhina J, Duraisingh MT, Bygbjerg IC, Warhurst DC. Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of Plasmodium falciparum and in vivo resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health* 1998,3: 605-9.
87. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z, Matteelli A, Clerinx J, Corachan M, Puente S, Gjorup I, Harms G, Kollaritsch H, Kotlowski A, Bjorkmann A, Delmont JP, Knobloch J, Nielsen LN, Cuadros J, Hatz C, Beran J, Schmid ML, Schulze M, Lopez-Velez R, Fleischer K, Kapaun A, McWhinney P, Kern P, Atougia J, Fry G, da Cunha S, Boecken G. Imported Falciparum malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2002,34: 572-6.
88. Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Turbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D, Beck E. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 1999,285: 1573-6.
89. Jones TR, Narum DL, Gozalo AS, Aguiar J, Fuhrmann SR, Liang H, Haynes JD, Moch JK, Lucas C, Luu T, Magill AJ, Hoffman SL, Sim BK. Protection of Aotus monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen. *J Infect Dis* 2001,183: 303-312.
90. Jordan S, Jelinek T, Aida AO, Peyerl-Hoffmann G, Heuschkel C, el Valy AO, Christophel EM. Population structure of Plasmodium falciparum isolates during an epidemic in southern Mauritania. *Trop Med Int Health* 2001,6: 761-6.
91. Kain KC, Lanar DE. Determination of genetic variation within Plasmodium falciparum by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Microbiol* 1991,29: 1171-4.
92. Kean BH. Chloroquine-resistant falciparum malaria from Africa. *Jama* 1979,241: 395.
93. Knell AJ. Malaria . A publication of the tropical programme of the wellcome trust. 1991: 1-89.
94. Knobloch J, al. e. Malaria- Grundlagen und klinische Praxis. Uni-Med Verlag. 2003: 9-135.

95. Kollaritsch H, Wiedermann G. Compliance of Austrian tourists with prophylactic measures. *Eur J Epidemiol* 1992,8: 243-51.
96. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* 2000,44: 2100-8.
97. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2002,185: 380-8. Epub 2002 Jan 17.
98. Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, Blackman MJ, Guevara Patino JA, Diggs C, Kaslow DC. Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun* 2000,68: 2215-23.
99. Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG, Lell B, Lehman LG, Luckner D. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria: Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *J Infect Dis* 2001,184: 330-6. Epub 2001 Jun 26.
100. Landgraf B, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH. *Plasmodium falciparum*: susceptibility in vitro and in vivo to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Ghanaian schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994,88: 440-2.
101. Lang W, Löscher T. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis-Malaria*. Georg Thime Verlag. 2000: 10-34.
102. Lell B, Ruangweeraayut R, Wiesner J, Missinou MA, Schindler A, Baranek T, Hintz M, Hutchinson D, Jomaa H, Kremsner PG, Borrmann S, Issifou S, Adegnika AA, Matsiegui PB, Binder R. Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003,47: 735-8.
103. Lin Q, Katakura K, Suzuki M. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. *FEBS Lett* 2002,515: 71-4.
104. Lopes D, Nogueira F, Gil JP, Ferreira C, do Rosario VE, Cravo P. pfcrt and pfmdr1 mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol* 2002,96: 831-4.
105. Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997,91: 256-62.

106. Maberti S, Moore DV, Lanier JE. [The development of resistance to pyrimethamine. Presentation of 15 cases studied in Trujillo, Venezuela]. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Arch Venez Med Trop Parasitol Med* 1960,3: 239-59.
107. Marshall VM, Anthony RL, Bangs MJ, Purnomo, Anders RF, Coppel RL. Allelic variants of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (MSA-2) in a geographically restricted area of Irian Jaya. *Mol Biochem Parasitol* 1994,63: 13-21.
108. Matteelli A, Colombini P, Gulletta M, Castelli F, Carosi G, Nuesch R, Scheller M, Gyr N. Epidemiological features and case management practices of imported malaria in northern Italy 1991-1995. Hospital admissions for malaria in Basel, Switzerland: an epidemiological review of 150 cases. *Trop Med Int Health* 1999,4: 653-7.
109. May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* 2000,182: 1570-3.
110. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A, Alonso PL. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcrt) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001,183: 1413-6. Epub 2001 Mar 30.
111. Mberu EK, Mosobo MK, Nzila AM, Kokwaro GO, Sibley CH, Watkins WM. The changing in vitro susceptibility pattern to pyrimethamine/sulfadoxine in *Plasmodium falciparum* field isolates from Kilifi, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2000,62: 396-401.
112. Meyer CG, May J, Arez AP, Gil JP, Do Rosario V. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum*: asexual stages. *Trop Med Int Health* 2002,7: 395-408.
113. Meyer CG, May J, Luty AJ, Lell B, Kremsner PG. TNFalpha-308A associated with shorter intervals of *Plasmodium falciparum* reinfections. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *Tissue Antigens* 2002,59: 287-92.
114. Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, Issifou S, Adegnikaa AA, Matsiegui PB, Binder R, Lell B, Wiesner J, Baranek T, Jomaa H, Kremsner PG. Fosmidomycin for malaria. *Lancet* 2002,360: 1941-2.
115. Molyneux ME, Engelmann H, Taylor TE, Wirima JJ, Aderka D, Wallach D, Grau GE. Circulating plasma receptors for tumour necrosis factor in Malawian children with severe falciparum malaria. *Cytokine* 1993,5: 604-9.
116. Moore DV, Lanier JE. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1961,10: 5-9.

117. Muehlberger N, Jelinek T, Schlipkoeter U, von Sonnenburg F, Nothdurft HD. Effectiveness of chemoprophylaxis and other determinants of malaria in travellers to Kenya. *Trop Med Int Health* 1998,3: 357-63.
118. Muentener P, Schlagenhauf P, Steffen R. Imported malaria (1985-95): trends and perspectives. *Bull World Health Organ* 1999,77: 560-6.
119. Muehlberger N, Jelinek T, Behrens RH, Gjørup I, Coulaud JP, Clerinx J, Puente S, Burchard G, Gascon J, Grobusch MP, Weitzel T, Zoller T, Kollaritsch H, Beran J, Iversen J, Hatz C, Schmid ML, Bjorkman A, Fleischer K, Bisoffi Z, Guggemos W, Knobloch J, Matteelli A, Schulze MH, Laferl H, Kapaun A, McWhinney P, Lopez-Velez R, Fatkenheuer G, Kern P, Zieger BW, Kotlowski A, Fry G, Cuadros J, Myrvang B. 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* 2003,36: 990-5.
120. Nothdurft HD. *Impf- und Chemoprophylaxe in der Reisemedizin*. Uni-Med Verlag. 2001: 8-30.
121. Ntoumi F, Ngoundou-Landji J, Lekoulou F, Luty A, Deloron P, Ringwald P. Site-based study on polymorphism of *Plasmodium falciparum* MSP-1 and MSP-2 genes in isolates from two villages in Central Africa. *Parassitologia* 2000,42: 197-203.
122. Nuesch R, Scheller M, Gyr N. Hospital admissions for malaria in Basel, Switzerland: an epidemiological review of 150 cases. *J Travel Med* 2000,7: 95-7.
123. Nzila-Mounda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe CV, Winstanley PA, Watkins WM. Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorocycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob Agents Chemother* 1998,42: 164-9.
124. Okenu DM, Riley EM, Bickle QD, Agomo PU, Barbosa A, Daugherty JR, Lanar DE, Conway DJ. Analysis of human antibodies to erythrocyte binding antigen 175 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2000,68: 5559-66.
125. Pandey AV, Bisht H, Babbarwal VK, Srivastava J, Pandey KC, Chauhan VS. Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem J* 2001,355: 333-8.
126. Payne D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology today* 1988,4: 112-115.
127. Peters W. *Plasmodium*: resistance to antimalarial drugs. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990,65 Suppl 1: 103-6.
128. Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990,87: 3018-22.

129. Peterson DS, Miller LH, Wellem TE. Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92: 7100-4.
130. Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, von Sonnenburg F. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Health* 2001,6: 607-13.
131. Phillips-Howard PA, Radalowicz A, Mitchell J, Bradley DJ. Risk of malaria in British residents returning from malarious areas. *Bmj* 1990,300: 499-503.
132. Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V, Hongvangthong B, Pomphida S, Inkathone S, Zhong K, Kain KC. *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis* 2001,183: 789-95.
133. Platel DF, Mangou F, Tribouley-Duret J. Role of glutathione in the detoxification of ferriprotoporphyrin IX in chloroquine resistant *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* 1999,98: 215-23.
134. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* 1997,176: 1590-6.
135. Pova MM, Adagu IS, Oliveira SG, Machado RL, Miles MA, Warhurst DC. PfmDr1 Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and -sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* 1998,88: 64-8.
136. Prescott N, Stowers AW, Cheng Q, Bobogare A, Rzepczyk CM, Saul A. *Plasmodium falciparum* genetic diversity can be characterised using the polymorphic merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gene as a single locus marker. *Mol Biochem Parasitol* 1994,63: 203-12.
137. Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S. The pfmDr1 gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 1999,43: 2943-9.
138. Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* 1996,347: 1654-8.
139. Ramharter M, Wernsdorfer WH, Krensner PGU-hwscsaBTR-BK-afebbdcaa. In vitro activity of quinolines against *Plasmodium falciparum* in Gabon. *Acta Tropica* 2004,90: 55-60.
140. Rathod PK, McErlean T, Lee PC. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94: 9389-93.

141. Reeder JC, Rieckmann KH, Genton B, Lorry K, Wines B, Cowman AF. Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes and in vitro susceptibility to pyrimethamine and cycloguanil of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1996,55: 209-13.
142. Ringwald P, Same Ekobo A, Keundjian A, Kedy Mangamba D, Basco LK. Chemoresistance of *P. falciparum* in urban areas of Yaounde, Cameroon. Part 1: Surveillance of in vitro and in vivo resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine from 1994 to 1999 in Yaounde, Cameroon. *Trop Med Int Health* 2000,5: 612-9.
143. Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, Sarthou JL, Mercereau-Puijalon O. Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 704-11.
144. Roche J, Benito A, Ayecaba S, Amela C, Molina R, Alvar J. Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Equatorial Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* 1993,87: 443-9.
145. Sabatinelli G, Ejov M, Joergensen P. Malaria in the WHO European Region (1971-1999). *Euro Surveill* 2001,6: 61-5.
146. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988,239: 487-91.
147. Saul A, Lawrence G, Smillie A, Rzepczyk CM, Reed C, Taylor D, Anderson K, Stowers A, Kemp R, Allworth A, Anders RF, Brown GV, Pye D, Schoofs P, Irving DO, Dyer SL, Woodrow GC, Briggs WR, Reber R, Sturchler D. Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* 1999,17: 3145-59.
148. Schwartz E, Sadetzki S, Murad H, Raveh D. Age as a risk factor for severe *Plasmodium falciparum* malaria in nonimmune patients. *Clin Infect Dis* 2001,33: 1774-7. Epub 2001 Oct 12.
149. Schwobel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* in vitro and in vivo: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential in vivo resistance marker. *Malar J* 2003,2: 5.
150. Sexton JD, Deloron P, Bugilimfura L, Ntilivamunda A, Neill M. Parasitologic and clinical efficacy of 25 and 50 mg/kg of chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Rwandan children. *Am J Trop Med Hyg* 1988,38: 237-43.
151. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol* 2001,17: 582-8.
152. Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994,264: 1941-4.

153. Sim BK, Orlandi PA, Haynes JD, Klotz FW, Carter JM, Camus D, Zegans ME, Chulay JD. Primary structure of the 175K Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J Cell Biol* 1990,111: 1877-84.
154. Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi DV. Antifolate-resistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94: 1124-9.
155. Snewin VA, England SM, Sims PF, Hyde JE. Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene* 1989,76: 41-52.
156. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, Viriyakosol S. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in Plasmodium falciparum populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999,93: 369-74.
157. Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* 1999,33: 704-11.
158. Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* 1997,272: 3961-6.
159. Steffen R, Fuchs E, Schildknecht J, Naef U, Funk M, Schlagenhauf P, Phillips-Howard P, Nevill C, Sturchler D, Hatz FR, Beck B, Blum J, Furrer H, Genton B, Holzer B, Loutan L, Markwalder K, Raeber PA, Siegl G, Wyss R. Mefloquine compared with other malaria chemoprophylactic regimens in tourists visiting east Africa. [Malaria--chemoprophylaxis 2001]. *Lancet* 1993,341: 1299-303.
160. Sucharit S, Surathin K, Tumrasvin W, Sucharit P. Chloroquine resistant Plasmodium falciparum in Thailand: Susceptibility of Anopheles. *J Med Assoc Thai* 1977,60: 648-54.
161. Syafruddin D, Siregar JE, Marzuki S. Mutations in the cytochrome b gene of Plasmodium berghei conferring resistance to atovaquone. *Mol Biochem Parasitol* 1999,104: 185-94.
162. Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, Maguire JH, Wirth DF. In vitro chloroquine susceptibility and PCR analysis of pfcr1 and pfmdr1 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 2002,66: 474-80.
163. Tinto H, Ouedraogo JB, Erhart A, Van Overmeir C, Dujardin J, Van Marck E, Guiguemde T, D'Alessandro U. Relationship between the Pfcr1 T76 and the Pfmdr-1 Y86 mutations in Plasmodium falciparum and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infection, Genetics and Evolution* 2003,3: 287-292.

164. Tinto H, Zoungrana EB, Coulibaly SO, Ouedraogo JB, Traore M, Guiguemde TR, Van Marck E, D'Alessandro U. Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine efficacy for uncomplicated malaria treatment and haematological recovery in children in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso during a 3-year period 1998-2000. *Trop Med Int Health* 2002,7: 925-30.
165. Toure FS, Mavoungou E, Ndong JM, Tshipamba P, Deloron P. Erythrocyte binding antigen (EBA-175) of *Plasmodium falciparum*: improved genotype determination by nested polymerase chain reaction. *Trop Med Int Health* 2001,6: 767-9.
166. Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001,64: 12-7.
167. Triglia T, Cowman AF. The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat* 1999,2: 15-19.
168. Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94: 13944-9.
169. Tulu AN, Webber RH, Schellenberg JA, Bradley DJ. Failure of chloroquine treatment for malaria in the highlands of Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 556-7.
170. Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, Zalis MG. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000,95: 721-8.
171. Vieira PP, das Gracas Alecrim M, da Silva LH, Gonzalez-Jimenez I, Zalis MG. Analysis of the PfCRT K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. *J Infect Dis* 2001,183: 1832-3.
172. Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapirat P, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, Snounou G. Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ* 1995,73: 85-95.
173. Viriyakosol S, Siripoon N, Zhu XP, Jarra W, Seugorn A, Brown KN, Snounou G. *Plasmodium falciparum*: selective growth of subpopulations from field samples following in vitro culture, as detected by the polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 1994,79: 517-25.
174. von Seidlein L, Duraisingh MT, Drakeley CJ, Bailey R, Greenwood BM, Pinder M. Polymorphism of the Pfmdr1 gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997,91: 450-3.
175. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, Dao LD, Mshinda H, Tanner M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* 1997,89: 161-77.

176. Ware LA, Kain KC, Lee Sim BK, Haynes JD, Baird JK, Lanar DE. Two alleles of the 175-kilodalton Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen. *Mol Biochem Parasitol* 1993,60: 105-9.
177. Wellems TE. Plasmodium chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science* 2002,298: 124-6.
178. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001,184: 770-6.
179. Wernsdorfer WH, Chongsuphajaisiddhi T, Salazar NP. A symposium on containment of mefloquine-resistant falciparum malaria in Southeast Asia with special reference to border malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994,25: 11-8.
180. Wernsdorfer WH, Payne D. The dynamics of drug resistance in Plasmodium falciparum. *Pharmacol Ther* 1991,50: 95-121.
181. White NJ. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *J Antimicrob Chemother* 1992,30: 571-85.
182. WHO. World malaria situation in 1994. Part I. Population at risk. *Wkly Epidemiol Rec* 1997,72: 269-74.
183. WHO. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000,94 Suppl 1: S1-90.
184. WHO. The use of antimalarial drugs: Report of an informal consultation, 2001
185. Wilkinson RN, Noeypatimanondh S, Gould DJ. Infectivity of falciparum malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1976,70: 306-7.
186. Wilson CM, Volkman SK, Thaitong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF. Amplification of pfmdr 1 associated with mefloquine and halofantrine resistance in Plasmodium falciparum from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 1993,57: 151-60.
187. Wilson RJ, Williamson DH, Preiser P. Malaria and other Apicomplexans: the "plant" connection. *Infect Agents Dis* 1994,3: 29-37.
188. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002,2: 209-18.
189. Yang HL, Liu DQ, Yang YM, Huang KG, Dong Y, Yang PF, Liao MZ, Zhang CY. In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum to eight antimalarials in China-Myanmar and China-Lao PDR border areas. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997,28: 460-4.
190. Zalis MG, Pang L, Silveira MS, Milhous WK, Wirth DF. Characterization of Plasmodium falciparum isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg* 1998,58: 630-7.

191. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, Mercereau-Pujalon O. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998,59: 726-35.
192. Hastings IM, Watkins WM, White NJ. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002,357: 505-19.
193. Molyneux DH, Floyd K, Barnish G, Fevre EM. Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Parasitol Today* 1999,15: 238-40.
194. Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* 1999,33: 704-11
195. Jakobsen PH, Heegaard Jakobsen PH, Heegaard PM, Koch C, Wasniowska K, Lemnge MM, Jensen JB, Sim BK. Identification of an erythrocyte binding peptide from the erythrocyte binding antigen, EBA-175, which blocks parasite multiplication and induces peptide-blocking antibodies. *Infect Immun* 1998,66: 4203-7.
196. Jones TR, Narum DL, Gozalo AS, Aguiar J, Fuhrmann SR, Liang H, Haynes JD, Moch JK, Lucas C, Luu T, Magill AJ, Hoffman SL, Sim BK. Protection of Aotus monkeys by *Plasmodium falciparum* EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen. *J Infect Dis* 2001,183: 303-312.
197. Konate L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, Spiegel A, Trape JF, Mercereau-Pujalon O. Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999,93 Suppl 1: 21-8.
198. Sangster N, Batterham P, Chapman HD, Duraisingh M, Le Jambre L, Shirley M, Upcroft J, Upcroft P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int J Parasitol* 2002,32: 637-53
199. Walliker D. The role of molecular genetics in field studies on malaria parasites. *Int J Parasitol* 1994,24: 799-808
200. <http://sites.huji.ac.il/malaria/FramHemoglobindigest.html>
201. <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/index.html>

9 Abkürzungen

A:	Adenin	Mb:	mega bases
Ala:	Alanin	MSP:	merozoite-surface-protein
Arg:	Arginin	PABA:	p-Aminobenzoessäure
AS:	Aminosäure	PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
Asn:	Asparagin	Pfmdr:	<i>P. falciparum</i> multi-drug-resistance
Asp:	Asparaginsäure	RFLP:	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
bp:	Basenpaar	Ser:	Serin
C:	Cytosin	T:	Theronin
CQR:	Chloroquin Resistenz	Taq:	<i>Thermus aquaticus</i> (Polymerase)
DBL:	duffy-binding-like	Thr:	Threonin
DHFR:	Dihydrofolat-Reduktase	TNF:	Tumor Nekrose Faktor
DHPS:	Dihydropterotat-Synthetase	Tris:	2-Amino-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
DMSO:	Dimthylsulfoxid	Val:	Valin
DNA:	Desoxyribonukleinsäure		
EBA-175:	Erythrozyten-bindendes Antigen		
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure		
EIR	entomological inoculation rate		
G:	Guanin		
Glu:	Glutamat		
HLA:	human leukocyte antigen		
ICAM:	intracellular adhesion molecule		
Ile:	Isoleucin		
iNOS:	induzierte NO-Synthetase		
K:	Lysin		
kb:	kilo bases		
kDa:	kilo Dalton		
Leu:	Leucin		
Lys:	Lysin		

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	13
Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> [80]	13
Abbildung 2:	25
Malaria Endemiegebiete und Resistenzverteilung (WHO)	25
Abbildung 3:	30
Schematische Darstellung der Gene die für MSP1 und MSP2 codieren	30
Abbildung 3a:	31
Schematische Darstellung der von Exon1 codierten extrazellulären Domäne [124]	31
Abbildung 4:	33
Invasionsprozeß des Merozoiten in den Erythrozyten:.....	33
Abbildung 5:	37
Verteilung der TropNetEurop Zentren.....	37
Abbildung 6:	46
Exponentielle DNA Vervielfältigung	46
Abbildung 7:	47
Prinzip der PCR.....	47
Abbildung 8:	51
PCR-Produkte der <i>Plasmodien</i> Spezies Bestimmung	51
Abbildung 9:	52
PCR-Produkte der EBA-175 Bestimmung.....	52
Abbildung 10:	53
Amplifikationsschritte der PCR zum spezifischen Nachweis allelischer MSP1/2 Familien	53
Abbildung 11:	54
Agarosegel mit PCR Amplifikationsprodukten der MSP1 Genotypisierung	54
Abbildung 12:	54
Agarosegel mit PCR Amplifikationsprodukten der MSP2 Genotypisierung	54
Abbildung 13:	56
PCR und RFLP-Schrittschema zum Nachweis von Mutationen auf dem DHFR- und DHPS Gen von <i>Plasmodium falciparum</i>	56
Abbildung 14:	57
PCR Amplifikationsprodukte der Primerpaare M3+F/ und F+M4, sowie des Primerpaares K+K/ und L+L/57	
Abbildung 15:	59
Restriktionsverdau mit <i>Tsp509I</i>	59
Abbildung 16:	60
Restriktionsverdau mit <i>XmnI</i>	60

Abbildung 17:	62
Restriktionsverdau des erhaltenen Amplifikats mit M3 und F/ durch <i>AluI</i> , <i>BsrI</i> und <i>BstNI</i>	62
Abbildung 18:	64
Restriktionsverdau mit <i>MnlI</i> und <i>MspA1I</i>	64
Abbildung 19:	65
Restriktionsverdau K mit <i>MwoI</i> und <i>AvaII</i>	65
Abbildung 20:	66
Restriktionsverdau mit <i>FokI</i>	66
Abbildung 21:	67
Restriktionsverdau mit <i>BstUI</i> für Codon 581	67
Abbildung 22:	68
Restriktionsverdau mit <i>MwoI</i> , <i>BsaWI</i> und <i>AgeI</i> für Codon 613.....	68
Abbildung 23:	70
PCR und Restriktionsverdau von Pfcrt Codon 76	70
Abbildung 24:	72
PCR und Restriktionsverdau von Pfmdr Codon 86.....	72
Abbildung 25:	74
Restriktionsenzymverdau Codon 268 mit <i>NsiI</i> , <i>AlwNI</i> und <i>SspI</i>	74
Abbildung 26:	88
Prozentuale Häufigkeit von Beschwerden von europäischen Reisenden und Immigranten/ausländischen Besuchern (n=333) mit einer Malaria tropica Erkrankung	88
Abbildung 27:	89
Geographische Verteilung der importierten <i>Plasmodium falciparum</i> Infektionen nach Europa.....	89
Abbildung 28:	93
Die prozentuale Verteilungsfrequenz der EBA-175 Fragmente in Abhängigkeit vom Infektionsgebiet.....	93
Abbildung 29:	94
Prozentuale Verteilung der EBA-175 Fragmente in den verschiedenen Regionen (n=498*):	94
Abbildung 30:	106
Verteilung von Punktmutationen in Codon 51, 59 und 108 des DHFR-Gen in Regionen südlich der Sahara	106
Abbildung 31:	107
Verteilung von Punktmutationen der Codons 436, 437, 540, 581 und 613 des DHPS-Gen in afrikanischen Regionen	107
Abbildung 32:	113
Prävalenz der Allelfamilien MAD20 und K1 des MSP1 Genes im Vergleich zum klinischen Verlauf.....	113

Abbildung 33:	114
Prävalenz der Allelfamilien FC27 und IC des MSP2 Genes im Vergleich zum klinischen Verlauf:	114
Abbildung 34:	116
Patientengruppen (n=307) mit prozentualer Häufigkeit und der Infektionsregion.....	116

11 Standardisierter TropNetEurop Fragebogen

Clinic ID	Patient ID	Date Initial Visit (DD/MM/YY)	<input type="checkbox"/> Inpatient	Inpatient days	Sex		Date of birth (DD/MM/YY)
			<input type="checkbox"/> Outpatient		M	F	
		/ /					/ /
Country of birth	Country of residence	Citizenship	If born outside Europe, give date of first arrival			(DD/MM/YY)	
						/ /	

HISTORY OF RECENT TRAVEL	Trip Duration (number of days)	Trip Ended (DD/MM/YY)
List, in order, journeys to all countries relevant for this visit, and indicate most likely country of infection by checking		/ /
1. _____ <input type="checkbox"/>		
2. _____ <input type="checkbox"/>		
3. _____ <input type="checkbox"/>		
4. _____ <input type="checkbox"/>		
5. _____ <input type="checkbox"/>		
6. _____ <input type="checkbox"/>		
Detailed information on likely place of infection (town, area):		
Pre-Travel counselling by health care provider? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Don't know		
Malaria <input type="checkbox"/> None <input type="checkbox"/> Chloroquine <input type="checkbox"/> Proguanil <input type="checkbox"/> Mefloquine <input type="checkbox"/> Doxycycline <input type="checkbox"/> Atovaquone/Proguanil		
Chemoprophylaxis: <input type="checkbox"/> Other: _____ Compliant: <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> ...No		

Patient Classification	Reason for most recent travel	Chief complaint (CHECK ALL THAT APPLY)	
<input type="checkbox"/> Immigrant / Refugee	<input type="checkbox"/> Tourism	<input type="checkbox"/> Asymptomatic	<input type="checkbox"/> Lymphadenopathy
<input type="checkbox"/> Foreign visitor	<input type="checkbox"/> Visiting Relatives/Friends (VRFs)	<input type="checkbox"/> Screening	<input type="checkbox"/> Musculoskeletal
<input type="checkbox"/> European, lives/works in Europe	<input type="checkbox"/> Business	Or:	<input type="checkbox"/> Diarrhoea
<input type="checkbox"/> European, lives/works outside Europe (urban)	<input type="checkbox"/> Immigration	<input type="checkbox"/> Fever	<input type="checkbox"/> Vomiting
<input type="checkbox"/> European, lives/works outside Europe (rural)	<input type="checkbox"/> Research / Education	<input type="checkbox"/> Fatigue	<input type="checkbox"/> ENT
	<input type="checkbox"/> Missionary/Volunteer/ Humanitarian	<input type="checkbox"/> Skin	<input type="checkbox"/> Genitourinary
	<input type="checkbox"/> Military	<input type="checkbox"/> Respiratory	<input type="checkbox"/> Neurologic
	<input type="checkbox"/> Other	<input type="checkbox"/> Headache	<input type="checkbox"/> Psychologic
			<input type="checkbox"/> Other:

Date of symptoms onset: (DD/MM/YY) _____ / _____ / _____

DIAGNOSIS AND TREATMENT	1. Notification Dx	2. Notification Dx	3. Notification Dx
Working Dx			
Final Dx			
How was Dx achieved? ¹	P D A SP M G C O	P D A SP M G C O	P D A SP M G C O
Treatment (1. drug)			
Treatment (2. drug)			
Treatment (3. drug)			
Treatment (4. drug)			

¹ Diagnostic Procedures: P=Pathogen detection D=DNA detection A=Antigen detection SP=Antibody increase in serum pair (IgM or IgG) M=IgM detection G= IgG detection C=Clinical reason

Accompanying Diagnoses: 1. _____ 2. _____ 3. _____

DEATH? Yes No If Yes, why? _____DEATH? Yes No If Yes, why? _____

12 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Thomas Löscher danke ich für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Infektions- und Tropenmedizin in München durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. Tomas Jelinek danke ich besonders für die Betreuung dieser Arbeit, sowie seine Unterstützung bei Stipendienanträgen.

Einen Dank allen Angestellten des Institut für Infektions- und Tropenmedizin, die mir immer mit Hilfe und Rat zur Seite standen, besonders an Gaby Peyerl-Hoffmann für die praktische Unterstützung und die Motivation.

Diese Arbeit wurde finanziert durch ein Stipendium zur Förderung des Wissenschaftlichen Nachwuchses der Ludwigs- Maximilians-Universität, München.

Mein herzlicher und ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und meiner Familie, ohne deren Unterstützung, Liebe, Zuneigung und Motivation die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

13 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Wilhelm
Vorname: Michael
Adresse: Pfeuferstr. 61
81373 München
Tel. : 089/72939674
e-mail: michael.wilhelm@lrz.uni-muenchen.de, michi.pharm@gmx.net
Geburtsdatum: 21. Juli 1973
Geburtsort: Augsburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung / Studium:

1979 – 1984 Grund- / Hauptschule Neusäß bei Augsburg
1984 – 1993 Jakob-Fugger-Gymnasium Augsburg
1993 – 1994 Grundwehrdienst / Luftwaffe
1994 –10/99 Pharmaziestudium Philipps Universität Marburg
11/99 – 04/00 Praktikum (im Rahmen des praktischen Jahres / Pharmazie)
im St. Josephs- Candler Hospital, Savannah, Georgia (USA)
05/00 – 10/00 Praktikum (im Rahmen des praktischen Jahres / Pharmazie)
Arcis-Apotheke München
12/00 Abschluß des Studiums der Pharmazie mit dem 3. Staatsexamen

Berufliche und Wissenschaftliche Tätigkeit:

11/01 – 03/04 Promotionsstudent an der LMU München in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. T. Löscher in der Arbeitsgruppe „Importierte Infektionen“ von PD. Dr. T. Jelinek
03/02– 07/02 Durchführung und Koordination einer Malariastudie in Boa Vista, Roraima, Brasilien im Rahmen der Promotion
11/02 – 02/04 Angestellter Apotheker in diversen öffentlichen Apotheken
03/04-derzeit Leiter der Korbinian Apotheke in München-Ismaning

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Wilske

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. habil. T. Jelinek

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2004