

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. M. Hölscher

Prävalenz von *Plasmodium knowlesi* in Nord Sulawesi, Indonesien

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

vorgelegt von
Adinda Natascha Harle
aus Augsburg
2018

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

Berichterstatterin: PD Dr. Nicole Berens-Riha

Mitberichterstatter: PD Dr. Andreas Wiesner
Prof. Dr. Peter Stingl
Prof. Dr. Eva Grill

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2018

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Allgemeine Informationen zu Malaria.....	6
1.1.1 Definition von Malaria.....	6
1.1.2 Malaria in Indonesien.....	6
1.1.3 Die Erreger.....	7
1.2 Entdeckung und Geschichte von <i>Plasmodium knowlesi</i>	7
1.3 Epidemiologie.....	9
1.3.1 Vorkommen.....	9
1.3.2 Der natürliche Wirt.....	10
1.3.3 Moskitos als Vektoren.....	11
1.4 Lebenszyklus von <i>P. knowlesi</i>	12
1.5 Klinischer Verlauf.....	13
1.6 Diagnostik.....	14
1.6.1 Rapid Diagnostic Tests (RDTs) – Schnelldiagnostiktests.....	14
1.6.2 Mikroskopie.....	15
1.6.3 Molekulare Diagnostik.....	16
1.7 Therapie.....	17
1.7.1 Therapie der unkomplizierten Malaria verursacht durch <i>P. knowlesi</i>	17
1.7.2 Therapie der komplizierten Malaria verursacht durch <i>P. knowlesi</i>	17
2. Problemstellung und Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Studienort und Probensammlung.....	19
3.2 Material.....	20
3.2.1 Chemikalien.....	20
3.2.2 Labormaterial.....	20
3.2.3 Geräte und Software.....	21
3.3 Methoden.....	22
3.3.1 DNA-Extraktion.....	22
3.3.2 DNA-Amplifikation mit PCR-Methode.....	22
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	25
3.3.4 DNA-Sequenzierung.....	26

4. Ergebnisse.....	28
4.1 Speziesdifferenzierung.....	28
4.2. Ergebnisse der Gelelektrophorese.....	30
4.2.1 Beispiel für positive Ergebnisse von <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> und <i>P. knowlesi</i> (Pmk8/r9).....	30
4.2.2 Ergebnisse der fraglich <i>knowlesi</i> -positiven Proben mit verschiedenen Primern.....	31
4.2 Untersuchung der fraglich <i>knowlesi</i> -positiven Proben.....	32
4.3 Ergebnisse der Sequenzierung.....	35
4.4 Bestimmung der Prävalenz der <i>Plasmodien spp.</i>	35
5. Diskussion.....	36
5.1 Mikroskopie im Vergleich zu molekularer Diagnostik.....	36
5.2 Untersuchung der fraglich <i>knowlesi</i> -positiven Proben.....	37
5.3 Mögliche Ursachen für unklare Ergebnisse.....	37
5.4 Ausblick.....	41
6. Zusammenfassung.....	42
7. Literaturverzeichnis.....	44
8. Abkürzungen.....	53
9. Abbildungsverzeichnis.....	54
10. Tabellenverzeichnis.....	55
11. Danksagung.....	56
12. Eidesstattliche Versicherung.....	57

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Informationen zu Malaria

1.1.1 Definition von Malaria

Malaria (von italienisch „*mala aria*“ – schlechte Luft), auch genannt Sumpffieber, ist eine Tropenkrankheit, die von einzelligen Parasiten, den Plasmodien, verursacht wird. Die Plasmodien werden über den Stich der weiblichen Anopheles-Mücke auf Mensch und Tier übertragen. Typische Symptome einer Malariainfektion sind hohes, periodisch auftretendes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen. Bei fulminantem Verlauf kann die Krankheit rasch zum Koma und zum Tode führen.

1.1.2 Malaria in Indonesien

Durch die tropische Lage ist Indonesien ein Endemiegebiet für Malaria. Jährlich kommt es zu Millionen von Malariainfektionen und Tausenden von Todesfällen. So berichtet die Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization, WHO) im Jahr 2013 von 252.027 bestätigten Malariafällen, schätzt aber die Zahl der Infektionen zwischen 3.200.000 – 5.300.000 (1). Es wurde 2013 von 64 Patienten berichtet, die aufgrund der Infektion verstarben, allerdings wird die Dunkelziffer auf 540 – 12.000 geschätzt (1). Die am häufigsten vorkommenden *Plasmodium spp.* in Indonesien sind *Plasmodium falciparum* (57%) und *Plasmodium vivax* (43%) (1).



Abb. 1: Bestätigte Malariafälle in Indonesien pro 1000 Einwohner/ Prävalenz der Parasiten (PP), aus (1).

1.1.3 Die Erreger

Bis vor kurzem galten nur vier Erreger als humanpathogen: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale*. In einer Studie aus dem Jahr 2004 konnten jedoch Singh *et al.* zeigen, dass ein Großteil der Malariainfektionen in Sarawak, malaysisches Borneo, durch eine bisher unterschätzte *Plasmodien spp.* verursacht wurde - nämlich *Plasmodium knowlesi* (2). Mittlerweile ist *P. knowlesi* als fünfter humanpathogener Erreger der Malaria anerkannt (3, 4). Bei dieser Form der Malaria handelt es sich um eine Zoonose, da der natürliche Wirt von *P. knowlesi* Affen sind (5). Die Übertragung von Affe zu Mensch erfolgt ebenso über die Anopheles-Mücke (6). Zudem zeigten neuere Studien, dass *P. ovale* in zwei verschiedene Subpopulationen unterteilt werden kann, die *P. ovale wallikeri* und *P. ovale curtisi* benannt wurden (7).

1.2 Entdeckung und Geschichte von *Plasmodium knowlesi*

1931 forschten Campbell und Napier gerade an der Calcutta School of Tropical Medicine in Indien zu Leishmaniose, als sie erstmals *Plasmodium knowlesi* zufällig aus einem Blutausschlag eines Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*), auch genannt Javaneraffe, isolierten (8-10). Sie verabreichten daraufhin nochmals zwei Langschwanzmakaken und einem Rhesusmakaken (*Macaca mulatta*) *P. knowlesi*-infiziertes Blut und stellten fest, dass die Infektion beim Rhesusmakaken einen fulminanten Verlauf mit Hämoglobinurie hatte, wohingegen die Infektion bei den Langschwanzmakaken milde verlief (10). Sie übergaben den Makaken für weitere Experimente an Robert Knowles und Das Gupta, die am gleichen Institut an Malaria forschten. Diese konnten bestätigen, dass es sowohl eine milde als auch eine schwerwiegende Verlaufsform der Infektion mit *P. knowlesi* gab, je nachdem ob es sich dabei um den natürlichen Wirt (*Macaca fascicularis*) oder um Rhesusmakaken handelte (8). Knowles und Das Gupta infizierten schließlich drei freiwillige Patienten mit *P. knowlesi*, die daraufhin an Malaria erkrankten (8). Sie beobachteten tägliche Fieberschübe bei den Patienten und stellten zum ersten Mal die morphologischen Eigenschaften von *Plasmodium knowlesi* dar (8). Dabei zeigte sich, dass der neu entdeckte Einzeller morphologisch *Plasmodium malariae* ähnelte (8). Sinton und Mulligan untersuchten kurze Zeit später die Morphologie von *P. knowlesi* genauer und bestätigten den 24 h asexuellen Reproduktionszyklus, welcher zu den täglichen Fieberschüben der Patienten passte (11, 12). Dies überzeugte sie davon, dass

es sich tatsächlich um eine neue Malariaspezies handelte und benannten ihn zur Ehrung nach seinem Entdecker Robert Knowles (11, 12).

Vor der Entdeckung von Penicillin etablierte Wagner-Juaregg die sogenannte Malariatherapie bei der die tertiäre Neurosyphilis zwischen den 1920er bis 1955 mit durch *P. vivax* induzierten Fieber behandelt wurde (13, 14). Van Rooyen und Pile machten 1935 den Vorschlag *P. vivax* durch *P. knowlesi* bei der Malariatherapie zu ersetzen, nachdem sie in ihrer Studie mit 12 Patienten feststellten, dass die Inkubationszeit zwischen 3-14 d betrug und die Infektion milder verlief (15, 16). Besonders in Rumänien wurde bis 1955 diese Form der Malariatherapie bei Neurosyphilis häufig angewendet, bis Ciuca *et al.* nach der Anwendung bei 170 Patienten feststellten, dass bei dem verwendeten *P. knowlesi* Stamm die Virulenz zugenommen hatte (17).

1965 wurde erstmals von einer natürlich erworbenen Infektion mit *P. knowlesi* bei einem Menschen berichtet (18). Ein 37-jähriger Amerikaner, der als Gutachter für die U.S. Army arbeitete, hatte sich bei seinen Arbeiten in Malaysia im Wald in Pahang infiziert. Bei seiner Rückkehr nach Maryland in den USA wurden in seinem Blutausschrieb mikroskopisch Malariaparasiten entdeckt, die den Ringformen von *P. falciparum* ähnelten. Er wurde an das Clinical Centre of the National Institute of Health in Bethesda überwiesen, wo man allerdings mikroskopisch bandförmige Erreger feststellte, die *P. malariae* glichen. Bevor der Patient behandelt wurde, schickte man eine Blutprobe an das Forschungslabor des U.S. Penitentiary in Atlanta, ein Bundesgefängnis in den USA, in dem zu der Zeit an *P. malariae* geforscht wurde. Weitere Blutproben wurden daraufhin sieben Freiwilligen und drei Rhesusmakaken verabreicht. Die infizierten Menschen entwickelten tägliche Fieberschübe, kurz darauf verstarben die Affen an der fulminant verlaufenden Malariainfektion, was die Diagnose einer *P. knowlesi* induzierten Malaria bestätigte (19).

Des Weiteren gab es in den frühen 1960ern Berichte aus zwei unterschiedlichen Laboratorien in den USA über versehentlich erworbene Infektionen von zwei Personen durch Moskitostiche mit *Plasmodium cynomogli*, ein weiteren Malariaspezies, die bei Langschwanzmakaken vorkommt (20, 21).

Zusammen mit den beschriebenen *Knowlesi*-Fällen gab dies Anlass für weitere Forschungen zur Beantwortung der Frage, ob Affenmalaria eine mögliche Bedrohung für Menschen darstellen könnte. In einer Studie in Westmalaysia wurden Rhesusmakaken mit Blutproben von 1117 Menschen beimpft, die in Dörfern am Waldrand lebten. Dabei zeigten sich keine Malariainfektionen und deshalb nahm man schließlich an, dass menschliche *P. knowlesi* Infektionen selten auftreten (22).

2004 berichteten Singh *et al.* jedoch in einer retrospektiven Studie, dass in Sarawak im malaysischen Teil von Borneo eine große Zahl natürlich erworbener Infektionen mit *P. knowlesi* beim Menschen nachgewiesen werden konnte (2). Mittels Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) und speziell entwickelten *P. knowlesi*-spezifischen Primern, konnte gezeigt werden, dass 120 (58%) von 208 Proben eigentlich *P. knowlesi* Infektionen waren, obwohl diese vorher als *P. malariae* Infektion eingestuft wurden (2). Somit wurde klar, dass die Prävalenz von *P. knowlesi* Infektionen beim Menschen deutlich unterschätzt wurde.

1.3 Epidemiologie

1.3.1 Vorkommen

Das Vorkommen von *P. knowlesi* beschränkt sich weitgehend auf Südostasien. Viele Berichte und Studien stammen aus Malaysia, da seit der Veröffentlichung von Singh *et al.* im Jahr 2004 dort die Forschungsarbeiten zu *P. knowlesi* und Diagnosestellung mittels PCR-Methode intensiviert wurden (2, 23-27). Weiterhin gibt es Berichte von *knowlesi*-Malaria beim Menschen aus Myanmar (28), den Philippinen (29), Singapur (30), Thailand (31), Vietnam (32), Kambodscha (33) und Indonesien (34, 35). Außerdem wurden in vielen Ländern wie z.B. Deutschland (36, 37), Schweden (38), Japan (39) etc. Fälle von Reisenden in Südostasien veröffentlicht, die nach ihrer Rückkehr in ihr Heimatland Symptome einer Malaria entwickelten und diese schließlich als eine *P. knowlesi* Infektion diagnostiziert wurde. Die tatsächliche Prävalenz in Südostasien ist allerdings nach wie vor unbekannt, da eine sichere Diagnosestellung nur mittels molekularer Diagnostik möglich ist, die in vielen dieser Länder nicht angewandt werden kann (40).

1.3.2 Der natürliche Wirt

Als natürlicher Wirt von *P. knowlesi* wurden Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) sowie die südlichen Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) identifiziert, die in Südostasien heimisch sind (Abb. 2, 3) (5, 41-43). Ebenso wird über das Vorkommen bei einem Sumatra-Langur (*Presbytis melalophos*), einem Schlankaffen, auf der malaysischen Halbinsel (44) berichtet. Der Parasit wurde in wilden Populationen von Langschwanzmakaken in Malaysia (45), Thailand (46), den Philippinen (47, 48) und Singapur (30) entdeckt. Bei *M. nemestrina* wurde *P. knowlesi* ebenso in Malaysia (49) als auch in Thailand (46) gefunden. Bei wilden Affen wurde die bisher höchste Prävalenz von *P. knowlesi* in Sarawak im malaysischen Teil von Borneo beobachtet. Dort wurden bei 71 (87%) von 83 Langschwanzmakaken und bei 13 (50%) von 26 Schweinsaffen der Erreger nachgewiesen (49).



Abb. 2: Javaneraffe (*Macaca fascicularis*), aus (50)



Abb. 3: Südlicher Schweinsaffe (*Macaca nemestrina*),
aus (51)

1.3.3 Moskitos als Vektoren

Die Übertragung von *P. knowlesi* erfolgt über Moskitos der *Anopheles leucosphyrus* Gruppe, die als Vektoren dienen. Diese sind in Südostasien endemisch und ihre Ausbreitung deckt sich weitgehend mit dem Vorkommen der Langschwanzmakaken und Schweinsaffen (Abb. 4) (52, 53). Diese Moskitogruppe ist nicht nur Vektor von *P. knowlesi*, sondern auch von *P. falciparum* und *P. vivax* (54).

Auf der malaysischen Halbinsel wurde 1961 erstmals im Bundesstaat Selangor *Anopheles hackeri* als natürlicher Vektor der Affenmalaria gefunden, der mit *P. knowlesi* infiziert war (6).

Viele verschiedene Spezies aus der *Anopheles leucosphyrus* Gruppe können als Vektoren dienen. Darunter wurde beispielsweise in Sabah, malaysisches Borneo, *Anopheles balabacensis* als Überträger von *P. knowlesi* identifiziert (55, 56). In Sarawak stellt *Anopheles latens* den Großteil der Vektoren der Affenmalaria dar (57).

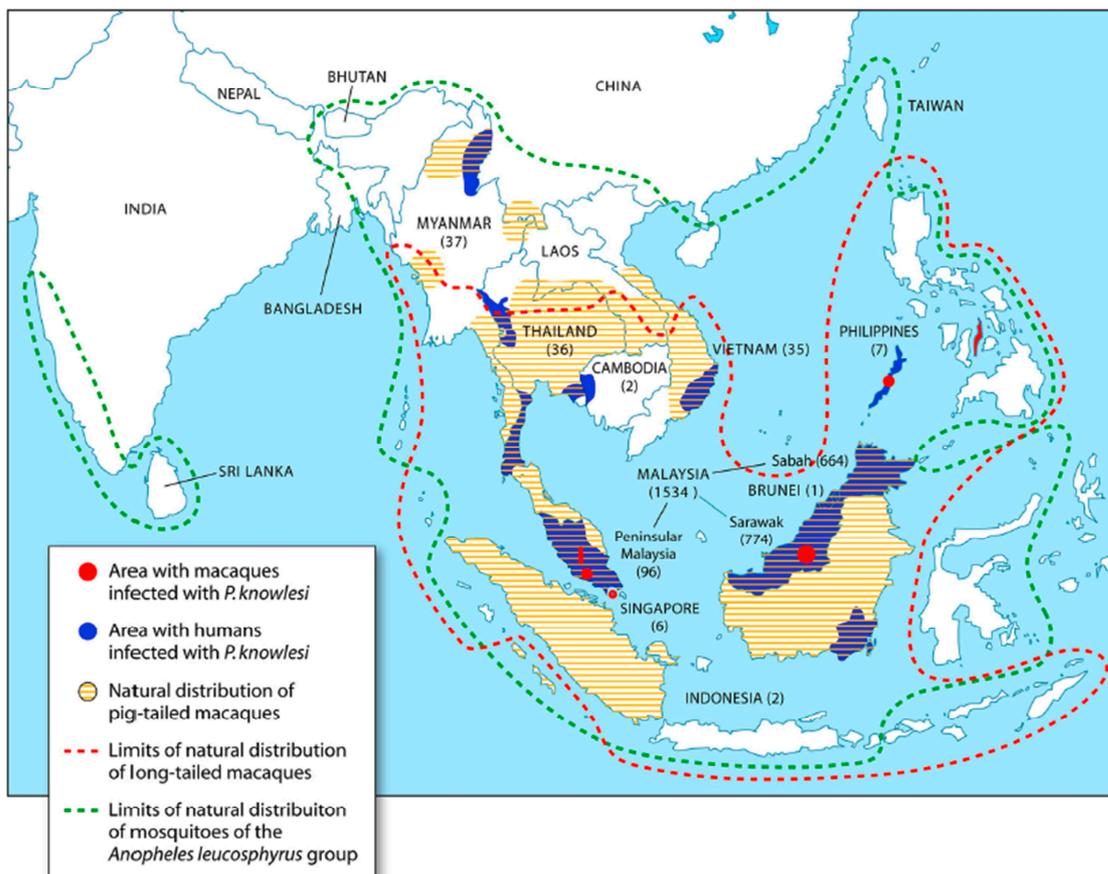


Abb. 4: Berichte von Fällen einer *P. knowlesi* Infektion bei Menschen und bei Makaken in Südostasien. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen des natürlichen Vorkommens von Langschwanzmakaken (rot) sowie Moskitos der *Anopheles leucosphyrus* Gruppe als Vektoren (grün), Abbildung aus (58)

1.4 Lebenszyklus von *P. knowlesi*

Der Lebenszyklus von *P. knowlesi* entspricht dem Lebenszyklus anderer *Plasmodien spp.*. Beim Stich einer infizierten, weiblichen Anophelesmücke werden über den Speichel Sporozoiten in die Blutbahn des Affen bzw. des Menschen übertragen (59). Über den Blutstrom gelangen diese zur Leber und dringen in Hepatozyten ein, in denen sie zu Leberschizonten heranreifen. Hier findet die ungeschlechtliche Vermehrung statt (=exoerythrozytäre Schizogonie) und es werden nach Ruptur des Leberschizonts tausende Merozoiten freigesetzt. Diese gehen wieder in den Blutkreislauf über und infizieren Erythrozyten. Hypnozoiten, die in der Leber verbleiben und nach Monaten erneut zu einer Infektion führen können wie es bei *P. vivax* und *P. ovale* der Fall ist, kommen bei *P. knowlesi* nicht vor. In den Erythrozyten findet erneut eine asexuelle, intrazelluläre Vermehrung statt (=erythrozytäre Schizogonie). Zwischenstadien bei der Vermehrung werden in frühe und reife Trophozoiten unterteilt. Der Erythrozytenschizont rupturiert und es werden wiederum Merozoiten freigesetzt, die die roten Blutkörperchen abermals infizieren und die Teilung schließlich erneut beginnt. Einige Plasmodien entwickeln sich in den Erythrozyten zu den Geschlechtsformen, den sogenannten männlichen und weiblichen Gametozyten. Diese können von der Mücke aufgenommen werden und entwickeln sich im Darm zu Sporozoiten weiter. Über den Speichel der Mücke können die Sporozoiten erneut weitergegeben werden und Affe bzw. Mensch infizieren.

Symptome einer Infektion hängen mit der intrazellulären Vermehrung in den Erythrozyten zusammen. Nach jedem Vermehrungszyklus kommt es zu einer massenhaften Freisetzung von Parasiten, die zu einem Fieberschub führen. *P. knowlesi* hat die kürzesten Teilungsraten mit 24 h, was zu täglichen Fieberschüben führt (59). Ebenso kann es durch die schnelle Vermehrung zu Hyperparasitämie kommen, welche einen fulminanten Verlauf der Infektion zur Folge haben kann (60). Die Dauer des Vermehrungszyklus von *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale* liegt bei ungefähr 48 h, bei *P. malariae* bei 72 h (59). Da bei *P. falciparum* die Vermehrung meist nicht synchronisiert verläuft, tritt oft ein unregelmäßiges Fieber ohne klaren Rhythmus auf.

Malaria

(*Plasmodium spp.*)

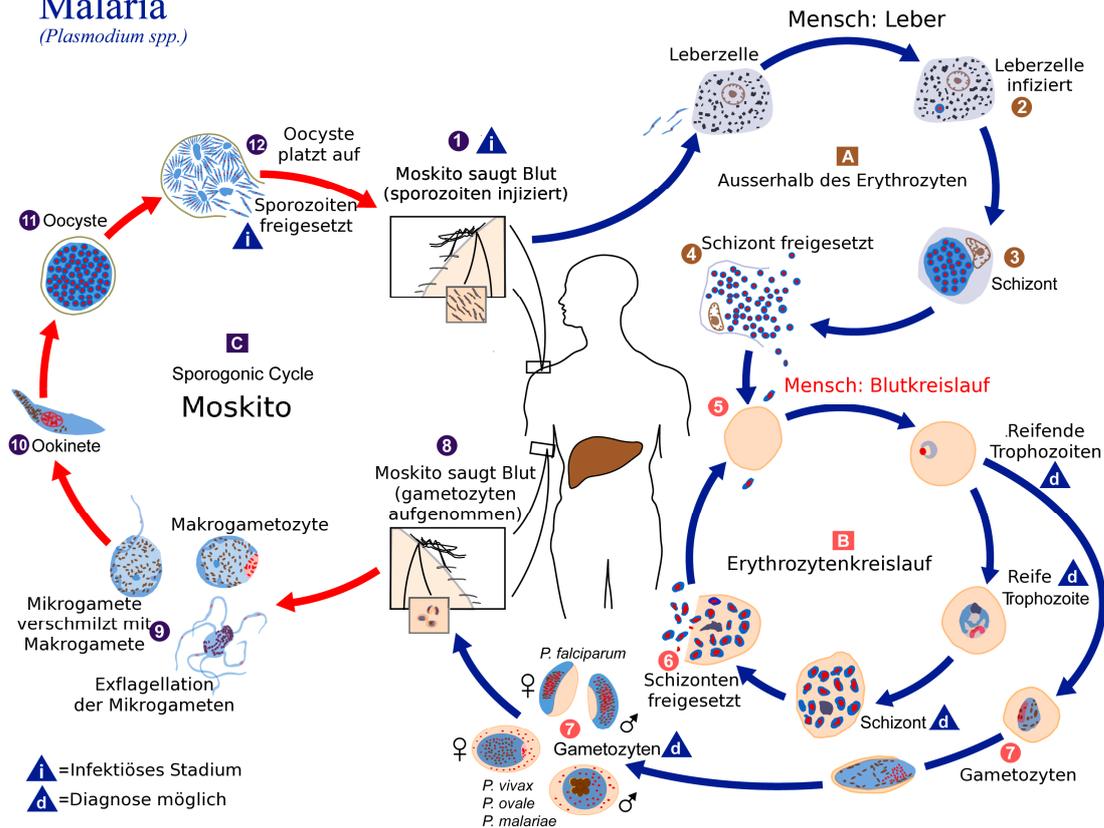


Abb. 5: Lebenszyklus von Plasmodien, aus(61).

1.5 Klinischer Verlauf

Berichte über den klinischen Verlauf der *knowlesi* Malaria umfassen ein Spektrum von unkomplizierten Infektionen bis hin zu fulminanten Verläufen mit Multiorganversagen (24, 60). Die Symptome sind nicht spezifisch und ähneln denen einer *falciparum* oder *vivax* Malaria (60). Dazu gehören Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Myalgien, Arthralgien, verminderter Appetit und Unwohlsein (60). Zudem traten in einer prospektiven Studie von Daneshvar *et al.* bei circa der Hälfte der untersuchten Patienten zusätzlich Husten, Übelkeit und Bauchschmerzen auf und ein Drittel hatte Erbrechen und Diarrhö (60). Bei der körperlichen Untersuchung konnte zum Teil Leber oder Milz getastet werden (60).

Laborchemisch zeigte sich am häufigsten eine Thrombozytopenie (24, 62, 63). Ebenso konnten bei vielen Patienten eine Niereninsuffizienz, erhöhte Leberwerte und eine Hyponatriämie beobachtet werden (60).

Symptome einer fulminant verlaufenden Malaria zeigten sich mit Ikterus, Hypotension, akutem Atemnotsyndrom (ARDS), akutem Nierenversagen und Hyperparasitämie (Parasitenzahl >100.000/μL) (60). Besonders die Hyperparasitämie ist stark assoziiert mit

dem Schweregrad der Infektion (60). Die komplizierte *knowlesi* Malaria entspricht weitgehend der WHO Definition (s.u.) für die komplizierte *falciparum* Malaria, eine zerebrale Malaria wurde jedoch mit *P. knowlesi* noch nicht beobachtet (64). In ungefähr 10% der Fälle kann *P. knowlesi* zu fulminanten Verläufen führen mit einer Letalität von 1,8% (60).

1.6 Diagnostik

1.6.1 Rapid Diagnostic Tests (RDTs) – Schnelldiagnostik

Schnelldiagnostik, sogenannte Rapid Diagnostic Tests (RDTs), sind eine der einfachsten Methoden, um die Diagnose einer Malaria zu stellen. Mit sehr wenig Aufwand können diese auch in ländlichen Gebieten angewendet werden (65). Die Wirkungsweise der RDTs beruht auf immunochromatografischer Basis, die durch verschiedene Antikörper hervorgerufen wird. So werden zur Erkennung von *P. falciparum* Antikörper verwendet, die spezifisch gegen das Histidin-reiche Protein 2 (HRP-2) sind. Des Weiteren können *P. vivax* oder *P. falciparum* durch Antikörper gegen die Laktatdehydrogenase (PvLDH/PfLDH) erkannt werden. Es gibt aber auch RDTs, die nur die genus-spezifischen LDH- oder Aldolase-Antikörper (pan-pLDH/pan-Aldolase) enthalten und somit *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale* erkennen können.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die aktuell verfügbaren RDTs für die Erkennung von *P. knowlesi* bisher noch nicht geeignet sind, da es zu Kreuzreaktionen mit *P. falciparum* oder *P. vivax* kommen kann und daher noch nicht spezifisch genug sind (66). Außerdem fand man heraus, dass eine *P. knowlesi* Infektion mit niedriger Parasitämie nicht mit den RDTs erkannt werden kann (67). Da der Parasit einen 24 h Reproduktionszyklus hat, kann die Malaria auch schnell zu einer Hyperparasitämie führen und fulminant verlaufen (24). Deshalb ist eine frühzeitige Diagnosestellung dementsprechend besonders wichtig.

1.6.2 Mikroskopie

Zur Diagnosestellung von Malaria wird in ländlichen Gebieten in Südostasien meist die Mikroskopie verwendet, da es eine schnelle und günstige Methode darstellt. Jede Plasmodienspezies weist charakteristische morphologische Eigenschaften auf, wodurch sich der Parasit identifizieren lässt (5). Allerdings ist es bei *P. knowlesi* nicht möglich eine eindeutige Diagnose mittels Mikroskopie zu stellen, da der Parasit wie zuvor beschrieben morphologisch *P. malariae* oder *P. falciparum* ähneln kann (2). Frühe Stadien der Trophozoiten erscheinen als Ringformen in den Erythrozyten und lassen sich nicht von den frühen Trophozoiten von *P. falciparum* unterscheiden (2). In manchen Erythrozyten sind zwei Chromatinpunkte in den Ringformen zu sehen und es werden mehr als ein Plasmodium in einem Erythrozyt beobachtet, was ebenso typisch für *P. falciparum* ist (2). Die späten Formen der Trophozoiten können bandförmig erscheinen wie es auch für *P. malariae* der Fall ist (2). Weitere gemeinsame morphologische Charakteristika von *P. knowlesi* und *P. malariae* lassen sich sowohl in den Schizonten als auch in den Gametozyten der Plasmodien erkennen (s. Abb. 6) (2).

Die Mikroskopie lässt keine eindeutige Diagnose für *P. knowlesi* zu. Um mehr über dessen Prävalenz und Morbidität im Menschen zu erfahren, müssen molekulare Methoden verwendet werden.

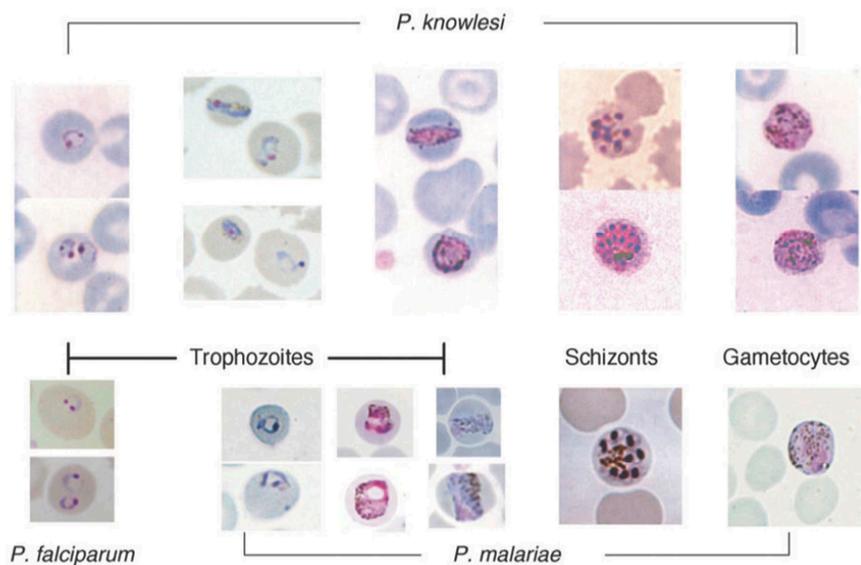


Abb. 6: Giemsa-gefärbte dünne Blutaussstriche, die die morphologischen Ähnlichkeiten von *P. knowlesi* mit *P. falciparum* oder *P. malariae* zeigen, Abbildung aus (4).

1.6.3 Molekulare Diagnostik

Die molekulare Diagnostik stellt bislang die einzige Möglichkeit dar, die Diagnose einer *knowlesi* Malaria definitiv zu sichern. Hierfür wurden verschiedene Methoden entwickelt, wie z.B. die nested-PCR, single-step PCR, real-time PCR (engl. für Echtzeit) oder die Loop-mediated Isothermal Amplification-Methode (LAMP, engl. für Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation).

Bei dem ersten PCR Assay, der zur Entdeckung von *P. knowlesi* entwickelt wurde, handelt es sich um einen nested-PCR Assay (engl. für verschachtelt), der die *knowlesi*-spezifischen Primer Pmk8 und Pmkr9 verwendet (2). Die Basenabfolge der Primer korrespondiert mit der Abfolge der Gene der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA (small-subunit ribosomal RNA, ssrRNA) von *P. knowlesi* (2). Allerdings stellte man fest, dass diese Primer zum Teil eine Kreuzreaktion mit *P. vivax* hervorrufen können. (35, 69, 70). Um diese Kreuzreaktion zu vermeiden, wurden neue Primer in Thailand (Primer PkF1140/1060 und PkR1550) (69) und in Malaysia (Primer Kn1f und Kn3r) (45) entwickelt, die ebenso die Gene der ssrRNA zum Ziel haben.

Weiterhin gibt es eine neue single-step PCR Methode, die zwar spezifisch ist für *P. knowlesi*, aber noch nicht ausreichend validiert wurde (71).

Eine Vielzahl von real-time PCR Methoden sind im Laufe der Zeit entstanden (72-75), wobei bisher nur eine davon mit einer signifikanten Anzahl an Patienten validiert wurde (73). Die Plasmodienspezies kann mit der real-time PCR schnell identifiziert werden, allerdings ist diese auch sehr kostspielig und somit in Entwicklungsländern nur schwer zur Diagnosestellung verfügbar (58).

Eine günstigere Methode stellt die LAMP dar, die ebenso schnell die Ziel-DNA amplifiziert unter isothermalen Bedingungen. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden entwickelt bei denen die DNA-Sequenz das Gen für β -Tubulin (76) oder das apikale membrane Antigen 1 (77) amplifiziert werden können.

1.7 Therapie

1.7.1 Therapie der unkomplizierten Malaria verursacht durch *P. knowlesi*

Die unkomplizierte Malaria verursacht durch *P. knowlesi* wird wie folgt therapiert (64):

- ist die Spezies unbekannt: Therapie wie bei *P. falciparum*
 - ➔ **Artemether-Lumefantrin** (Riamet[®])
- jede *P. malariae*-ähnliche Malaria in Waldgebieten sollte wie *P. knowlesi* behandelt werden
- Gebiet, in dem Parasiten Chloroquin-sensibel sind:
 - ➔ **Chloroquin** oder **Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT)**, engl. artemisinin-based combination, z.B. Artemether-Lumefantrin)
- Gebiet, in dem Parasiten Chloroquin-resistent sind [z.B. Südostasien (78)]:
 - ➔ **ACT**

1.7.2 Therapie der komplizierten Malaria verursacht durch *P. knowlesi*

Die komplizierte Malaria verursacht durch *P. knowlesi* wird wie eine komplizierte *P. falciparum*-Infektion therapiert (64):

- **Artesunat** i.v./i.m mind. 24 h, anschließend für 3 Tage **ACT** p.o.
- **Chinin i.v. in Kombination mit Doxycyclin bzw. Clindamycin**

P. knowlesi ist für folgende Malariamedikamente sensibel (64):

- Chloroquin
- Chinin
- Mefloquin (z.B. Lariam[®])
- Atovaquone-Proguanil (z.B. Malarone[®])
- Artemether-Lumefantrin (s.o.)
- Artesunat

2. Problemstellung und Zielsetzung

Die tatsächliche geographische Ausbreitung von *P. knowlesi* in Südostasien ist nach wie vor unbekannt, da oftmals die Mittel für die richtige Diagnosestellung fehlen. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit mit dem benignen *P. malariae* kann es zu einer Unterschätzung der Erkrankung kommen.

Bisher gibt es nur Anhaltspunkte, die dafür sprechen, dass der Parasit in einem sehr weitläufigen Gebiet in Südostasien zu finden sein könnte. Die Hinweise hierfür lieferte Moyes *et al.* in seiner Studie, die die geographische Verteilung des natürlichen Wirts von *P. knowlesi* und der Vektoren untersuchte (79). Dabei zeigte sich für Indonesien, dass das infektiöse Reservoir von *P. knowlesi* sowohl auf Borneo, als auch auf Nord Sulawesi vorhanden ist (s.Abb.7). Damit ist die Wahrscheinlichkeit von menschlichen Malariainfektionen mit *P. knowlesi* in diesen Regionen sehr groß und es sollte genauer untersucht werden, ob diese Infektionen tatsächlich vorhanden sind.

Ziel dieser Dissertation ist es, die Prävalenz von *P. knowlesi* mittels molekular-biologischer Methoden in Teilen von Indonesien zu bestimmen, das Bewusstsein für diese potenziell lebensbedrohliche Infektion zu schaffen und die Bevölkerung wie Gesundheitsbehörden weiter zu sensibilisieren.

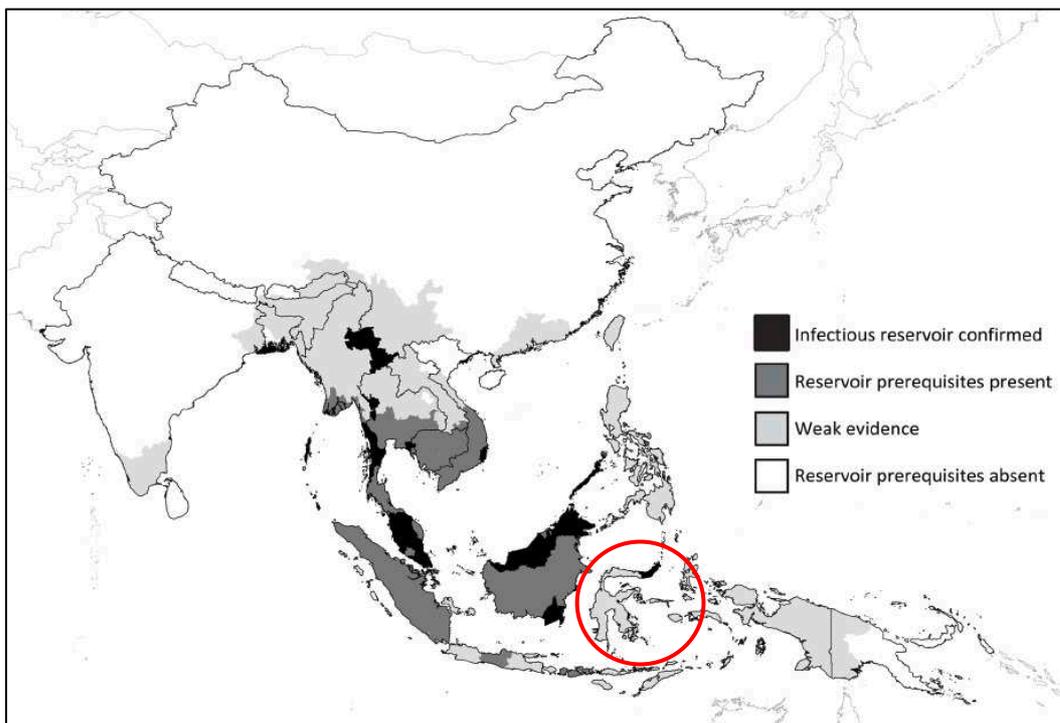


Abb. 7: Geographische Reichweite des *P. knowlesi* Reservoirs (Makaken und/oder Moskitovektor der *Anopheles leucospyhrus* Gruppe in Südostasien, aus (79). Der rote Kreis markiert Sulawesi, Indonesien.

3. Material und Methoden

3.1 Studienort und Probensammlung

In drei verschiedenen Gesundheitszentren (Budi Mulia Hospital/Bitung City, Primary Health Center/Tombatu, Kalooran Hospital/Amurang) um Manado (Nord Sulawesi, Indonesien) wurden Blutproben von Patienten während eines Zeitraums zwischen Oktober 2012 bis Oktober 2013 von einem Team aus Ärzten, Schwestern und Studenten unter Leitung von Dr. Josef Tuda gesammelt. Manado befindet sich in einer tropischen Klimazone (Koordinaten: 1° 30' N, 124° 50' O, 80m über NN) und hat zwei Jahreszeiten. Die größte Gefahr der Malariaübertragung durch Mücken tritt während der Regenzeit von November bis April auf, wohingegen das Übertragungsrisiko während der Trockenzeit von Mai bis Oktober geringer ist. Es gibt so gut wie keine Daten zur Prävalenz von Malaria in Sulawesi, aber es ist anzunehmen, dass die am häufigsten vorkommenden Formen der Malaria ebenso wie in ganz Indonesien Malaria tropica (*P. falciparum*) und Malaria tertiana (*P. vivax*) sind.



Abb. 8: Geographische Lage von Manado, aus (80).

Blutproben von Patienten, bei denen die Ärzte der Gesundheitszentren mikroskopisch eine Malaria festgestellt hatten, wurden bei Einverständnis der Patienten für die Studie gesammelt und zunächst bei +8°C für einen Zeitraum von 6-12 Monaten gelagert. Für weitere molekulare Untersuchungen wurden die Proben für den Transport nach Deutschland von mir im Oktober 2013 einen Monat lang vorbereitet. Hierfür wurden einzelne Blutstropfen (ca. 10-20 µl) auf Filterpapier (3 Tropfen/Papier) pipettiert und für 30 min. luftgetrocknet. Jedes Filterpapier wurde in DNA-freie wiederverschließbare Plastikbeutel verpackt und bei

Raumtemperatur bis und während des Transports gelagert. In München wurden die Proben schließlich bis zur Verarbeitung in einem Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

Der Ethikantrag wurde genehmigt von der Ethik-Kommission der Universität Brawijaya in Malang, Indonesien.

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Big Dye [®] -Terminatormix v3.1	Applied Biosystems [™] , Waltham, USA
Blue Juice 10x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter 100bp	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Quiagen, Hilden, Deutschland
DyeEx [™] 2.0 Spin Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
GelRed [™]	Biotium, Hayward, USA
HiDi [™] -Formamide	Applied Biosystems [™] , Waltham, USA
InstaGene [™] Matrix	BioRad, München, Deutschland
LiChroSolv [®]	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Quiagen, Hilden, Deutschland
TAE-Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TAE-Puffer light	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	Quiagen, Hilden, Deutschland
Oligonukleotide (Primer)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

3.2.2 Labormaterial

Bezeichnung	Firma
Filterpapier 3MM Chr	Whatman, Maidstone, England
Handschuhe Vasco [®] Basic	Braun [®] , Tuttlingen, Deutschland
Handschuhe Sempercare [®] nitrile	Sempermed [®] , Wien, Österreich
Tubes 0,2ml	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland

Mikro-Pipettenspitzen 0,5-20µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 0,2ml	Diamond Gilson, Middleton, USA
Ultrafree [®] -DA Zentrifugen-Filtereinheiten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.2.3 Geräte und Software

Bezeichnung	Firma
Basic Local Alignment Search Tool	Bethesda, USA
DNA/RNA UV-Cleaner	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Drucker LBP-800	Canon, Krefeld, Deutschland
Grabit [®] Annotating Graber	Synoptics Ltd. Cambridge, UK
Gelelektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Heraeus [™] Pico [™] Mikrozentrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Mini-Zentrifuge MCF-2360	LMS Co. Ltd., Tokyo, Japan
Mikrowelle 8017E	Privileg, Whirlpool Corporation, Benton Harbor, USA
MS2 Minishaker	IKA [®] , Staufen, Deutschland
Netzteil (Gelkammer) Power Pack 300	BioRad, München, Deutschland
Pipetten 10µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten 20µl, 200µl	Gilson, Middleton, USA
PC	UniEquip, Planegg, Deutschland
PCR-Thermocycler UNO II	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
PCR-Thermocycler Personal Cycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Sequenzierautomat ABI 3730	Applied Biosystems [®] , Foster City, USA
Thermomixer	Haep Labor Consult, Bovenden
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich [®] , Tuttlingen, Deutschland
Ultraviolett Transilluminator UT 1150207	UniEquip, Planegg, Deutschland
Vortex Assistent Reamix 2789	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Waage Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland

3.3 Methoden

3.3.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde die Chelex-Methode auf Basis von Walsh *et al.* angewendet (81). Dabei handelt es sich um eine schnelle und günstige Methode, die DNA von Proben zu isolieren. Chelex[®] 100 besteht aus Styrolharzen, die Chelatkomplexe mit Ionen wie Ca²⁺ oder Mg²⁺ bilden. Damit werden Enzyme wie DNasen inaktiviert, die sonst die freigesetzte DNA nach Erhitzen zerstören könnten.

Die Extraktion der DNA erfolgte nach dem Chelex-Protokoll von Kain *et al.* (82). Dabei wurden zunächst Blutstropfen aus dem Filterpapier ausgeschnitten (0,5-1 cm²) und einzeln in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eingebracht. 200 µl von InstaGene[™] Matrix (Chelex 5%, BioRad, München) wurden in jedes Gefäß pipettiert und gevortext. Nach Inkubation der Proben in einem Heizblock für 15 min. bei 100°C wurden die Proben für 3 min. bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Proben für weitere 3 min. bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand von ca. 80-100 µl wurde erneut abpipettiert und in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt. Die Proben konnten entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

3.3.2 DNA-Amplifikation mit nested PCR-Methode

Die PCR-Methode von Mullis *et al.* ist eine einfache *in vitro* Technik, um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen (83). Dazu werden die Proben in mehreren Durchläufen auf verschiedene Temperaturen in einem Thermocycler erhitzt. Das Prinzip lässt sich in drei Schritte gliedern und wie folgt beschreiben:

1. **Denaturierung** (Schmelzen): Bei ca. 94-96°C wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge getrennt.
2. **Primerhybridisierung**: Anlagerung der Primer komplementär zu den gesuchten DNA-Abschnitten bei einer Temperatur zwischen 50-60°C.
3. **Elongation**: Vervollständigung des DNA-Einzelstrangs zu einem Doppelstrang bei Temperaturen zwischen 68-72°C mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase welche Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) an den Primerkomplex aus Schritt 2 anlagert.

Durch die zyklische Wiederholung (30-50x) dieser drei Schritte werden die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell vermehrt.

Um die Spezifität der Reaktion zu steigern, wurde eine sogenannte nested-PCR angewendet. Dazu wurden zwei Amplifikationsschritte hintereinander durchgeführt mit verschiedenen Primern. Bei der ersten PCR entsteht ein größeres Amplikon, das als Vorlage für die zweite PCR dient. Somit werden unerwünschte Sequenzbereiche bereits im ersten Schritt eliminiert.

Tab. 1: Reaktionsansatz

NEST 1		
Reagenz	Einzelreakt. (µl)	Endkonzentration
H ₂ O	11,42 µl	
Primer Mix	0,5 µl	0,25 µM/primer
Puffer	2 µl	1x
dNTPs	1 µl	0,5 mM
Taq DNA-Polymerase	0,08 µl	0,4U
MgCl ₂	2 µl	
DNA-Probe	3 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

Der Reaktionsansatz für NEST 2 entspricht dem Ansatz von NEST 1 bis auf Zugabe von nur 1 µl der DNA-Probe (NEST 1-Produkt) und dafür aber 2 µl H₂O mehr (=13,42 µl).

Tab. 2: Reaktionsbedingungen

NEST 1		
Schritt 1	95°C	5 min
Schritt 2	94°C	1 min
Schritt 3	58°C	2 min
Schritt 4	72°C	2 min
Schritt 2-4 25x wiederholen		
Schritt 5	72°C	5 min
Schritt 6	8°C	Pause

Die Reaktionsbedingungen bei NEST 2 ähneln denen von NEST 1. Bei NEST 2 wurden die Schritte 2-4 jedoch 30x wiederholt. Außerdem änderte sich die Hybridisierungstemperatur in Schritt 3 je nachdem welche spezies-spezifischen Primer verwendet wurden. Jeder Primer besitzt ein bestimmtes Temperaturoptimum, bei der sich der Primer an den DNA-Strang anlagert (s. Tab. 3).

Tab. 3: Temperaturoptima der Primer

Primer	Temperaturoptimum
rFAL1/rFAL2 (<i>P. falciparum</i>)	58°C
rVIV1/rVIV2 (<i>P. vivax</i>)	58°C
Pmk8/r9 (<i>P. knowlesi</i>)	58°C
PkF1140/PkR1150 (<i>P. knowlesi</i>)	50°C
Kn1f/Kn3r (<i>P. knowlesi</i>)	62°C

Folgende Primer wurden für NEST 1 und NEST 2 verwendet:

Tab. 4: Primersequenzen

NEST 1	Primersequenz 5' → 3'	Basenpaare (bp)
rPLU1 rPLU5	- TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA - - CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC -	≈1670bp
rPLU5 rPLU6	- CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC - - TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG -	≈1200bp
NEST 2		
<u>P. falciparum</u>		
rFAL1 rFAL2	- TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT - - ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC -	205bp
<u>P. vivax</u>		
rVIV1 rVIV2	- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC - - ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA -	120bp
<u>P. knowlesi</u>		
Pmk8 Pmkr9	- GTT AGC GAG AGC CAC AAA AAA GCG AAT - - ACT CAA AGT AAC AAA ATC TTC CGT A -	153bp
Kn1f Kn3r	- CTC AAC ACG GGA AAA CTC ACT AGT TTA - - GTA TTA TTA GGT ACA AGG TAG CAG TAT GC -	290bp
PkF1140 PkR1550	- GAT TCA TCT ATT AAA AAT TTG CTT C - - TCT TTT CTC TCC GGA GAT TAG AAC TC -	410bp

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Technik zur Trennung und Identifizierung von DNA-Bruchstücken. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes und dem Transport geladener Teilchen werden die DNA-Stränge nach ihrer Größe getrennt. Die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern im Agarosegel durch den elektrischen Strom auf die positive Elektrode zu. Abhängig von der Größe wandern die DNA-Fragmente unterschiedlich schnell im Gel, je kleiner desto schneller. Somit erfolgt eine Auftrennung der Bruchstücke. Die Größe kann mittels einer DNA-Leiter (100bp) zur Längenmarkierung abgeschätzt werden.

Zur Herstellung der Gele wurden 2 g Agarosepulver mit 100 ml TAE Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) vermischt und solange in der Mikrowelle erhitzt, bis das Pulver sich

vollständig aufgelöst hat. Um die DNA-Banden später in einem UV-Transilluminator sichtbar zu machen, wurde GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) (1µl/10ml) als fluoreszierendes Färbemittel hinzugefügt, das mit der DNA interkaliert. Dafür musste die Gelflüssigkeit jedoch genügend abgekühlt sein. Das Gemisch wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer umgefüllt, in der sich das Gel festigte und mit Hilfe eines Kammes Taschen entstanden. Nach Aushärten des Gels wurde dieses mit TAE-Puffer bedeckt und die PCR-Produkte (10-14 µl) wurden in die Taschen eingefüllt. Zuvor wurden die Proben mit einem blauen Ladepuffer (Bromphenolblau, 3µl) versetzt, wodurch die Dichte der Lösung steigt und die Proben in die Taschen des Gels sinken und mit dem bloßen Auge bei Wanderung zu sehen sind. Schließlich folgte die Elektrophorese bei 80 mV für 45 Minuten.

3.3.4 DNA-Sequenzierung

Mit der DNA-Sequenzierung kann die Basenabfolge eines bestimmten DNA-Abschnitts bestimmt werden. Hierzu wurde die Kettenabbruch-Methode nach Sanger angewendet (84). Das Prinzip ist ähnlich wie bei der bereits beschriebenen PCR-Methode. Jedoch müssen zunächst vier verschiedene PCR-Ansätze für die gleiche Probe vorbereitet werden. Zu allen Ansätzen werden dNTPs hinzugefügt und zu jedem einzelnen Ansatz zusätzlich verschiedene Abbruchnukleotide (Didesoxynukleotide, ddNTPs). Beim Einbau eines dieser Nukleotide durch die DNA-Polymerase kommt es automatisch zum Abbruch der Elongation. Man erhält DNA-Fragmente in unterschiedlichen Längen, je nachdem wann das Abbruchnukleotid eingebaut wurde. In der Sequenzierung wird dieses letzte Nukleotid durch Fluoreszenzmarkierung abgelesen, Die Sequenzierung erfolgte mit dem Sequenzierautomat ABI 3730 im Helmholtz Zentrum in München, Deutschland.

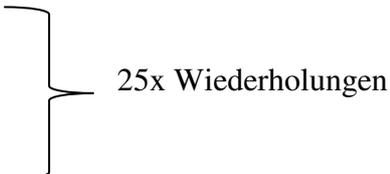
Vorher wurden die Proben von mir für die Sequenzierung in mehreren Schritten vorbereitet: Sequenziert wurden NEST 1- oder NEST 2-Produkte. Zu Beginn wurde ein 1,25%-Agarosegel hergestellt mit TAE-Puffer light, in dem die EDTA-Konzentration niedriger ist. Alle sichtbaren DNA-Banden wurden ausgeschnitten und in einzelnen Ultrafree®-DA Zentrifugen-Filtereinheiten für 10 min. bei 5000 rcf (engl. für relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung) geschleudert. Die Proben werden durch den Filter von Agarose gereinigt und man erhält die herausgelöste DNA. Nun wird der Reaktionsmix mit Big Dye®-Terminatormix v3.1 für das Cycle-Sequencing hergestellt, wobei als Probe die

herausgelöste DNA verwendet wird. Jede Sequenzierungsreaktion wird in zwei Ansätzen gemacht: eine mit dem Vorwärts-Primer und eine mit dem Rückwärts-Primer.

Der Reaktionsmix enthielt folgende Reagenzien:

- 2 μ l DNA
 - 1,5 μ l Sequenzierungspuffer
 - 1 μ l Primer (vorwärts oder rückwärts)
 - 0,5 ml Big Dye[®]-Terminatormix v3.1 (enthält ddNTPs)
-
- = 5 μ l

Das Cycler-Programm sah wie folgt aus:

- 96°C für 30 Sekunden (Denaturierung)
 - 50°C für 15 Sekunden (Hybridisierung)
 - 60°C für 4 Minuten (Elongation)
- 
- 25x Wiederholungen

Anschließend werden die Produkte der Sequenzierungsreaktionen mit dem DyeEx[™] 2.0 Spin Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Hierbei werden überflüssige Moleküle wie z.B. restliche ddNTPs, Primer und die DNA-Polymerase entfernt, wodurch nur noch die reine DNA übrig bleibt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Ethanol ausgefällt. Zum Schluss wurde die getrocknete DNA mit 13 μ l LiChroSolv[®] (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eluiert und 12 μ l HiDi[™]-Formamide zur Denaturierung hinzugefügt. Dieser Mix von 25 μ l jeder einzelnen Probe wurde in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und an das Helmholtz Zentrum in München, Deutschland, geschickt. Für die Sequenzähnlichkeits-suche wurde das „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) verwendet (85).

4. Ergebnisse

4.1 Speziesdifferenzierung

249 Proben wurden mit den vorher genannten Methoden analysiert. Die Proben testete man auf die am häufigsten vorkommenden Malariaerreger in Indonesien *P. falciparum* und *P. vivax* sowie *P. knowlesi*. Unter Verwendung der Primer FAL1/FAL2 für *P. falciparum*, VIV1/VIV2 für *P. vivax* und Pmk8/r9 als unspezifische Suchprimer für *P. knowlesi* wurden mit der beschriebenen nested PCR-Methode die nachfolgenden Ergebnisse ermittelt.

Nach der Gelelektrophorese zeigten sich im UV-Transilluminator auf Höhe von 205 bp die Banden für *P. falciparum* und auf Höhe von 120 bp die Bande für *P. vivax*. Waren keine Banden sichtbar, wurden die Proben als negativ für die getestete Spezies gewertet,

Für ein positives Ergebnis für *P. knowlesi* sollte bei Verwendung der Primer Pmk8/r9 eine Bande auf Höhe von 153 bp zu sehen sein. Bei insgesamt 27 Proben zeigte sich jedoch eine Bande auf Höhe von ca. 200 bp. Diese Proben wurden zunächst als fraglich positive *P. knowlesi*-Infektionen eingestuft.

Insgesamt konnten 195 (78.3%) Proben malaria-positiv getestet werden. 54 (21.7%) Proben zeigten ein negatives Ergebnis nach Auswertung der PCR.

154 (79.0%) von den 195 positiven Proben stufte man als Monoinfektion ein.

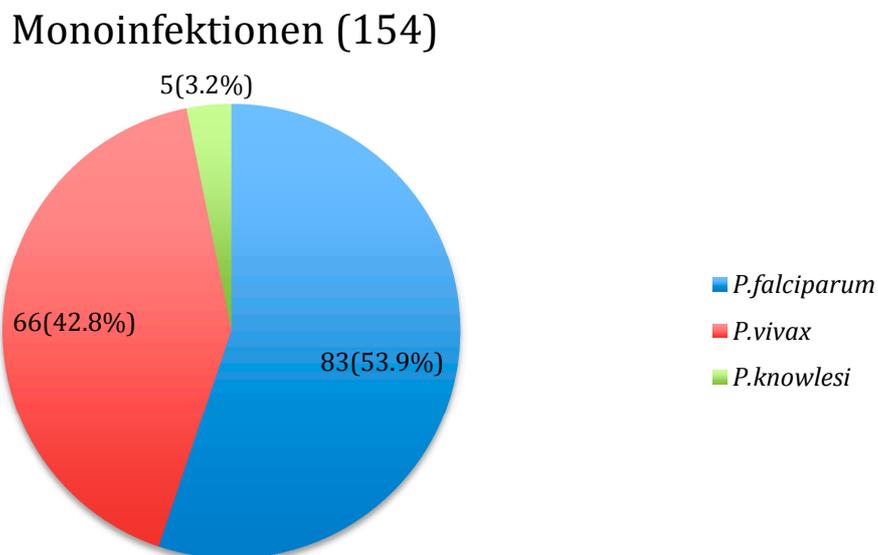


Abb. 9: Verteilung der Häufigkeit von *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. knowlesi* in 154 Monoinfektionen unter Verwendung der Primer FAL1/FAL2, VIV1/2 und Pmk8/r9

Bei 41/195 (21.0%) Proben wurden Mischinfektionen mit entweder zwei oder drei verschiedenen *Plasmodien spp.* festgestellt.

Mischinfektionen (41)

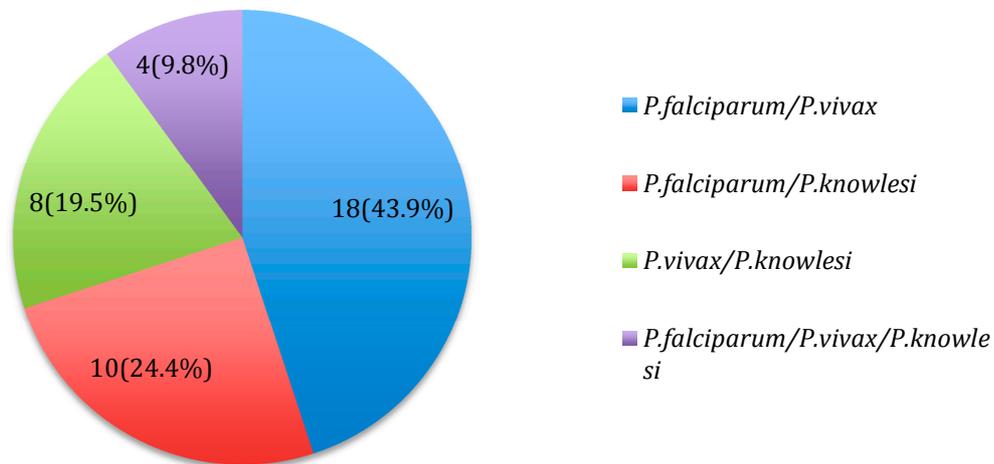


Abb. 10: Verteilung der Häufigkeit von *P.falciparum*, *P.vivax* und *P.knowlesi* in 41 Mischinfektionen unter Verwendung der Primer FAL1/FAL2, VIV1/2 und Pmk8/r9

Die gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 4 (s.u.) zusammengefasst.

Tab. 5: Zahl der identifizierten Infektionen mit *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. knowlesi* in Nord Sulawesi, Indonesien.

Form der Infektion	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.knowlesi</i> (Pmk8/r9)
	N (%)	N (%)	N (%)
Monoinfektion(154)	83/154 (53.9)	66/154 (42.8)	5/154 (3.2)
Mischinfektion(41)			
Pf/Pv	18/41 (43.9)	18/41 (43.9)	-
Pf/Pk	10/41 (24.4)	-	10/41 (24.4)
Pv/Pk	-	8/41 (19.5)	8/41(19.5)
Pf/Pv/Pk	4/41 (9.8)	4/41 (9.8)	4/41 (9.8)
Gesamt	115/195 (59.0)	96/195 (49.2)	27/195 (13.8)

Abkürzungen: Pf=*Plasmodium falciparum*, Pv=*Plasmodium vivax*, Pk=*Plasmodium knowlesi*

4.2 Ergebnisse der Gelelektrophorese

4.2.1 Beispiel für positive Ergebnisse von *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. knowlesi* (Pmk8/r9)

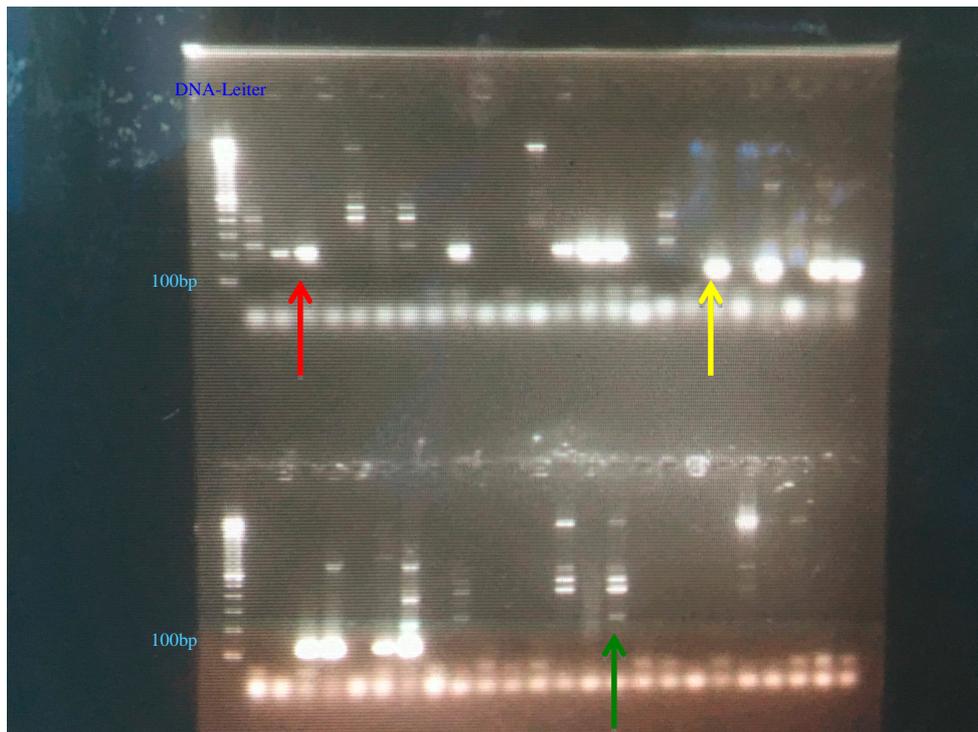


Abb. 11: Ergebnis für *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. knowlesi*. Der rote Pfeil markiert ein positives Ergebnis für *P. falciparum* auf Höhe von 205bp, der gelbe für *P. vivax* auf Höhe von 120bp und grün für *P. knowlesi* auf Höhe von ca. 200bp mit den Primern Pmk8/r9.

4.2.2 Ergebnisse der fraglich *knowlesi*-positiven Proben mit verschiedenen Primern

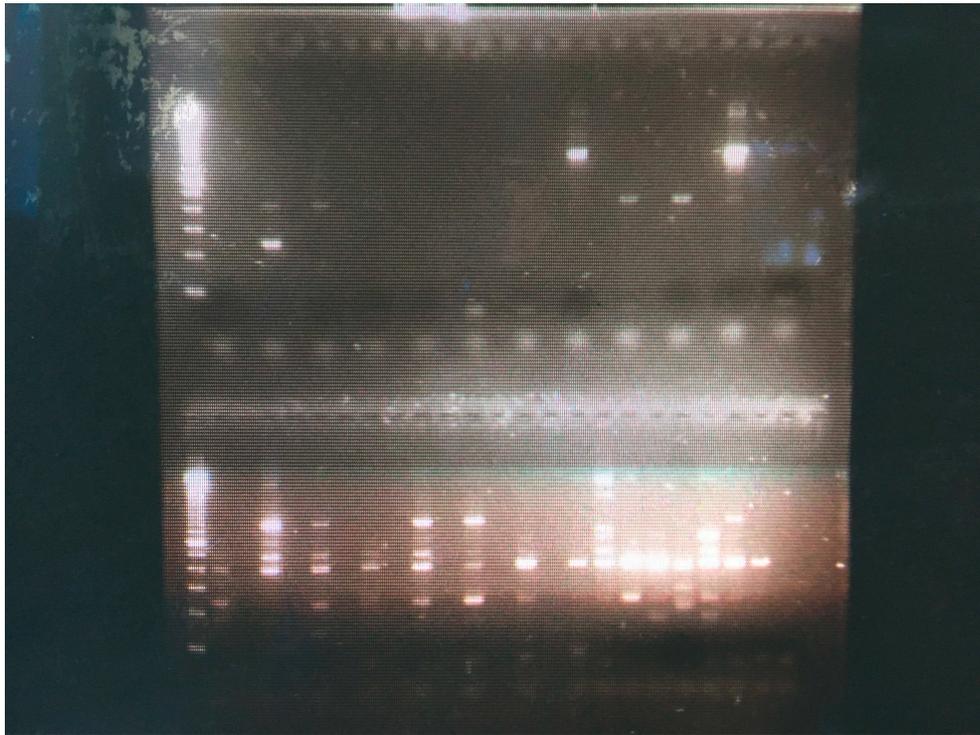


Abb. 12: Ergebnis der 27 Proben mit den Primern Pmk8/r9



Abb. 12: Ergebnis der 27 Proben mit den Primern Pk1140/Pkr1150 auf Höhe von 410bp

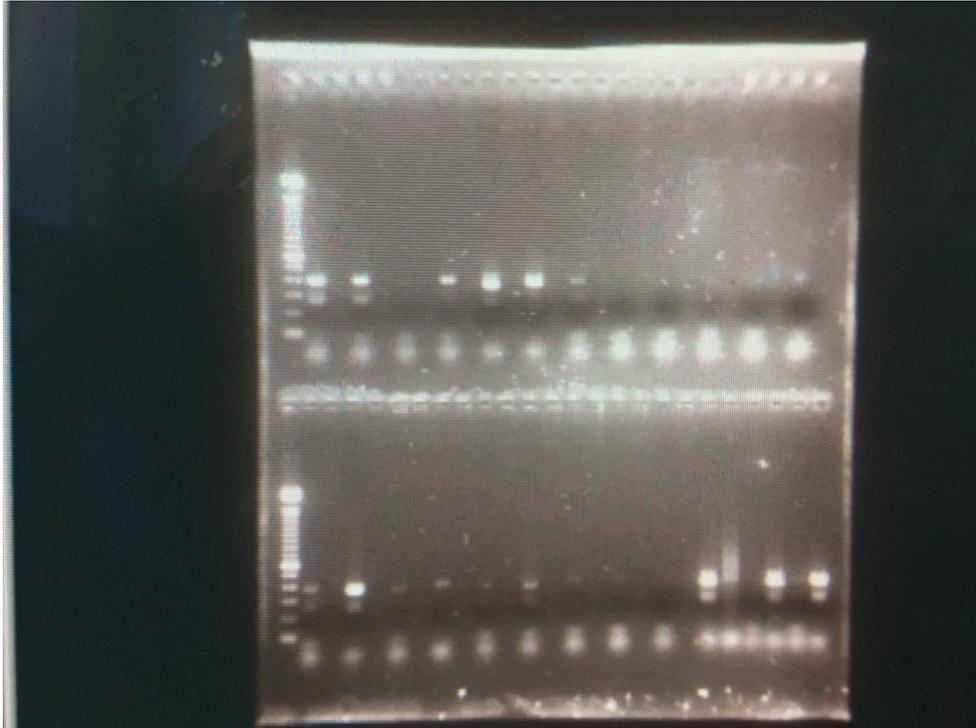


Abb. 14: Ergebnis der 27 Proben mit den Primern Kn1f/Kn3r auf Höhe von 290bp

4.2 Untersuchung der fraglich *knowlesi*-positiven Proben

Es wurden 27 Proben erneut getestet, die unter Verwendung der unspezifischen Suchprimer Pmk8/r9 ein fraglich positives Ergebnis für *P. knowlesi* zeigten. Hierfür verwendete man die Primer PkF1140/PkR1150 und Kn1f/Kn3r.

Bei der PCR mit den Primern PkF1140/PkR1150 ergab die Untersuchung für 14/27 (51.9%) Proben ein positives Ergebnis für *P. knowlesi*, bei Verwendung von Kn1f/Kn3r waren 10/27 (37.0%) positiv. 6/27 (22.2%) Proben blieben bei diesen Primern negativ.

Darunter waren 11/27 (37.0%) Proben positiv mit den Primern Pmk8/r9 und PkF1140/PkR1150, 7/27 (25.9%) Proben positiv mit den Primern Pmk8/r9 und Kn1f/Kn3r und 3/27 (11.1%) Proben waren mit allen drei *knowlesi*-Primern positiv.

Insgesamt sind 10/27 (37.0%) Proben Mischinfektionen mit *P. falciparum* und *P. knowlesi*, 8/27 (29.6%) mit *P. vivax* und *P. knowlesi* und 4/27 (14.8%) sind Mischinfektionen mit *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. knowlesi*.

Die Ergebnisse dieser Proben sind in Tabelle 6 aufgelistet (s.u.).

	ID	Falciparum	Vivax	Knowlesi (Pmk8/Pmkr9)	Knowlesi (PkF1140/PkR1150)	Knowlesi (Kn1f/Kn3R)
1	110	1	0	1	0	1
2	118	0	1	1	1	0
3	125	1	0	1	1	1
4	126	0	1	1	1	1
5	128	1	0	1	0	1
6	146	0	1	1	1	0
7	179	1	0	1	0	1
8	181	0	1	1	1	0
9	211	0	0	1	0	0
10	213	0	0	1	1	0
11	227	0	1	1	1	0
12	229	1	1	1	1	0
13	216	0	0	1	0	0
14	220	0	1	1	1	1
15	222	0	1	1	1	0
16	233	1	0	1	1	0
17	241	1	1	1	1	0
18	245	1	1	1	1	0
19	251	1	1	1	0	0
20	254	1	0	1	0	1
21	255	1	0	1	0	1
22	267	1	0	1	0	0
23	268	0	0	1	0	0
24	269	0	0	1	0	0
25	270	1	0	1	0	1
26	283	0	1	1	1	0
27	284	1	0	1	0	1
n		14	12	27	14	10

Tab. 6: Ergebnisse der 27 fraglich *knowlesi*-positiven Proben unter Verwendung verschiedener Primer, 0=negativ, 1=positiv. In blau positive Proben mit Pmk8/Pmkr9 und PkF1140/PkR1150 (7); in grün positive Proben mit Pmk8/Pmkr9 und Kn1f/Kn3R (11); in rot positive Proben mit Pmk8/Pmkr9, PkF1140/PkR1150 und Kn1f/Kn3R (3); in schwarz positive Proben nur mit pmk8/pmkr9 (6).

Somit ergeben sich folgende Ergebnisse für *P. knowlesi* Infektionen unter Verwendung verschiedener Primer (Tab. 7):

Tab 7. Zahl der identifizierten Infektionen mit *P. knowlesi* unter Verwendung verschiedener Primer

Form der Infektion	<i>P. knowlesi</i> (Pmk8/r9)	<i>P. knowlesi</i> (1140/1150)	<i>P. knowlesi</i> (Kn1f/Kn3r)
	N (%)	N (%)	N (%)
Monoinfektion(154)	5/154 (3.2)	1/154 (0.6)	0/154 (0.0)
Mischinfektion(41)			
Pf/Pk	10/41 (24.4)	2/41 (4.9)	8/41 (19,5)
Pv/Pk	8/41(19.5)	8/41 (19.5)	2/41(4.9)
Pf/Pv/Pk	4/41 (9.8)	3/41 (7.3)	0/41 (0.0)
Gesamt	27/195 (13.8)	14/195 (7.2)	10/195 (5.1)

Abkürzungen: Pf=*Plasmodium falciparum*, Pv=*Plasmodium vivax*, Pk=*Plasmodium knowlesi*

Da die Primer Pmk8/r9 nur als unspezifische Suchprimer dienten, wurden die Ergebnisse mit diesen Primern nicht in den Endergebnissen berücksichtigt.

4.3 Ergebnisse der Sequenzierung

10 Proben, die sowohl bei Verwendung der Primer Pmk8/r9 als auch bei den Primern Kn1f/Kn3r positiv für *P. knowlesi* waren, wurden für die Sequenzierung mit der bereits beschriebenen Methode vorbereitet und ausgewertet. Dabei verwendete man die Primer Kn1f/Kn3r.

In der Sequenzierung konnten allerdings keinerlei Gensequenzen nachgewiesen werden und somit keiner bestimmten *Plasmodien spp.* zugewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren keine weiteren Mittel und Kapazitäten für weitere Diagnostik vorhanden, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Tab. 8: Ergebnisse der 10 Proben, die sequenziert wurden.

	ID	Extraktionsdatum	Pf	Pv	Pk(pmk8/pmkr9)	Pk(Kn1f/Kn3r)	Sequenzierung
1	110	09.01.14	1	0	1	1	-
2	125	15.01.14	1	0	1	1	-
3	126	15.01.14	0	1	1	1	-
4	128	15.01.14	1	0	1	1	-
5	179	25.01.14	1	0	1	1	-
6	220	28.11.14	0	1	1	1	-
7	254	30.01.14	1	0	1	1	-
8	255	30.01.14	1	0	1	1	-
9	270	03.02.14	1	0	1	1	-
10	284	03.02.14	1	0	1	1	-

Abkürzungen: Pf=*Plasmodium falciparum*, Pv=*Plasmodium vivax*, Pk=*Plasmodium knowlesi*

4.4 Bestimmung der Prävalenz der *Plasmodien spp.*

Für 195 malaria-positive Proben aus Nord Sulawesi, Indonesien, ergibt sich somit eine Prävalenz für *P. falciparum* von 59.5% und 49.2% für *P. vivax* (Mono- und Mischinfektionen). Die Prävalenz von *P. knowlesi* betrug in diesen Proben zwischen 5.1 % (Kn1f/Kn3r) über 7.2% (PkF1140/PkR1150) bis 10,8% (mit einem der beiden Primer positiv)..

5. Diskussion

5.1 Mikroskopie im Vergleich zu molekulare Diagnostik

Die Mikroskopie ist der Goldstandard in der Malariadiagnostik aufgrund der schnellen Verfügbarkeit und der geringen Kosten. Diese Diagnostik ist jedoch stark abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und der Qualität der Färbung des Blutausstrichs. So stellte man in einer Studie aus Südafrika fest, dass eine große Differenz der Ergebnisse von unterschiedlichen Untersuchern bei sonst gleichen Rahmenbedingungen vorlag (86). Auch in dieser Studie konnten von 249 Proben, die mikroskopisch als malaria-positiv eingestuft wurden, bei nur 195 (78,3%) Proben die Diagnose mittels PCR bestätigt werden. Allerdings muss hier daraufhin gewiesen werden, dass die Lagerung der Proben nicht optimal war. DNA auf Filterpapier ist sogar bei Raumtemperatur über viele Jahre stabil, ebenso extrahierte eingefrorene DNS. Jedoch die unterschiedlich lange Lagerung des Vollblutes bei +8°C vor Pipettierung auf Filterpapier kann zu einem DNA-Verlust geführt haben. Dieses Problem ist auf alle weiteren Ergebnisse zu beziehen.

Zur Entdeckung von Plasmodien ist der dicke Tropfen 20-40 mal sensitiver als der dünne Blutausstrich, wobei 10-50 Trophozoiten/ μ l Blut vorliegen müssen, damit diese mikroskopisch erkannt werden können (87). Mischinfektionen und niedrige Parasitämien können somit leicht übersehen werden. Snounou *et al.* entwickelte 1993 die PCR-Methode mit einer sehr hohen Sensitivität bei der die Malariainfektion bereits bei 1-10 Parasiten/ μ l Blut nachgewiesen werden kann (88, 89). Noch sensitiver mit 6 Parasiten/ μ l Blut ist die sogenannte nested PCR-Methode, die 1999 von Singh *et al.* beschrieben wurde (90). Diese Methode beinhaltet zwei PCRs, bei der in der ersten PCR (NEST 1) zunächst artspezifische Primer verwendet werden. Die PCR-Produkte aus NEST 1 werden anschließend für die zweite PCR (NEST 2) benutzt, die hierbei mit speziesspezifischen Primern amplifiziert werden.

Bezogen auf die Diagnostik von *P. knowlesi*, hat die PCR-Methode einen besonders hohen Stellenwert. In Sarawak, malaysisches Borneo, wurden fast 1/5 aller Malariafälle 1999 mikroskopisch als *P. malariae* Infektion klassifiziert (2). Entgegen des normalerweise harmlosen klinischen Verlaufs zeigten sich bei fast allen Fällen (97,4% von 108) schwerwiegende Symptome, und es konnten teilweise bei einigen Patienten [20 (18,5%) von 108] Parasitämien mit mehr als 5000 μ l/ Blut festgestellt werden (2). Aufgrund dieser Auffälligkeiten untersuchten Singh *et al.* 208 gesammelte malaria-

positive Proben aus diesem Gebiet mittels PCR-Methode genauer (2). Dabei wurden 120 (57,7%) *P. knowlesi* Infektionen festgestellt. Bei 106 Proben handelte es sich um eine Monoinfektion, wobei davon 101 (97,1%) Proben aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten von *P. knowlesi* zu anderen *Plasmodien spp.* mikroskopisch als *P. malariae*, drei Proben als *P. falciparum* und zwei Proben als *P. vivax* Infektion fälschlicherweise identifiziert wurden (2).

5.2 Untersuchung der fraglich *knowlesi*-positiven Proben

Die ribosomale RNA (rRNA) einer Spezies kann zur Untersuchung von verwandtschaftlichen Beziehungen verwendet werden, die anschließend in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt werden können. Diese Methode hat sich auch bei der Untersuchung phylogenetischer Stammbäume bei *Plasmodien spp.* seit langem bewährt (91, 92).

Generell lassen sich die von der RNA codierten ribosomalen Proteine in eine große und in eine kleine Untereinheit unterteilen. Dabei zeigte sich, dass viele *Plasmodien spp.* zwei bis drei verschiedene Gene für die kleine Untereinheit (small-subunit rRNA, ssrRNA) besitzen, die unterschiedlich exprimiert werden - abhängig von der Phase des Lebenszyklus der Plasmodien (91). Für die Identifizierung von *P. knowlesi* entwickelten Singh *et al.* Primer (Pmk8/Pmkr9), die die Gensequenz der 18S-ssrRNA-S zum Ziel haben, die während der sexuellen Stadien der Plasmodien exprimiert werden (2, 69). Bei der Gelelektrophorese erscheint bei einer positiven Probe für *P. knowlesi* eine Bande in Höhe von 153 bp (2).

Unter Verwendung dieser Primer zeigte sich in dieser Studie für die 195 malaria-positiven Proben bei 27 Proben zwar keine Bande auf Höhe von 153 bp, allerdings bei ca. 200 bp. Damit konnte für diese Proben zunächst weder eine *P. knowlesi*-Infektion weder bestätigt noch verworfen werden.

Für die Primer Pmk8/Pmkr9 wurde 2009 von Imwong *et al.* beschrieben, dass falsch-positive Ergebnisse für *P. knowlesi* unter Verwendung dieser Primer beobachtet wurden, die auf stochastische Kreuzreaktionen mit *P. vivax* zurückzuführen seien (69). Man fand heraus, dass die Basenabfolge der ssrRNA-S von *P. vivax* bis auf eine Base fast identisch ist mit der Basenabfolge des Rückwärts-Primers Pmkr9 (69). Der Vorwärts-Primer Pmk8 unterschied sich etwas mehr von der Gensequenz von *P. vivax*, zeigte

jedoch auch Ähnlichkeiten (69). Es wurden daraufhin die neuen Primer PkF1140/PkR1150 entwickelt, die korrespondierend zur Basenabfolge der Gene der 18S-ssrRNA-A von *P. knowlesi* sind, die während der asexuellen Stadien der Plasmodien exprimiert werden (69). Bei einem positiven Ergebnis zeigt sich mit diesen Primern bei der Gelelektrophorese eine Bande auf Höhe von 410 bp (69).

12 Proben unter diesen 27 fraglichen Proben waren positiv für *P. vivax* mit den Primern VIV1/VIV2 (s. Tab.5). Womöglich handelte es sich hierbei ebenso um falsch-positive Ergebnisse für *P. knowlesi* mit den Primern Pmk8/Pmkr9. Aufgrund dieser Unklarheiten wurden diese 27 Proben erneut mit den Primern PkF1140/PkR1150 getestet. Diesmal zeigte sich nur für 14 Proben eine Bande in Höhe von 410 bp und zeigte damit eine *P. knowlesi* Infektion an. 11 Proben unter diesen 14 Proben waren auch positiv für *P. vivax*. Kreuzreaktionen von *P. vivax* bei diesen Primern sind jedoch noch nicht beschrieben worden.

Um diese Ergebnisse für *P. knowlesi* zu bestätigen, wurden die 27 Proben ein weiteres Mal mit den spezies-spezifischen Primern Kn1f/Kn3r getestet. Diese Primer wurden in Malaysia entwickelt und sind ebenso komplementär zur Basenabfolge der ssrRNA (45). In der Gelelektrophorese erscheint auf Höhe von 290 bp eine Bande bei einem positiven Ergebnis für *P. knowlesi* (45). Bei Verwendung dieser Primer zeigte sich unter diesen 27 Proben bei nur 10 Proben ein positives Ergebnis für *P. knowlesi*.

Diese 10 Proben wurden für die Sequenzierung mit den Primern Kn1f/Kn3r vorbereitet und die Basenabfolge der Amplifikate wurde mit der bekannten Basenabfolge der ssrRNA von *P. knowlesi* verglichen. Die Sequenzierung ergab kein positives Ergebnis für keinerlei der *Plasmodien spp.*

5.3 Mögliche Ursachen für unklare Ergebnisse

Grund für die unklaren Ergebnisse könnte sein, dass entweder keine DNA (mehr) oder zu wenig DNA von *P. knowlesi* in den Proben vorhanden war. Abgesehen von einer ursprünglichen Absenz des Parasiten, ist, wie bereits oben angesprochen, ein DNA-Verlust aufgrund der Lagerung der Proben höchst wahrscheinlich. Dies ist bei so genannten „community-acquired samples“ oft der Fall. Eine Amplifikation führt zu einem positiven Ergebnis, bei Wiederholung ergibt sich ein negatives Ergebnis und umgekehrt, da der DNA-Gehalt zu gering ist, um konstante Ergebnisse zu erzielen. Dies

erklärt auch in den PCRs divergierende Ergebnisse. Aufgrund der nicht zu erwartenden Bandenlänge mit pmk8/pmkr9 berücksichtigten wir die Ergebnisse nicht weiter. Für die anderen beiden *knowlesi*-spezifischen PCRs gilt jedoch, dass die Probe als PCR-positiv gilt, sofern eine der beiden PCRs positiv wurde.

Des Weiteren kommt hinzu, dass fast alle *P. knowlesi* positiven Proben Mischinfektionen waren. Bei Mischinfektionen sind die Parasitämien der einzelnen Plasmodienarten oft sehr niedrig und ein Nachweis dieser erschwert.

Es kommen jedoch auch genetische Polymorphismen als mögliche Ursache in Frage. Dieses Problem kam bereits bei der Diagnostik von *P. ovale* vor. So konnten mikroskopisch nachgewiesene *P. ovale* Infektionen mittels PCR unter Verwendung der komplementären Primer zur *ssrRNA* nicht bestätigt werden (93). Ursache hierfür sind zwei verschiedene Sequenzvariationen in der 18S-*ssrRNA* von *P. ovale*, die bereits 1996 entdeckt wurden (94). Die Sequenzvariationen beschränken sich allerdings nicht nur auf eine klassische und eine Variante der *ssrRNA* von *P. ovale*, sondern auch auf andere Gene von *P. ovale*, wie z.B. das mitochondriale Gen Cytochrom b (95). Sutherland *et al.* konnten nachweisen, dass es sich nicht nur um Dimorphismen bei *P. ovale* handelt, sondern um zwei verschiedene Spezies, die *P. ovale curtisi* und *P. ovale wallikeri* benannt wurden (7).

Für *P. knowlesi* wurden ebenso bereits Dimorphismen festgestellt. Man fand in Malaysia bei *P. knowlesi* Sequenzvariationen in dem Gen für das normozytäre Bindeprotein xa (*Pknbpxa*) auf Chromosom 14, die sich auf der gesamten Gensequenz nachweisen lassen (96). Weitere Untersuchungen diesbezüglich zeigten, dass mehr als die Hälfte des Genoms von *P. knowlesi* dimorph war und betraf Gene auf allen Chromosomen (96). Dies führte zu der Annahme, dass zwei verschiedene Typen von *P. knowlesi* die Menschen in Sarawak, malaysisches Borneo, infizieren (96). 2015 wurde in einer Studie von Divis *et al.* das Genom von 599 *P. knowlesi* Proben aus Malaysia mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern untersucht, wobei die stark unterschiedlichen Subpopulationen von *P. knowlesi* bestätigt wurden (97). Nur ein Typ der zwei Subpopulationen kommt entweder in Langschwanzmakaken oder Schweinsaffen vor (97). Des Weiteren wurden signifikante genetische Unterschiede zwischen den Subpopulationen beobachtet, die mit der geographischen Distanz korrelieren. In einer weiteren Studie aus Malaysia wurde kürzlich sogar eine dritte Subpopulation von *P. knowlesi* entdeckt (98).

Prinzipiell ist diese Annahme ebenso auf einen indonesischen *P. knowlesi* Erreger auf Sulawesi übertragbar, besonders da zwischen Sulawesi und Borneo die sogenannte Wallace-Linie verläuft, eine biogeographische Trennlinie zwischen asiatischer und australischer Flora und Fauna. Man ging davon aus, dass die Affenmalaria nur westlich der Wallace-Linie zu finden sei (99). Doch *P. inui*, ein weiterer Parasit der Affenmalaria, wurde 1962 in einem Affen aus Sulawesi, Indonesien, gefunden und bestätigte damit, dass die Affenmalaria auch östlich der Wallace-Linie zu finden ist (100).

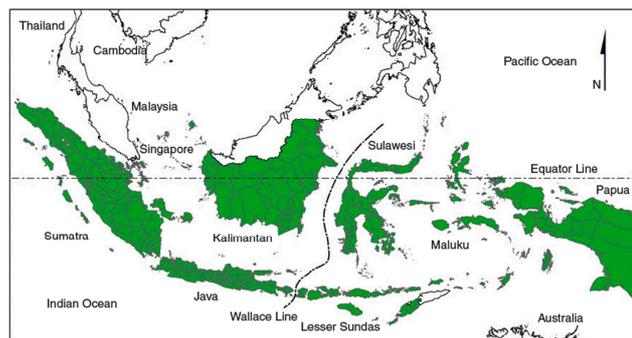


Abb. 15: Verlauf der Wallace-Linie zwischen Kalimantan (=Borneo) und Sulawesi, aus (101).

Insbesondere aufgrund dieser Besonderheiten wäre eine Sequenzierung der Proben sehr interessant gewesen. Leider ist uns diese nicht gelungen. Eigens für die Sequenzierung der indonesische Proben neue spezifischere Primer zu konzipieren, ist ein langwieriges schwieriges Unterfangen, welches den Rahmen der Doktorarbeit gesprengt hätte.

Der letztendliche Beweis durch Sequenzierung steht aus.

5.4 Ausblick

Da die verwendeten PCRs ein Vorkommen von *P.knowlesi* auf Sulawesi vermuten lassen, der letzte Beweis durch Sequenzierung der Proben jedoch fehlt, sollten diesbezüglich weitere Studien durchgeführt werden. Zu beachten ist, dass genetische Polymorphismen vorhanden sein könnten, welche die Identifikation des Erregers erschweren. Die Bestimmung der Prävalenz von *P. knowlesi* in allen malaria-endemischen Gebieten in Indonesien sollte angestrebt werden, um die Bevölkerung sowie Gesundheitsbehörden für diesen Erreger sensibilisieren zu können.

6. Zusammenfassung

Plasmodium knowlesi ist ein einzelliger Parasit, der vor allem in Südostasien vorkommt und als Erreger der Affenmalaria bekannt ist. Als natürlicher Wirt wurden u.a. Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) sowie südliche Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) identifiziert. Seit kurzem ist *P. knowlesi* als fünfter humanpathogener Erreger der Malaria anerkannt, der insbesondere im malaysischen Borneo Malariainfektionen beim Menschen verursacht. Die Übertragung von Tier-zu-Tier sowie von Tier-zu-Mensch erfolgt über Mücken der *Anopheles leucosphyrus*-Gruppe. Berichte über Infektionen beim Menschen umfassen milde bis hin zu fulminante Verläufe, die zum Tode führten. Charakteristisch für eine Infektion mit *P. knowlesi* sind tägliche Fieberschübe, die mit dem 24 h asexuellen Reproduktionszyklus des Erregers zusammenhängen. Des Weiteren lassen sich hohe Parasitämien im Blut der Patienten feststellen, die mit dem Schweregrad der Infektion korrelieren. Die gängige mikroskopische Diagnosesicherung ist aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten zu *P. falciparum* sowie *P. malariae* unzureichend und sollte mit molekularer Diagnostik mittels PCR ergänzt werden. Da jedoch diese Methoden in vielen Ländern Südostasiens aus Kostengründen nicht vorhanden sind, wird oftmals eine *knowlesi* Infektion nicht erkannt. Aufgrund der mangelnden Identifikation einer *knowlesi* Malaria beim Menschen ist die Prävalenz des Erregers in Südostasien nach wie vor unbekannt.

In Indonesien wurde bisher von *P. knowlesi* Infektionen auf Kalimantan, indonesisches Borneo, berichtet. Das infektiöse Reservoir von *P. knowlesi* (Langschwanzmakaken/Mücken der *Anopheles leucosphyrus*-Gruppe) wurde jedoch in weiteren Teilen Indonesiens bestätigt, u.a. Nord Sulawesi, so dass man davon ausgehen kann, dass dort ebenso Malariainfektionen mit *P. knowlesi* beim Menschen vorkommen. In dieser Studie soll die Prävalenz von *P. knowlesi* in Nord Sulawesi, Indonesien, bestimmt werden.

Bei der Speziesdifferenzierung mittels PCR zeigte sich bei 195 malaria-positiven Proben aus Manado, Nord Sulawesi, eine Prävalenz von 59,5% für *P. falciparum* und 49,2% für *P. vivax*. Unter Verwendung unterschiedlicher Primer betrug die Prävalenz für *P. knowlesi* 10,8% in den gesammelten Proben. Die Sequenzierung dieser Proben ergab kein eindeutiges Ergebnis.

Die unklaren Ergebnisse könnten mit genetischen Polymorphismen bei *P. knowlesi* begründet werden, die die Identifizierung des Erregers erschweren. Dabei stützt sich diese These auf bereits vorhandene Studien, in denen genetische Polymorphismen bei *P. knowlesi* sowie drei Subpopulationen des Erregers bestätigt wurden.

Das Vorhandensein von *P. knowlesi* im Menschen in Nord-Sulawesi kann durch diese Studie angenommen werden, wenngleich der letzte Beweis durch Sequenzierung fehlt. Weitere Studien diesbezüglich sollten veranlasst werden, um mögliche molekulare Polymorphismen zu detektieren. Erst wenn die Prävalenz des Erregers in Indonesien möglichst genau bestimmt werden kann, ist es möglich die Bevölkerung sowie die zuständigen Gesundheitsbehörden für diesen Erreger zu sensibilisieren und im Falle einer Infektion eine leitliniengerechte Behandlung mit einer Artemisinin-basierten Kombinationstherapie einzuleiten.

7. Literaturverzeichnis

1. World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
2. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *The Lancet*. 2004;363(9414):1017-24.
3. White N. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clinical infectious diseases*. 2008;46(2):172-3.
4. Cox-Singh J, Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends in parasitology*. 2008;24(9):406-10.
5. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The primate malarias. *The primate malarias*. 1971.
6. Wharton R, Eyles DE. Anopheles hackeri, a vector of Plasmodium knowlesi in Malaya. *Science (New York, NY)*. 1961;134(3474):279-80.
7. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally. *J Infect Dis*. 2010;201(10):1544-50.
8. Knowles R, Gupta B. A Study of Monkey-Malaria, and its Experimental Transmission to Man.(A Preliminary Report.). *Indian Medical Gazette*. 1932;67(6):301-20.
9. Knowles R. Monkey Malaria. *British Medical Journal*. 1935;2(3907):1020-.
10. Napier LE, Campbell H. Observations on a Plasmodium Infection which causes Haemoglobinuria in Certain Species of Monkey. *Indian Medical Gazette*. 1932;67(5):246-9.
11. Sinton J, Mulligan H. A Critical Review of the Literature relating to the Identification of the Malarial Parasites recorded from Monkeys of the Families Cercopithecidae and Colobidae. *Records of the Malaria Survey of India*. 1933;3(3):381-444.
12. Sinton J, Mulligan H. A Critical Review of the Literature relating to the Identification of the Malarial Parasites recorded from Monkeys of the Families Cercopithecidae and Colobidae. *Records of the Malaria Survey of India*. 1932;3(2):357-80.
13. Wagner-Jauregg J. Über die Einwirkung der Malaria auf die progressive Paralyse. *Psychiatr Neurol Wochenschr*. 1918;20:132-4.

14. Shute P. Thirty years of malaria-therapy. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1958;61(3):57-61.
15. van Rooyen CE, Pile GR. Observations on infection by *Plasmodium knowlesi* (Ape Malaria) in the treatment of general paralysis of the insane. *British Medical Journal*. 1935;2(3901):662-6.
16. Chopra R, Das Gupta B. A Preliminary Note on the Treatment of Neuro-Syphilis with Monkey Malaria. *Indian Medical Gazette*. 1936;71:187-9.
17. Ciuca M, Chelarescu M, Sofletea A, Constantenescu P, Teriteanu E, Cortez P, et al. Contribution expérimentale à l'étude de l'immunité dans le paludisme. *L'Academia: Bucarest*; 1955.
18. Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science (New York, NY)*. 1965;149(3686):865-.
19. Chin W, Contacos PG, Collins WE, Jeter MH, Albert E. Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1968;17(3):355-8.
20. Eyles DE, Coatney GR, Getz ME. Vivax-type malaria parasite of macaques transmissible to man. *Science (New York, NY)*. 1960;131(3416):1812-3.
21. Schmidt LH, Greenland R, Genther CS. The transmission of *Plasmodium cynomolgi* to man. *Am J Trop Med Hyg*. 1961;10:679-88.
22. Warren M, Cheong WH, Fredericks HK, Coatney GR. Cycles of jungle malaria in West Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 1970;19(3):383-93.
23. Vythilingam I, Lim YAL, Venugopalan B, Ngui R, Leong CS, Wong ML, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria an emerging public health problem in Hulu Selangor, Selangor, Malaysia (2009–2013): epidemiologic and entomologic analysis. *Parasites & Vectors*. 2014;7:436.
24. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46.
25. Yusof R, Lau Y, Mahmud R, Fong M, Jelip J, Ngian H, et al. High proportion of *knowlesi* malaria in recent malaria cases in Malaysia. *Malaria journal*. 2014;13.
26. William T, Jelip J, Menon J, Anderios F, Mohammad R, Awang Mohammad TA, et al. Changing epidemiology of malaria in Sabah, Malaysia: increasing incidence of *Plasmodium knowlesi*. *Malaria journal*. 2014;13(1):1-11.

27. Rajahram GS, Barber BE, William T, Grigg MJ, Menon J, Yeo TW, et al. Falling Plasmodium knowlesi Malaria Death Rate among Adults despite Rising Incidence, Sabah, Malaysia, 2010-2014. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(1).
28. Jiang N, Chang Q, Sun X, Lu H, Yin J, Zhang Z, et al. Co-infections with Plasmodium knowlesi and other malaria parasites, Myanmar. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(9):1476-8.
29. Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P, et al. Human Infections with Plasmodium knowlesi, the Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(5):811-3.
30. Jeslyn WP, Huat TC, Vernon L, Irene LM, Sung LK, Jarrod LP, et al. Molecular epidemiological investigation of Plasmodium knowlesi in humans and macaques in Singapore. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY).* 2011;11(2):131-5.
31. Nakaviroj S, Kobasa T, Teeranaipong P, Putaporntip C, Jongwutiwes S. An autochthonous case of severe Plasmodium knowlesi malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(3):569-72.
32. Marchand RP, Culleton R, Maeno Y, Quang NT, Nakazawa S. Co-infections of Plasmodium knowlesi, P. falciparum, and P. vivax among Humans and Anopheles dirus Mosquitoes, Southern Vietnam. *Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(7):1232-9.
33. Khim N, Siv S, Kim S, Mueller T, Fleischmann E, Singh B, et al. Plasmodium knowlesi infection in humans, Cambodia, 2007-2010. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1900-2.
34. Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, et al. Plasmodium Knowlesi in Human, Indonesian Borneo. 2010.
35. Sulistyaningsih E, Fitri LE, Löscher T, Berens-Riha N. Diagnostic difficulties with Plasmodium knowlesi infection in humans. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):1033-4.
36. Seilmaier M, Hartmann W, Beissner M, Fenzl T, Haller C, Guggemos W, et al. Severe Plasmodium knowlesi infection with multi-organ failure imported to Germany from Thailand/Myanmar. *Malaria journal.* 2014;13:422.
37. Kroidl I, Seilmaier M, Berens-Riha N, Bretzel G, Wendtner C, Loscher T. Monkey malaria (Plasmodium knowlesi infection) after travelling to Thailand. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946).* 2015;140(11):815-7.
38. Bronner U, Divis PCS, Färnert A, Singh B. Swedish traveller with Plasmodium knowlesi malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malaria journal.* 2009;8:15-.

39. Tanizaki R, Ujiie M, Kato Y, Iwagami M, Hashimoto A, Kutsuna S, et al. First case of *Plasmodium knowlesi* infection in a Japanese traveller returning from Malaysia. *Malaria journal*. 2013;12:128-.
40. Lee K-S, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malaria journal*. 2009;8:73-.
41. Fooden J. Ecogeographic segregation of macaque species. *Primates*. 1982;23(4):574-9.
42. Garnham PCC, Lainson R, Cooper W. The tissue stages and sporogony of *Plasmodium knowlesi*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1957;51(5):384-96.
43. Fooden J. Comparative review of fascicularis-group species of macaques (Primates: Macaca). *Fieldiana Zoology*. 2006:1-43.
44. Eyles DE LA, Warren M, Sandosham AA. Malaria parasites of Malaysian leaf monkeys of the genus *Presbytis*. *Med J Malaya*. 1962;17:85– 6.
45. Lee K-S, Divis PCS, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, et al. *Plasmodium knowlesi*: Reservoir Hosts and Tracking the Emergence in Humans and Macaques. *PLoS Pathog*. 2011;7(4):e1002015.
46. Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1799.
47. Lambrecht F, Dunn F, Eyles D. Isolation of *Plasmodium knowlesi* from Philippine macaques. 1961.
48. Tsukamoto M, Miyata A, Miyagi I. Surveys on simian malaria parasites and their vector in Palawan Island, the Philippines. *Tropical Medicine*. 1978;20(1):39-50.
49. Lee K-S, Divis PCS, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, et al. *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog*. 2011;7.
50. Ueberbach A. *Javaneraffe (Macaca fascicularis)*, Portrait, Singapore: Creative Commons Attribution-ShareAlike 2.0 Germany; 2007 [Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Macaca_fascicularis.jpg].
51. Hectonichus. *Macaca nemestrina* at Sepilok, Sabah, Malaysia 2008 [Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cercopithecidae_-_Macaca_nemastrina.jpg].

52. Sallum MA, Peyton EL, Wilkerson RC. Six new species of the Anopheles leucosphyrus group, reinterpretation of An. elegans and vector implications. Medical and veterinary entomology. 2005;19(2):158-99.
53. Peyton E. A new classification for the Leucosphyrus Group of Anopheles (Cellia). DTIC Document, 1989.
54. Harbach RE, Baimai V, Sukowati S. Some observations on sympatric populations of the malaria vectors Anopheles leucosphyrus and Anopheles balabacensis in a village-forest setting in South Kalimantan. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1987;18(2):241-7.
55. Collins WE, Contacos PG, Guinn EG. Studies on the Transmission of Simian Malaria II. Transmission of the H Strain of Plasmodium knowlesi by Anopheles balabacensis balabacensis. The Journal of Parasitology. 1967;53(4):841-4.
56. Vythilingam I. Review Paper Plasmodium knowlesi in humans: a review on the role of its vectors in Malaysia. Tropical biomedicine. 2010;27(1):1-12.
57. Cheong WH, Warren McW, Omar AH, Mahadevan S. Anopheles balabacensis balabacensis identified as a vector of simian malaria in Malaysia. Science (New York, NY). 1965;150.
58. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):165-84.
59. Garnham PCC. Malaria parasites and other haemosporidia. Malaria Parasites and Other Haemosporidia. 1966.
60. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, et al. Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2009;49(6):852-60.
61. Wikipedia CaG. Plasmodium Entwicklungszyklus 2005 [Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plasmodium_zyklus.png].
62. Rajahram GS, Barber BE, William T, Menon J, Anstey NM, Yeo TW. Deaths due to Plasmodium knowlesi malaria in Sabah, Malaysia: association with reporting as Plasmodium malariae and delayed parenteral artesunate. Malaria journal. 2012;11(1):1-7.
63. Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, et al. Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. Malaria journal. 2010;9:10.
64. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. Geneva: World Health Organization; 2015.

65. Murray CK, Bennett JW. Rapid Diagnosis of Malaria. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009;2009:415953.
66. Foster D, Cox-Singh J, Mohamad DS, Krishna S, Chin PP, Singh B. Evaluation of three rapid diagnostic tests for the detection of human infections with *Plasmodium knowlesi*. *Malaria journal*. 2014;13(1):1-7.
67. Barber BE, William T, Grigg MJ, Piera K, Yeo TW, Anstey NM. Evaluation of the sensitivity of a pLDH-based and an aldolase-based rapid diagnostic test for diagnosis of uncomplicated and severe malaria caused by PCR-confirmed *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium vivax*. *J Clin Microbiol*. 2013;51.
68. Rajahram G, Barber BE, William T, Menon J, Anstey NM, Yeo TW. Deaths due to *Plasmodium knowlesi* malaria in Sabah, Malaysia: association with reporting as *P. malariae* and delayed parenteral artesunate. *Malaria journal*. 2012;11.
69. Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Day NPJ, White NJ, Snounou G. Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):4173-5.
70. Eede P, Van H, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc T, Hung L, et al. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malaria journal*. 2009;8.
71. Lucchi NW, Poorak M, Oberstaller J, DeBarry J, Srinivasamoorthy G, Goldman I, et al. A new single-step PCR assay for the detection of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *PLoS One*. 2012;7(2):e31848.
72. Link L, Bart A, Verhaar N, van Gool T, Pronk M, Scharnhorst V. Molecular Detection of *Plasmodium knowlesi* in a Dutch Traveler by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2012;50.
73. Divis P, Shokoples SE, Singh B, Yanow SK. A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malaria journal*. 2010;9.
74. Babady NE, Sloan LM, Rosenblatt JE, Pritt BS. Detection of *Plasmodium knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;81(3):516-8.
75. Oddoux O, Debourgogne A, Kantele A, Kocken C, Jokiranta T, Vedy S, et al. Identification of the five human *Plasmodium* species including *P. knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2011;30(4):597-601.

76. Iseki H, Kawai S, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(7):2509-14.
77. Lau Y-L, Fong M-Y, Mahmud R, Chang P-Y, Palaeya V, Cheong F-W, et al. Specific, sensitive and rapid detection of human *Plasmodium knowlesi* infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples. *Malaria journal*. 2011;10(1):1-6.
78. Payne D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 1987;3(8):241-6.
79. Moyes CL, Henry AJ, Golding N, Huang Z, Singh B, Baird JK, et al. Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(3):e2780.
80. Geography E. [Available from: http://edu-geography.com/image.php?pic=../data_images/countries/sulawesi/sulawesi-02.jpg.
81. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10(4):506-13.
82. 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(6):1171-4.
83. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
84. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8.
85. (BLAST) BLAST. National Center of Biotechnology Information [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
86. Durrhalm DN, Becker PJ, Billingham K, Brink A. Diagnostic disagreement--the lessons learnt from malaria diagnosis in Mpumalanga. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 1997;87(5):609-11.
87. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*. 2003;7(4):315-23.

88. Snounou G, Viriyakosol S, Xin Ping Z, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993;61(2):315-20.
89. Hanscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends in parasitology*. 2002;18(9):395-8.
90. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(4):687-92.
91. Waters AP. The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. *Adv Parasitol*. 1994;34:33-79.
92. Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE, Lal AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Phylogenet Evol*. 1996;6(1):157-65.
93. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, et al. Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1624-7.
94. Kawamoto F, Miyake H, Kaneko O, Kimura M, Nguyen TD, Nguyen TD, et al. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2287-9.
95. Win TT, Jalloh A, Tantular IS, Tsuboi T, Ferreira MU, Kimura M, et al. Molecular analysis of *Plasmodium ovale* variants. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1235-40.
96. Pinheiro MM, Ahmed MA, Millar SB, Sanderson T, Otto TD, Lu WC, et al. *Plasmodium knowlesi* Genome Sequences from Clinical Isolates Reveal Extensive Genomic Dimorphism. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0121303.
97. Divis PC, Singh B, Anderios F, Hisam S, Matusop A, Kocken CH, et al. Admixture in Humans of Two Divergent *Plasmodium knowlesi* Populations Associated with Different Macaque Host Species. *PLoS Pathog*. 2015;11(5):e1004888.
98. Assefa S, Lim C, Preston MD, Duffy CW, Nair MB, Adroub SA, et al. Population genomic structure and adaptation in the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(42):13027-32.

99. Vythilingam I, Hii J. Simian malaria parasites: special emphasis on *Plasmodium knowlesi* and their anopheles vectors in Southeast Asia. *Anopheles mosquitoes—new insights into malaria vectors* Rijeka, Croatia: InTech. 2013.
100. Eyles DE, Warren M. *Plasmodium inui* in Sulawesi. *Journal of Parasitology*. 1962;48(5).
101. Elyazar IR, Hay SI, Baird JK. Malaria distribution, prevalence, drug resistance and control in Indonesia. *Advances in parasitology*. 2011;74:41.

8. Abkürzungen

ACT:	Artemisinin-based combination therapy
ARDS:	Acute respiratory distress syndrome
Abb.:	Abbildung
bp:	basepair
DNA:	deoxyribonucleic acid
dNTP:	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
ddNTP:	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
EDTA:	Ethylene-diamine-tetra-acetic-acid
HRP-2:	Histidin-reiches Protein
LAMP:	loop-mediated-isothermal-Amplification
LDH:	Laktatdehydrogenase
P.:	Plasmodium
PCR:	Polymerase-chain-reaction
Pf:	Plasmodium falciparum
Pk:	Plasmodium knowlesi
Pv:	Plasmodium vivax
P.spp.:	Plasmodium spezies
RDT:	Rapid diagnostic test
RNA:	Ribonucleic acid
rRNA:	ribosomale RNA
ssrRNA:	small-subunit ribosomal RNA
Tab.:	Tabelle
TAE:	TRIS-Acetat+EDTA
Taq:	Thermus aquaticus
WHO:	World Health Organisation

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bestätigte Malariafälle in Indonesien.....	6
Abb. 2: Javaneraffe (<i>Macaca fascicularis</i>).....	10
Abb. 3: Südlicher Schweinsaffe (<i>Macaca nemestrina</i>).....	10
Abb. 4: Berichte von Fällen einer <i>P.knowlesi</i> Infektion.....	11
Abb. 5: Lebenszyklus von Plasmodien.....	13
Abb. 6: Morphologischen Ähnlichkeiten von <i>P.knowlesi</i> zu <i>P.falciparum</i> / <i>P.malariae</i> .15	
Abb. 7: Geographische Reichweite des <i>P.knowlesi</i> Reservoirs in Südostasien.....	18
Abb. 8: Geographie Lage von Manado.....	19
Abb. 9: Verteilung der Häufigkeit von <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> und <i>P.knowlesi</i> in 154 Monoinfektionen.....	28
Abb. 10: Verteilung der Häufigkeit von <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> und <i>P.knowlesi</i> in 41 Mischinfektionen.....	29
Abb. 11: Ergebnis für <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> und <i>P. knowlesi</i>	30
Abb. 12: Ergebnis der 27 Proben mit den Primern Pmk8/r9.....	31
Abb. 13: Ergebnis der 27 Proben mit den Primern Pk1140/Pkr1150 auf Höhe von 410bp.....	31
Abb. 14: Ergebnis der 27 Proben mit den Primern Kn1f/Kn3r auf Höhe von 290bp....	32
Abb. 15: Verlauf der Wallace-Linie zwischen Kalimantan (=Borneo) und Sulawesi....	40

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Reaktionsansatz.....	23
Tab. 2: Reaktionsbedingungen.....	23
Tab. 3: Temperaturoptima der Primer.....	24
Tab. 4: Primersequenzen.....	25
Tab. 5: Zahl der identifizierten Infektionen mit <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> und <i>P.knowlesi</i> in NordSulawesi, Indonesien.....	29
Tab. 6: Ergebnisse der fraglich <i>knowlesi</i> -positiven Proben unter Verwendung verschiedener Primer.....	33
Tab. 7: Zahl der identifizierten Infektionen mit <i>P. knowlesi</i> unter Verwendung verschiedener Primer.....	34
Tab. 8: Ergebnisse der 10 Proben, die sequenziert wurden.....	35

11. Danksagung

Frau Dr. med. Nicole Berens-Riha danke ich herzlichst für die freundliche Bereitstellung des Dissertationsthemas, für ihre hilfreichen Ratschläge und für die Ermöglichung meines Aufenthaltes in Indonesien. Ich konnte dadurch sehr interessante und verschiedenartige Perspektiven in meine zweite Heimat erhalten.

Prof. Dr. med. Thomas Löscher, ehemaliger Direktor des Tropeninstituts, danke ich für seine Unterstützung und die freundliche Aufnahme in die Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Weiterhin spreche ich meinen Dank aus an Dr. Loeki Enggar Fitri (Universitas Brawijaya, Malang), Dr. Umar Zein (Universitas Prima Indonesia, Medan) und Dr. Josef Tuda (Universitas Sam Ratulangi, Manado), die mich während meines Aufenthaltes in Indonesien herzlich willkommen heißen und betreut haben.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Angestellten des Tropeninstituts, die mir immer mit Hilfe und Rat zur Seite standen. Hierbei gilt besonderer Dank der Laboratoriumsassistentin Kerstin Helfrich, die mir bei Fragen im Labor immer gerne weitergeholfen hat.

Zum Schluss möchte ich auch meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung danken wodurch mir das Studium sowie die Dissertation überhaupt erst möglich gemacht wurden. Vielen Dank!

12. Eidesstattliche Versicherung

Harle, Adinda

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Prävalenz von *Plasmodium knowlesi* in Nord Sulawesi, Indonesien“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.11.2018

Ort, Datum

Adinda Harle

Unterschrift Doktorandin