

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin

Leiter: Prof. Dr. med. T. Löscher

an der Medizinischen Poliklinik Innenstadt

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Validität der Malaria-Diagnose in Endemiegebieten
bei nicht-immunen Reisenden**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Isabel Barreto Miranda

aus Pforzheim

- 2009 -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Löscher
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Sören Schubert
Prof. Dr. Johannes Bogner
Priv. Doz. Dr. Johannes Liese

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Malaria.....	1
1.1.1 Krankheitsbezeichnung und Geschichte	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Erreger.....	3
1.1.4 Übertragung.....	3
1.1.5 Zyklus.....	4
1.1.6 Klinik.....	6
1.1.7 Semiimmunität.....	6
1.1.8 Diagnose.....	7
1.1.9 Serologie.....	8
1.1.10 Behandlung.....	9
1.1.11 Prävention und Bekämpfung.....	9
1.2 Malaria bei Reisenden.....	10
1.2.1 Prophylaxe bei Reisenden.....	10
1.2.2 Erkrankungen nach Rückkehr.....	11
1.2.3 Erkrankungen im Ausland.....	11
2. Fragestellung und Zielsetzung.....	12
3. Methoden.....	13
3.1 Patienten und Proben.....	13
3.2 Kontrollgruppe.....	14
3.3 Serologische Untersuchungen:	
Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT).....	15
3.4 Datenauswertung.....	16
4. Ergebnisse.....	17
4.1 Untersuchungszahlen.....	17
4.2 Berichte über Malaria während eines Auslandsaufenthaltes.....	17
4.3 Angaben der Patienten zu Auslandsaufenthalten.....	20

4.4 Abstand zwischen Erkrankung und serologischer Untersuchung.....	21
4.5 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen in verschiedenen Zeitintervallen nach Erkrankung.....	22
4.6 Angaben zur Diagnose.....	23
4.7 Angaben zur Malariaphylaxe.....	24
4.8 Angaben zur Behandlung (Medikamente).....	26
4.9 Kontrollgruppe.....	27
5. Diskussion.....	29
5.1 Antikörpernachweis.....	29
5.2 Serologische Testmethode.....	30
5.3 Patienten dieser Untersuchung.....	31
5.3.1 Patienten.....	31
5.3.2 Prophylaxe.....	32
5.3.3 Behandlung.....	32
5.4 Probleme der Diagnose.....	33
6. Schlussfolgerungen.....	35
7. Zusammenfassung.....	36
8. Abkürzungen.....	37
9. Literaturverzeichnis.....	39
10. Danksagung.....	45
11. Lebenslauf.....	46

Wesentliche Teile dieser Dissertationsarbeit wurden mit Genehmigung des Promotions-Ausschusses der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München zur Veröffentlichung eingereicht und angenommen (Barreto Miranda I *et al.* J Travel Med, in press).

1. Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Krankheitsbezeichnung und Geschichte

Die Malaria ist eine der am längsten bekannten Infektionskrankheiten. Im indischen, chinesischen und ägyptischen Schrifttum sind periodische, der Malaria entsprechende Fieber 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 Malaria niederschlagen hat. „Malaria“ (ital. „schlechte Luft „) oder Paludismus („Sumpffieber“, franz. paludisme) waren die synonym verwandten Namen, welche die Zusammenhänge zwischen der Erkrankung und „schlechter Luft“ im Bereich von Sumpfgebieten (lat. palus, Sumpf) bezeichnen, wie z.B. zur Zeit des römischen Reiches in der sumpfigen Ebene des Tibers um Rom. 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 bestätigte.

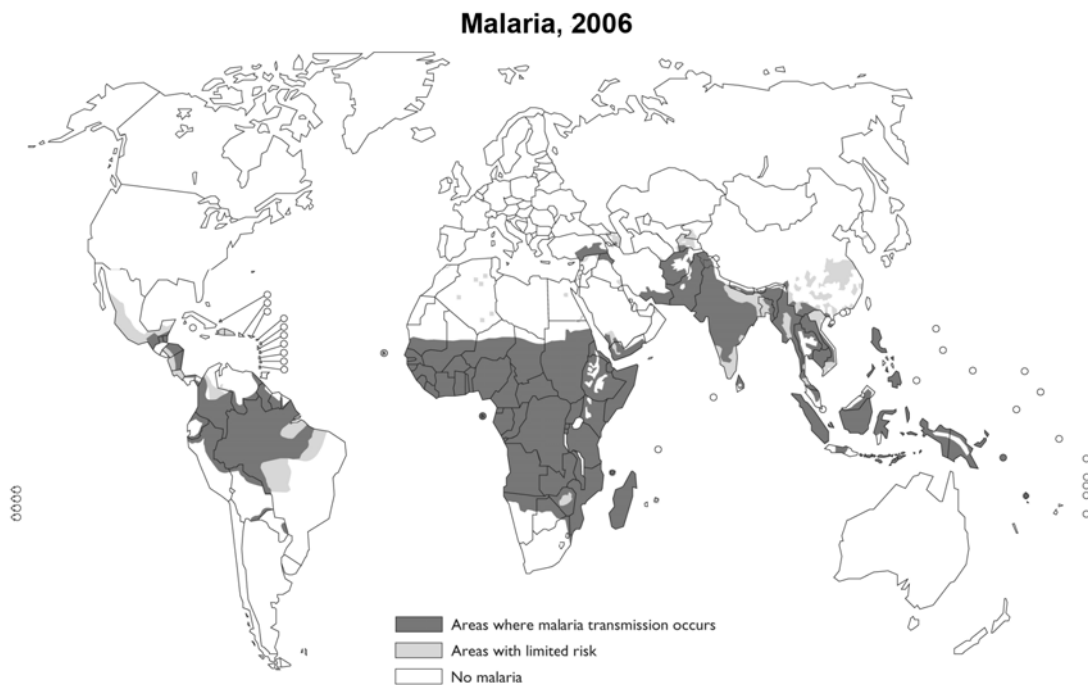
1880 gelang dem französischen Militärchirurg Alphonse Laveran (1845-1922) die Erstbeschreibung des Lebenszyklus des Malariaerregers. Er entdeckte erstmalig Plasmodien in den roten Blutkörperchen erkrankter französischer Soldaten in Algerien.

Ende des 19. Jahrhunderts wurde durch den in Indien geborenen britischen Arzt Ronald Ross (1857-1932) der Nachweis erbracht, dass Stechmücken die Malaria übertragen. 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.

1.1.2 Epidemiologie

Malaria ist bezüglich Morbidität und Mortalität neben HIV/AIDS und Tuberkulose eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten und weltweit die wichtigste parasitäre Infektionskrankheit. Jährlich kommt es zu geschätzten 350-500 Millionen Erkrankungen mit mehr als einer Million Todesfällen, besonders bei Kindern in Afrika südlich der Sahara [24].

Abbildung 1:



Quelle: WHO

Über ein Drittel der Weltbevölkerung lebt in den tropischen und subtropischen Gebieten in denen Malaria endemisch oder epidemisch vorkommt.

Betroffen sind, bei seit Jahren zunehmendem Fernreiseverkehr, auch immer mehr Reisende aus malariafreien Gebieten. In Deutschland werden jährlich ca. 600 bis 1000 Fälle mit bis zu 20 Todesfällen gemeldet [35]. Zusätzlich wird von zahlreichen Malariafällen während eines Auslandsaufenthaltes berichtet.

1.1.3 Erreger

Erreger der Malaria sind Protozoen der Gattung *Plasmodium* (Ordnung Haemosporida, Stamm Apicomplexa). Es gibt 4 humanpathogene Plasmodienspezies: die lebensbedrohliche Malaria tropica wird durch *Plasmodium falciparum* verursacht, Erreger der Malaria tertiana sind *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* verursacht Malaria quartana. Mit Ausnahme von sporadischen Infektionen durch *P. malariae* bei verschiedenen Affenarten kommen die humanpathogenen Plasmodien nur beim Menschen vor.

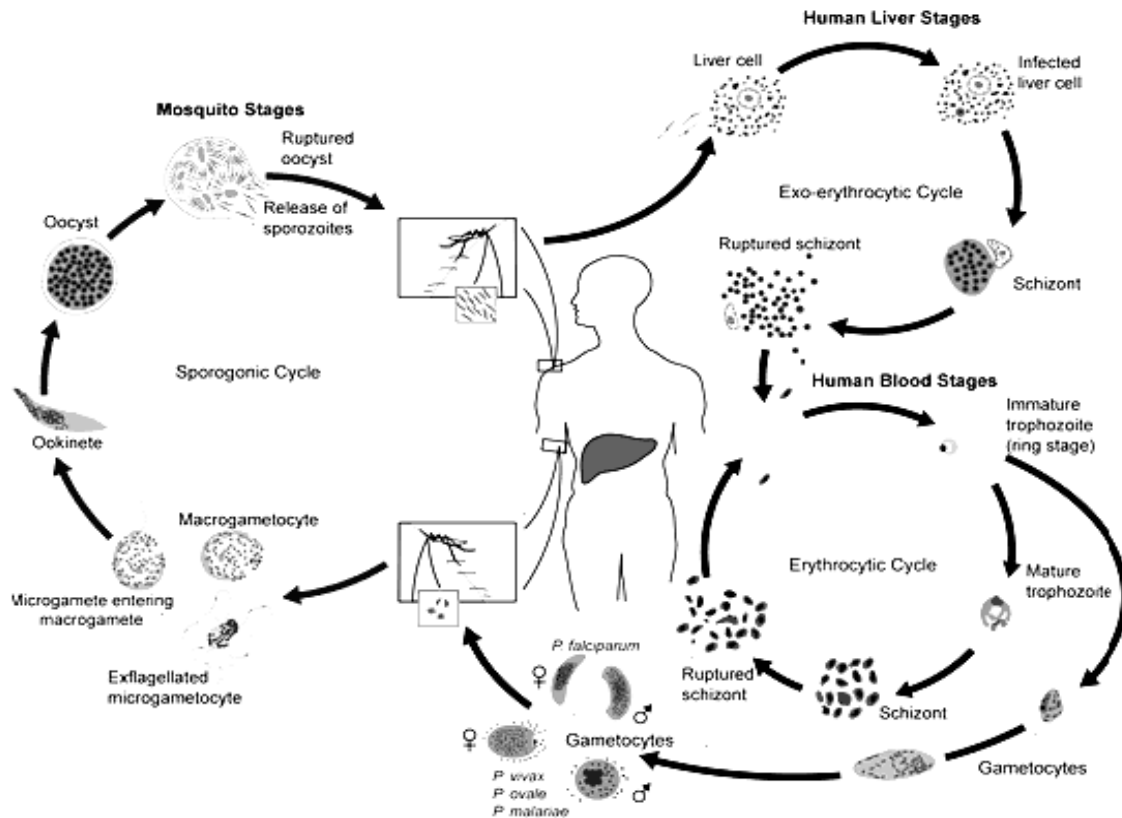
Einzelfälle von Infektionen des Menschen durch *Plasmodium knowlesi*, ein bei Makakken vorkommender Malariaerreger sind seit langem bekannt. Vor kurzem wurde *P. knowlesi* erstmals als epidemiologisch relevante Infektion des Menschen im malayischen Teil von Borneo beschrieben [36].

1.1.4 Übertragung

Die Übertragung erfolgt in der Regel durch den Stich weiblicher Stechmücken der Gattung Anopheles. Übertragungen durch parasitenhaltiges Blut, z.B. bei Transfusionen, Transplantationen, Gebrauch kontaminierter Nadeln oder kongenital sind ebenfalls möglich.

1.1.5 Zyklus

Abbildung 2:



Quelle: CDC

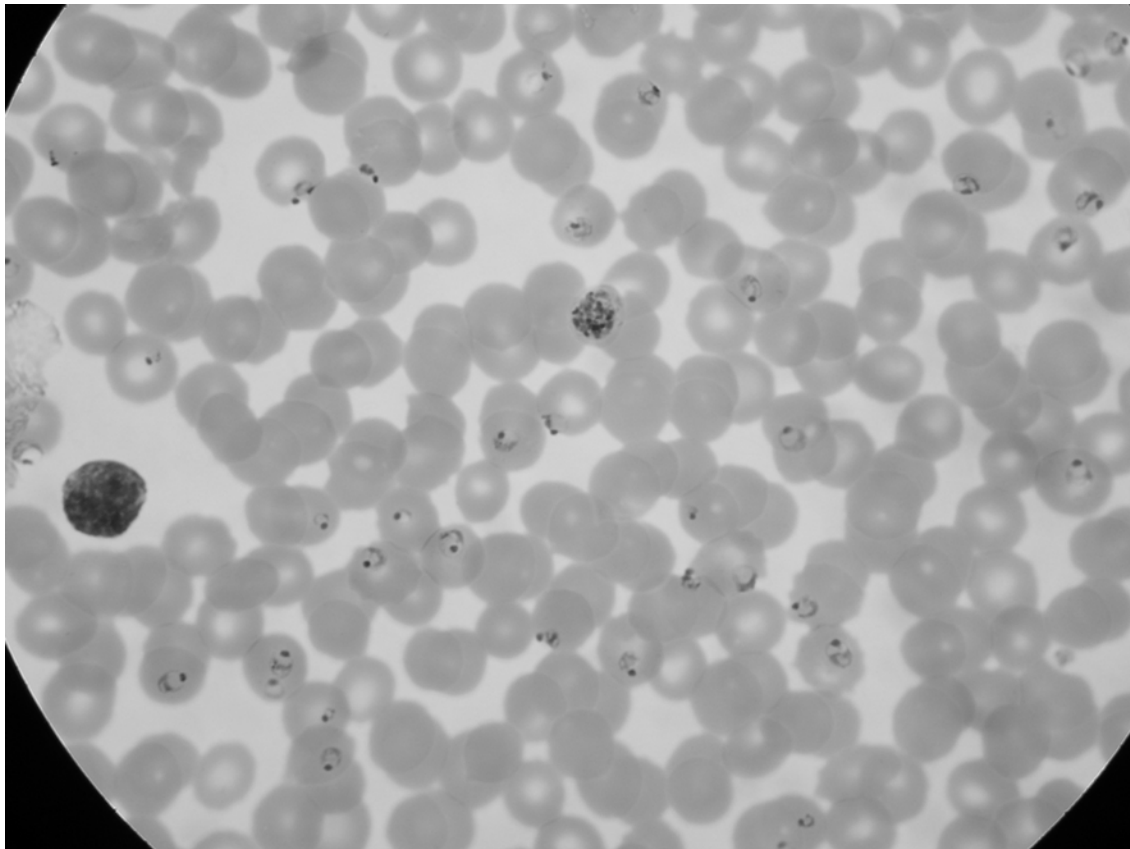
Die in den Speicheldrüsen infizierter Anopheles enthaltenen Sporozoiten (Infektionsformen) werden während einer Blutmahlzeit mit dem Speichelsekret inokuliert. Sie finden über Hautkapillaren Anschluss an den Blutkreislauf, dringen innerhalb von kurzer Zeit in Leberparenchymzellen ein und entwickeln sich intrazellulär durch ungeschlechtliche Teilung zu Schizonten, die mehrere Tausend Merozoiten enthalten. Diese werden nach Ruptur der Wirtszelle ins Blut freigesetzt (Gewebeschizogonie, Dauer: fünf bis sechzehn Tage oder länger).

Bei Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* können in Leberzellen eingedrungene Sporozoiten zunächst als Hypnozoiten (Ruhestadien) in der Leber verbleiben und erst nach einem sehr variablen Intervall von wenigen Wochen bis mehreren Jahren mit der Geweschizogonie beginnen.

EINLEITUNG

Aus Gewebeschnitzern freigesetzte Merozoiten befallen Erythrozyten und es folgt die erythrozytäre Schizogonie, bei der aus dem initialen Ringstadium über amöboide Trophozoiten durch ungeschlechtliche Teilung reife Schizonten mit - je nach *Plasmodium* species - 10-32 Merozoiten entstehen (24-32 bei *P. falciparum*). Diese werden nach Ruptur der Membran des befallenen Erythrozyten freigesetzt und befallen neue Erythrozyten. Ein Teil der Erreger entwickelt sich zu weiblichen oder männlichen Gametozyten, die dann von der Mücke, in der die sexuelle Vermehrung der Plasmodien stattfindet, aufgenommen werden. Nach Verschmelzung der haploiden Gametozyten zur diploiden Zygote wandert diese als Ookinet über eine Magenepithelzelle in die Speicheldrüse des Moskitos. In der dort entstehenden Oozyste bilden sich durch meiotische Teilung Tausende von haploiden Sporozoiten, die für eine erneute Infektion menschlicher Wirte zur Verfügung stehen.

Abbildung 3: Ringformen von *P. falciparum* im Blutausstrich



1.1.6 Klinik

Die Malariaerkrankung wird ausschließlich durch die erythrozytäre Schizogonie verursacht. Die Übergänge von Infektion zu Parasitämie und weiter zu unkomplizierter oder schwerer bzw. komplizierter Malaria und schließlich Sterblichkeit hängen von der Virulenz des Erregers oder einzelner Stämme, erworbener Immunität und hereditären Faktoren (z.B. Sichelzellanämie) ab, sowie vom Zugang zu medizinischer Versorgung, parasitärer Medikamentenresistenz und Präventionsmaßnahmen.

Fieber, meist begleitet von Schüttelfrost während des Temperaturanstiegs und Schweißausbrüchen bei Temperaturabfall, ist das Leitsymptom der Erkrankung. Es können zahlreiche weitere Symptome und Befunde vorliegen und bei Malaria tropica kann es zu verschiedenen Komplikationen kommen: Kopf- und Gliederschmerzen, Husten, Durchfälle, Erbrechen, Hypoglykämie, Ikterus, Anämie, Thrombozytopenie, Hämolyse, Gerinnungsstörungen, Blutungen, Hepato-/ Splenomegalie, Milzruptur, Nierenversagen, Lungenödem, kardiale und cerebrale Symptome (Eintrübung, Koma, Krampfanfälle), Schock, Multiorganversagen.

Die Letalität der Malaria tropica bei nichtimmunen Personen liegt bei 20 % und höher.

1.1.7 Semiimmunität

Bei Menschen, die in hochendemischen Gebieten leben und wiederholt infiziert werden, entwickelt sich nach einer Phase mit hohem Risiko einer schweren Erkrankung eine Semiimmunität, die bei erneuten Infektionen vor einer Erkrankung schützt. Es kann über lange Zeiträume eine Parasitämie ohne klinisch relevante Symptome vorliegen. Bei Auftreten von Fieber oder anderen Symptomen und geringer Parasitämie ist dann häufig eine andere Erkrankungsursache vorhanden. Die Teilimmunität nimmt in Phasen fehlender Exposition ab.

1.1.8 Diagnose

Bei Auftreten von Fieber während oder nach einem Aufenthalt in Endemiegebieten muss stets an Malaria gedacht werden. Eine ärztliche Untersuchung, die eine parasitologische Blutuntersuchung beinhaltet, sollte umgehend erfolgen. Die mikroskopische Untersuchung eines gefärbten Blutausstrichs und „Dicken Tropfens“ gilt nach wie vor als Goldstandard. Vorteile sind die Möglichkeit der Bestimmung der Spezies, der Parasitämie und der Parasitenstadien. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 2-10 Parasiten/µl Blut.

Weitere eingesetzte Methoden sind

- die Fluoreszenz-Mikrohämatokritanreicherung (QBC® = quantitative buffy coat) mit vergleichbarer Sensitivität und Spezifität (Anreicherung der Parasiten unter dem "*Buffy coat*" durch Zentrifugation in speziellen Kapillarröhrchen und Anfärbung der Parasiten-DNS mit Acridin-Orange, Spezialausrüstung erforderlich)
- Schnelltests mittels immunchromatographischen Nachweis von plasmodien-spezifischen Antigenen (PfHRP-2 = histidine rich protein 2 von *Plasmodium falciparum*, pLDH = parasitenspezifische Laktatdehydrogenase, genusspezifische Aldolase), deren Sensitivität und Spezifität niedriger ist (falsch-negative Befunde - eventuell trotz hoher Parasitämie, falsch-positive Resultate z.B. bei Vorhandensein von Rheumafaktor), Nachteile: nicht quantitativ, zum Teil nicht speziesspezifisch
- sowie der Nachweis von Plasmodien-DNS mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion), was bisher mit höherem Zeitaufwand und Kosten verbunden ist.

Bei unzureichenden labordiagnostischen Möglichkeiten, besonders in Ländern mit hoher Zahl von Malariafällen, gründet sich die Diagnose bisher in vielen Fällen auf den klinischen Verdacht.

1.1.9 Serologie

Der Antikörpernachweis ist nicht zur Diagnostik einer aktuellen Malaria geeignet, da Antikörper erst einige Tage nach Erkrankungsbeginn nachweisbar werden und unterschiedlich lange nach Erkrankung nachgewiesen werden können.

Die Serologie kann jedoch eingesetzt werden

- bei epidemiologischen Untersuchungen,
- zur Untersuchungen von Blutspendern in Nichtendemiegebieten [23],
- als ergänzende Untersuchung bei rezidivierenden Fieberschüben zum Ausschluss einer Malaria tertiana oder quartana im beschwerdefreien Intervall,
- zur retrospektiven Diagnostik bei anamnestischer Malaria, insbesondere zur Beurteilung der Indikation einer ergänzenden Nachbehandlung mit Primaquin zur Eradikation der Hypnozoiten bei Malaria tertiana, sowie
- zur retrospektiven Diagnostik aus arbeitsmedizinischen oder gutachterlichen Gründen.

1.1.10 Behandlung

Zur Behandlung werden verschiedene Medikamente eingesetzt. Die Behandlung der Malaria sollte nach jeweils aktuellen Empfehlungen erfolgen [46]. Vor allem die Therapie der Malaria tropica ist durch das Auftreten von Resistenzen der Plasmodien gegen die zur Verfügung stehenden Medikamente erschwert.

1.1.11 Prävention und Bekämpfung

Individuelle Präventionsmaßnahmen basieren auf der Expositionsprohylaxe durch Meiden von Endemiegebieten und Schutz vor Insektenstichen in Endemiegebieten, z.B. durch geeignete Kleidung, Moskitonetze (beides auch imprägniert), Insektizide in Wohnräumen, Anwendung von Repellents.

Zusätzlich kann eine Chemoprophylaxe durch Einnahme bestimmter Medikamente erfolgen. Bei Einwohnern in Endemiegebieten ist dies jedoch auf besondere Situationen begrenzt (Kleinkinder, Schwangere, z.B. intermittend preventive treatment).

Bisher stehen keine Impfstoffe zu Verfügung.

Wichtig für die Malaria-Bekämpfung sind außerdem frühzeitige Diagnose und Behandlung, Vektorkontrolle (Insektizide, biologische Bekämpfung), Monitoring zum frühzeitigen Erkennen bzw. Verhindern von Epidemien und die Verbesserung von Ausbildung und Forschung in Endemiegebieten.

1.2 Malaria bei Reisenden

1.2.1 Prophylaxe bei Reisenden

Für Reisen in Gebiete mit hohem Malariarisiko wird zusätzlich zur Expositionsprophylaxe eine medikamentöse Malariaprophylaxe empfohlen [9; 16].

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 % [30; 38].

Bei Auftreten von Fieber oder malariaverdächtigen Symptomen ab dem 6. Tag nach erstmaligem Betreten eines Malariagebietes sollte eine ärztliche Untersuchung erfolgen. Für Situationen auf Reisen in denen dies nicht innerhalb von 24 Stunden möglich ist, wird Reisenden eine notfallmäßige Selbstbehandlung mit einem mitgeführten Malariamedikament empfohlen [9; 16].

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.

Zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria steht 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.

1.2.2 Erkrankungen nach Rückkehr

Bei Krankheit, insbesondere einer schweren Infektionserkrankung, während oder kurz nach Tropenaufenthalt wird eine ärztliche tropenmedizinische Untersuchung empfohlen. Bei Fieber ist eine umgehende Untersuchung auf Malaria erforderlich.

In Deutschland werden Malaria-Fälle an das Robert Koch-Institut gemeldet. Patienten mit Malaria tropica sollten in Deutschland stationär in einem Krankenhaus behandelt werden.

Zusätzlich zu den 600 bis 1000 gemeldeten Fälle / Jahr in Deutschland [35], kann eine hohe Dunkelziffer nicht gemeldeter Malaria angenommen werden. Nach Daten der Krankenhaus-Fallstatistiken [37], liegen die Zahlen um 50-100% höher. Patienten, die aus Endemiegebieten stammen berichten gelegentlich, bei Auftreten von Symptomen eine Selbstbehandlung durchzuführen.

1.2.3 Erkrankungen im Ausland

Einige Patienten berichten über während eines Auslandsaufenthaltes durchgemachte Malaria, wobei häufig eine ärztliche Untersuchung in einem Krankenhaus oder eine Untersuchung in einer sonstigen Gesundheitseinrichtung und teilweise eine notfallmäßige Selbstbehandlung angegeben wird.

Ein Problem hierbei ist jedoch die Unsicherheit der Diagnose vor Ort. So zeigen verschiedene Studien zur Qualität der parasitologischen Diagnostik an Gesundheitseinrichtungen in Endemiegebieten erhebliche Schwankungen, zum Teil mit einem hohen Prozentsatz falsch positiver wie falsch negativer Diagnosen [13; 21; 31].

Aussagekräftige Zahlen zur Häufigkeit der bei Reisenden während Aufenthalten in Malariagebieten auftretenden Malariaerkrankungen liegen nicht vor.

Da in den meisten Fällen Antikörper über mehrere Monate nachweisbar sind [1; 8; 12; 15; 17; 19; 40; 47; 48] kann mit Hilfe der Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Malaria-Antikörpern im Nachhinein eine Bestätigung von Malariafällen während eines Auslandsaufenthaltes bei nichtimmunen Reisenden erfolgen [15; 19].

2. Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Studie sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß berichtete Fälle von Malaria während eines Auslandsaufenthaltes bei nichtimmunen Reisenden durch serologische Untersuchungen rückwirkend bestätigt bzw. widerlegt werden können. Dadurch sollen Rückschlüsse einerseits auf die Qualität der Diagnostik und der medizinischen Versorgung von Reisenden in Malariagebieten sowie andererseits auf die Wirksamkeit von Prophylaxemaßnahmen ermöglicht werden. Zudem sollen die Ergebnisse dieser Untersuchung zur Einschätzung der Häufigkeit von Malariaerkrankungen während Reisen in Malariaendemiegebiete beitragen.

3. Methoden

3.1 Patienten und Proben

Ausgewertet wurden Daten von Patienten der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin (AITM) aus den Jahren 2003 bis 2005, die berichtet hatten, während eines Auslandsaufenthaltes Malaria gehabt zu haben.

Angaben zu den Patienten (Alter, Herkunft, relevante Vorerkrankungen), Reiseziel, Reisedauer, Malariaprophylaxe, Datum der Erkrankung, Diagnose und Behandlung der fraglich durchgemachten Malaria wurden zusammengestellt.

Seren wurden zum Zeitpunkt der Vorstellung in der Ambulanz der AITM gewonnen und bei -20°C gelagert, falls die serologischen Untersuchungen nicht am selben Tag durchgeführt wurden.

In die Auswertung wurden Patienten aufgenommen, die angaben, dass während eines Auslandsaufenthaltes innerhalb des letzten halben Jahres vor dem Untersuchungszeitpunkt Malaria diagnostiziert und eine Malaria-Behandlung durchgeführt worden war.

Nicht berücksichtigt wurden Daten von Patienten,

- die aus Endemiegebieten stammen, d.h. dort geboren und aufgewachsen sind,
- mehr als drei Jahre in Endemiegebieten gelebt hatten,
- deren Erkrankung mehr als sechs Monate zurücklag, oder
- bei denen nach Rückkehr erneut eine Malaria diagnostiziert worden war.

3.2 Kontrollgruppe

Zur Beurteilung der Aussagekraft der Serologie wurden Seren von Patienten aus malariefreien Ländern ohne Malaria in der Vorgeschichte, bei denen in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin (AITM) Malaria diagnostiziert wurde und die nicht erneut exponiert waren, ebenfalls auf Malariaantikörper untersucht.

Die Seren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Erkrankung gewonnen. Von einem Teil der Patienten wurden mehrere Proben untersucht.

Da in der Zeit der Durchführung dieser Arbeit nur 35 Seren von 22 Patienten nach Malaria tropica und 21 Seren von 13 Patienten nach Malaria tertiana gewonnen werden konnten, die die Kriterien ‚Herkunft aus malariefreiem Land, keine Malaria in der Vorgeschichte und keine erneute Exposition‘ erfüllten, wurden Ergebnisse einer früheren Untersuchung der AITM [19] in die Auswertung eingeschlossen.

Insgesamt 153 Serumproben stammten von 119 Patienten mit Malaria tropica und 88 Serumproben von 57 Patienten mit Malaria tertiana (*P. vivax*).

3.3 Serologische Untersuchungen

Zum quantitativen Nachweis humaner IgG-Antikörper gegen *Plasmodium falciparum* bzw. *Plasmodium vivax* wurde der Indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) eingesetzt.

Als Antigene verwendet wurden mittels Zellkultur angezüchtete reife Trophozoiten und Schizonten von *P. falciparum* (K1 Stamm, ursprünglich isoliert in Thailand) sowie Schizonten von *P. vivax*, die mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus Patientenblut gewonnen wurden [20; 27; 39; 41; 45].

Die für den IFAT mit dem jeweiligen Antigen getrennt beschichteten Objektträger, Patientenseren und Kontrollseren wurden bei -20°C gelagert [27] und zur Testdurchführung bei Raumtemperatur aufgetaut.

Der Test wurde im Wesentlichen nach der von Voller & O'Neill [43] beschriebenen Methode mit kleineren Modifikationen durchgeführt. Die Serumproben wurden in Mikrotiterplatten mit PBS-Puffer verdünnt (1:32, 1:64, 1:128). Jeweils 10 µl wurden auf den Antigen-beschichteten Feldern der Objektträger in einer feuchten Kammer 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei Vorhandensein Plasmodien-spezifischer Antikörper in der Probe binden diese an die auf den Objektträger-Feldern immobilisierten Plasmodien. Ungebundene Serumbestandteile wurden durch anschließendes Waschen (Abspülen mit PBS, 10 Minuten waschen in PBS, Eintauchen in Aqua dest.) entfernt. Nach dem Trocknen der Objektträger wurde jedes Antigenfeld mit 10 µl Fluoreszenz-markiertem Antikörper gegen humanes IgG (1:200 IgG Fluoline, Firma Biomerieux in PBS mit Evans Blue, Firma Biomerieux) beschichtet, inkubiert und gewaschen wie oben beschrieben. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern bedeckt und bei 40-facher Vergrößerung mit Immersionsöl unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Exzitationsfilter 450-490 nm; Barrierefilter 510-560 nm; Lichtquelle HBO 50 W, Hg; Objektiv 40 x Ölimmersion) untersucht.

Als Endtiter wurde die letzte Verdünnungsstufe mit eindeutiger Fluoreszenz angegeben. Titer ab 1:64 wurden als positiv bewertet.

Tabelle 1: Bewertung der Antikörpertiter

Spezies	Antigen	negativ	grenzwertig	positiv
<i>Plasmodium falciparum</i>	Schizonten	<1:32	1:32	≥1:64
<i>Plasmodium vivax</i>	Schizonten / Trophozoiten	<1:32	1:32	≥1:64

3.4 Datenauswertung

Da spezifische Antikörper im zeitlichen Verlauf nach durchgemachter Erkrankung unterschiedlich lange persistieren, wurden die Ergebnisse in verschiedenen Zeitintervallen betrachtet. Die Einteilung der Intervalle wurde an die der früheren Untersuchung der AITM [19] angepasst.

Zur Berechnung der Konfidenzintervalle wurde die folgende Formel eingesetzt:

$$95\% \text{-Konfidenzintervall: } p \pm z_{\alpha-1} \cdot \text{SEP}$$

$p = n_1/n$ = Proportion

n = Grundgesamtheit

n_1 = zu definierender Teil aus der Grundgesamtheit

z = kritischer Wert

$z_{\alpha-1} = 1,96$ (kritischer Wert bei $\alpha = 5\%$)

α = Fehler der 1. Art

SEP (Standard Fehler einer Proportion) = $\sqrt{[p \cdot (1 - p)] / n}$

Das Programm EpilInfo™, Version 3.4.1. wurde zur Berechnung von p-Werten eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungszahlen

In den Jahren 2003 bis 2005 wurden bei Patienten, die sich in der Ambulanz der AITM vorstellten, 864 serologische Untersuchungen mittels IFAT auf Malaria-Antikörper aus verschiedenen Indikationen durchgeführt. Antikörper wurden in 103 Seren nachgewiesen, bei 35 Seren war das Ergebnis grenzwertig und bei 726 negativ.

4.2 Berichte über Malaria während eines Auslandsaufenthaltes

Bei 166 Patienten wurde in diesem Zeitraum eine serologische Untersuchung durchgeführt, da sie berichteten eine Malaria durchgemacht zu haben. Bei 39 Patienten war das Ergebnis der serologischen Untersuchung positiv, bei 13 grenzwertig und bei 114 negativ.

Eine notfallmäßige Selbstbehandlung bei Malariaverdacht wurde von 15 dieser Patienten angegeben. Antikörper waren bei drei Patienten nachweisbar, davon war bei einem bereits in der Vergangenheit in Deutschland Malaria diagnostiziert worden. Bei einem war das Ergebnis grenzwertig, bei elf waren keine Antikörper nachweisbar.

Ein weiterer Patient, bei dem keine Antikörper nachweisbar waren, berichtete über Selbstdiagnose mittels eines Schnelltests.

Zwei Patienten berichteten, dass zwar Malaria diagnostiziert worden war, jedoch keine Behandlung erfolgt sei. Bei beiden waren keine Antikörper nachweisbar.

Weitere zwei Patienten berichteten, dass zwar Malaria ausgeschlossen worden war, jedoch trotzdem eine Malariabehandlung erfolgt sei, und weitere zwei Patienten

ERGEBNISSE

berichteten, dass sie nach Rückkehr in Deutschland wegen des Verdachts auf Malaria bei fehlendem Parasitennachweis behandelt worden seien. Die IFAT-Ergebnisse waren jeweils negativ.

Bei vier Patienten bestand eine Parasitämie zum Untersuchungszeitpunkt. Bei zwei dieser Patienten wurde *P. falciparum* und bei jeweils einem Patienten *P. vivax* bzw. *P. ovale* nachgewiesen. Bei einem Patienten war erneut Malaria tropica und bei einem weiteren erneut Malaria tropica und Malaria tertiana seit ihrer Rückkehr diagnostiziert worden. Antikörper waren bei diesen Patienten nachweisbar. Sie wurden jedoch in der Auswertung nicht berücksichtigt, da nicht ermittelbar war, ob vor der erneuten Malariaerkrankung bereits Antikörper vorhanden waren.

22 Patienten stammten aus Endemiegebieten oder hatten mehrere (über drei) Jahre in Endemiegebieten gelebt. Bei 13 dieser Patienten waren die IFAT-Ergebnisse positiv, bei zwei grenzwertig und bei sieben Patienten negativ.

Bei zehn Patienten war das Intervall zwischen berichteter Malaria und serologischer Untersuchung größer als sechs Monate. Bei einem dieser Patienten waren Antikörper nachweisbar, bei zwei war das Ergebnis grenzwertig und bei sieben negativ.

Von einem Patienten waren weitere Angaben nicht verfügbar (negatives Ergebnis der serologischen Untersuchung).

ERGEBNISSE

In die abschließende Auswertung aufgenommen wurden daher nur Daten von 105 Patienten, die alle der folgenden Kriterien erfüllten:

- Erkrankung während eines Auslandsaufenthaltes
- Erkrankung innerhalb des letzten halben Jahres vor dem Untersuchungszeitpunkt
- Malaria ist diagnostiziert worden.
- Eine Malaria-Behandlung ist durchgeführt worden.

Nicht berücksichtigt wurden Daten von Patienten,

- die aus Endemiegebieten stammen oder
- mehr als drei Jahre in Endemiegebieten gelebt hatten,
- die über eine parasitologische Blutuntersuchung mit negativem Ergebnis berichteten,
- bei denen keine Behandlung erfolgt war,
- deren Erkrankung mehr als sechs Monate zurücklag,
- und Patienten bei denen nach Rückkehr erneut Malaria diagnostiziert worden war.

Die genannten Kriterien wurden von 47 Frauen und 58 Männern im Alter von vier bis 75 Jahren erfüllt.

Bei keinem der Patienten ergab sich der Verdacht auf eine relevante Immunsuppression.

ERGEBNISSE

4.3 Angaben der Patienten zu Auslandsaufenthalten

87 der insgesamt 105 Patienten waren in Afrika, acht in Asien, acht in Mittel-/Südamerika, und zwei in Ozeanien jeweils in Malariagebieten gereist.

Die Reisedauer betrug sechs Tage bis drei Jahre.

Tabelle 2: Angaben zu Patienten und Auslandsaufenthalten und Ergebnisse der serologischen Untersuchung

IFAT-Ergebnis		positiv	grenzwertig	negativ
Anzahl der Patienten	105	16	8	81
Geschlecht				
männlich/weiblich	58/47	9/7	4/4	45/36
Alter [Jahre]	4 - 75	20 - 75	19 - 64	4 - 63
Aufenthaltsdauer [Tage]	6 - 1095	21 - 365	6 - 1095	14 - 1095
Mittelwert	147	133	237	140
Median	63	90	105	60
Kontinent				
Afrika	86	10	6	70
Asien	9*	4*	-	5
Mittel-/Südamerika	8	2	2	4
Ozeanien	2	-	-	2

* bei einem Patienten erfolgten Diagnose und Behandlung in Asien nach Exposition in Afrika

4.4 Abstand zwischen Erkrankung und serologischer Untersuchung

Das Intervall zwischen der fraglich durchgemachten Malaria und dem Untersuchungszeitpunkt, zu dem eine Serumprobe für die Untersuchung auf Malaria-Antikörper gewonnen wurde, betrug entsprechend der Einschlusskriterien maximal 180 Tage.

Acht Patienten stellten sich innerhalb einer Woche vor, 19 nach ein bis zwei Wochen. Nach über zwei Wochen bis zwei Monaten stellten sich 37 und nach zwei bis sechs Monaten 23 Patienten vor. Bei 18 Patienten war wegen mangelhafter Angaben eine genauere zeitliche Zuordnung nicht möglich. Es wurde jeweils eine Serumprobe je Patient untersucht.

Der Anteil positiver Ergebnisse lag zwischen 10,5 % (95 %-KI: 0 - 24,3) im Intervall von acht bis 14 Tagen und 21,5 % (95 %-KI: 8,4 - 34,9) im Intervall von 15 bis 60 Tagen nach Erkrankung.

ERGEBNISSE

4.5 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen in verschiedenen Zeitintervallen nach Erkrankung

Abbildung 4: IFAT-Ergebnisse

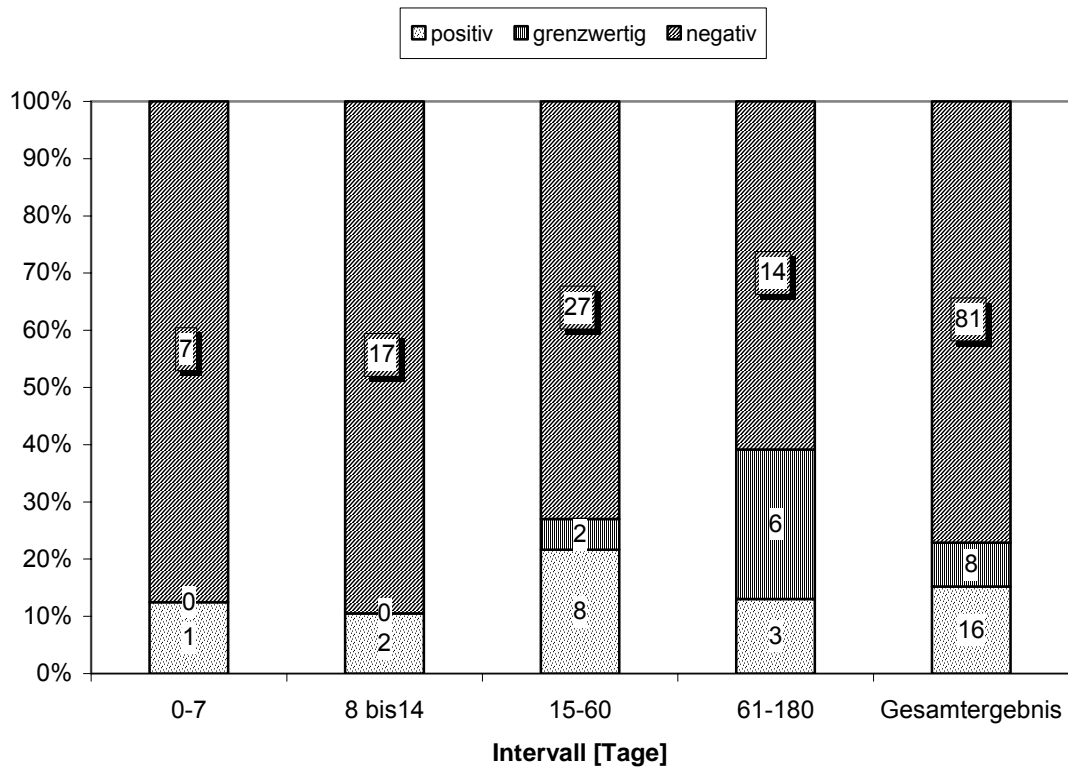


Tabelle 3: Antikörpernachweis im zeitlichen Abstand nach Erkrankung

Intervall [Tage]	0-7	8-14	15-60	61-180	<180
Anzahl	8	19	37	23	105*
IFAT positiv	1	2	8	3	16*
(%)	12.5	10.5	21.6	13.0	15.2
95 %-KI	0-35,4	0-24,3	8,4-34,9	0-26,8	8,4-22,1

*bei 18 Patienten war wegen ungenauer Angaben keine Zuordnung möglich

ERGEBNISSE

4.6 Angaben zur Diagnose

Diagnostizierte Malaria tropica wurde von 20 Patienten angegeben, weitere zwei Patienten berichteten über eine komplizierte Malaria tropica, Malaria tertiana wurde zwölfmal angegeben.

Von einem Patienten wurde Malaria tropica und Malaria tertiana zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten und von einem Patienten eine Mischinfektion angegeben.

Ein Patient berichtete, dass Malaria quartana diagnostiziert worden sei.

In den übrigen Fällen wurde von den Patienten „Malaria“ angegeben ohne genauer zu differenzieren.

Insgesamt zwölf Patienten berichteten, während des letzten Auslandsaufenthaltes mehrfach Malaria gehabt zu haben. Bei zwei dieser Patienten war das IFAT-Ergebnis positiv.

Tabelle 4: Angaben zu Diagnose und IFAT-Ergebnisse

Angaben zur Diagnose	Anzahl	IFAT-Ergebnisse		
		positiv	grenzwertig	negativ
Malaria tropica	20	4	3	13
Komplizierte Malaria (tropica)	2	-	-	2
Malaria tertiana	12	4	1	7
Malaria tropica und Malaria tertiana zu verschiedenen Zeitpunkten	1	-	-	1
Mischinfektion mit <i>P. falciparum</i> und <i>P. vivax</i>	1	-	-	1
Malaria quartana	1	-	-	1

4.7 Angaben zur Malariaphylaxe

Von 32 der Patienten wurde eine medikamentöse Prophylaxe angegeben, die den zum Zeitpunkt der Reise aktuellen Empfehlungen der DTG entsprach. Bei keinem dieser Patienten war das Ergebnis des IFAT positiv.

Eine unvollständige Einnahme der Medikamente oder die Einnahme von Malariamedikamenten, die nicht den aktuellen Empfehlungen entsprachen, wurde von 15 Patienten angegeben, die Einnahme verschiedener Malariamedikamente von drei Patienten. Einnahme eines hier nicht bekannten Malariamedikaments und Einnahme von homöopathischen Medikamenten zur Malariaphylaxe wurde jeweils von einem angegeben. 52 Patienten gaben an, keine medikamentöse Prophylaxe durchgeführt zu haben, was bei einem Teil auch der Empfehlung der DTG für das jeweilige Reiseziel entsprach.

Bei einem Patienten waren keine Angaben zur Prophylaxe verfügbar.

Keiner der Patienten mit positivem Ergebnis der serologischen Untersuchung hatte zur Prophylaxe empfohlene Malariamedikamente eingenommen, 13 dieser Patienten hatte keine Chemoprophylaxe angewendet.

ERGEBNISSE

Tabelle 5: Angaben zu Medikamenten zur Malariaphylaxe und IFAT-Ergebnisse

Medikament	Anzahl	IFAT-Ergebnis		
		positiv	grenzwertig	negativ
Keine Medikamente	52	13	5	34
Atovaquon/Proguanil	10	-	1	9
Doxycyclin	1	-	-	1
Mefloquin	21	-	1	20
Atovaquon/Proguanil unregelmäßig	1	-	-	1
Doxycyclin unregelmäßig	1	-	-	1
Mefloquin unregelmäßig	6	-	1	5
Chloroquin	2	-	-	2
Chloroquin unregelmäßig	1	1	-	-
Chloroquin/Proguanil	3	-	-	3
Chloroquin/Proguanil unregelmäßig	1	-	-	1
Homöopathische Globuli	1	1	-	-
verschiedene	3	1	-	2
Andere	1	-	-	1
Keine Angaben	1	-	-	1

4.8 Angaben zur Malariabehandlung (Medikamente)

Viele der Patienten gaben an, mehrere Medikamente erhalten zu haben. Eine Behandlung mit Artemisininderivaten wurde von 44 Personen angegeben, von 24 als einziges Medikament, ansonsten wurden zusätzlich angegeben: Lumefantrin, Amodiaquin, Sulfadoxin/Pyrimethamin, Mefloquin, Chinin, Atovaquon/Proguanil, Doxycyclin, Ciprofloxacin oder ein sonstiges Antibiotikum.

Chinin-Behandlungen wurden 13-mal angegeben, bis auf zweimal davon wurden zusätzlich angegeben: Artemisininderivat, Doxycyclin, Atovaquon/Proguanil, Halofantrin, Ciprofloxacin oder ein Cephalosporin. Fünf Patienten berichteten, dass ihnen Chinin parenteral (intravenös oder intramuskulär) verabreicht wurde.

Eine Chloroquinbehandlung wurde von 18 Patienten angegeben, davon fünfmal nur Chloroquin, neunmal eine Behandlung mit Chloroquin und Primaquin und ansonsten zusätzlich: Proguanil, Atovaquon/Proguanil, Sulfadoxin/Pyrimethamin.

Amodiaquin wurde viermal zusammen mit einem Artemisininderivat angegeben und davon einmal zusätzlich zu Sulfadoxin/Pyrimethamin.

Sulfadoxin/Pyrimethamin wurde zehnmal als einziges Medikament angegeben, sechsmal wurden zusätzlich weitere Medikamente angegeben (Artemisininderivat, Amodiaquin, Chloroquin, Chinin, Halofantrin, Atovaquon/Proguanil).

Mefloquin wurde fünfmal, davon zweimal als einziges Medikament und ansonsten zusätzlich zu Ciprofloxacin, Artemisininderivat und Ciprofloxacin und einmal einem unbekanntem Medikament angegeben.

Eine Behandlung mit Halofantrin wurde zweimal angegeben, einmal zusätzlich zu Chinin i.v. und einmal zusätzlich zu Sulfadoxin/Pyrimethamin.

ERGEBNISSE

4.9. Kontrollgruppe

Seren von nicht-immunen Patienten mit in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin nachgewiesener *Malaria tropica* bzw. *Malaria tertiana* (*P. vivax*-Infektion) ohne erneute Exposition wurden mittels IFAT auf Malaria-Antikörper untersucht.

Tabelle 6: IFAT – Ergebnisse der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf nach *Malaria tropica* 119 Patienten, 153 Serumproben

Intervall [Tage]	0-7	8-14	15-60	61-180	<180	>180
Anzahl der Seren	63	22	41	19	145	8
IFAT positiv	25	19	39	14	97	1
Proportion [%]	39,7	86,4	95,1	73,7	66,9	12,5
95 %-KI	27,6-51,8	72,0-100	88,5-100	53,9-93,5	59,2-74,6	0-35,4

Tabelle 7: IFAT – Ergebnisse der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf nach *Malaria tertiana* (*P. vivax*) 57 Patienten, 88 Serumproben

Intervall [Tage]	0-7	8-14	15-60	61-180	<180	>180
Anzahl der Seren	26	8	21	11	66	22
IFAT positiv	16	8	19	11	54	17
Proportion [%]	61,5	100	90,5	100	81,8	77,3
95 %-KI	42,8-80,2	-	77,2-100	-	72,5-91,1	59,8-94,8

ERGEBNISSE

Tabelle 8: Vergleich der IFAT-Ergebnisse beider Gruppen im zeitlichen Verlauf

Intervall [Tage]	0-7	8-14	15-60	61-180	<180
Kontrollgruppe, Ergebnisse für beide Spezies					
Anzahl der Seren	89	30	62	30	211
IFAT positiv	41	27	58	25	151
Proportion [%]	46.1	90.0	93.5	83.3	71.6
95 %-KI	35,7-56,4	79,3-100	87,4-99,7	70,0-96,7	65,5-77,7
Patienten dieser Untersuchung					
Anzahl der Seren	8	19	37	23	105
IFAT positiv	1	2	8	3	16
Proportion [%]	12,5	10,5	21,6	13,0	15,2
95 %-KI	0-35,4	0-24,3	8,4-34,9	0-26,8	8,4-22,1
p-Wert *	0,67 **	<0,001 **	<0,001	<0,001 **	<0,001

* Vergleich der Proportion positiver Ergebnisse beider Gruppen

** Fisher exact test

5. Diskussion

5.1 Antikörpernachweis

Die Antikörperbildung ist bei verschiedenen Personen unterschiedlich und wird möglicherweise durch die Parasiten selbst, durch Höhe und Dauer der Parasitämie, Rezidive oder wiederholte Infektionen und wahrscheinlich auch durch immunologische Eigenschaften des Wirts beeinflusst. Bei Nichtimmunen sind während der ersten Tage nach Erkrankungsbeginn meist noch keine und nach einigen Monaten häufig keine Antikörper gegen Plasmodien mehr nachweisbar [15; 19; 44; 47]. Möglicherweise können auch bei kurzer Dauer der Parasitämie bei frühzeitiger Behandlung Antikörper später nicht nachgewiesen werden. Wegen großer interindividueller Unterschiede der serologischen Ergebnisse, sind zuverlässige Rückschlüsse auf den Infektionszeitpunkt nicht möglich.

Im Gegensatz zu Antikörpern gegen Sporozoiten-Antigen sind Antikörper gegen erythrozytäre Formen üblicherweise nicht nachweisbar nach asymptomatischer Infektion, die z.B. bei Reisenden, die Chemoprophylaxe angewendet haben auftreten kann [29].

Bei Personen, die über längere Zeit in Malariagebieten leben, kann der Nachweis von Antikörpern auf eine kürzlich durchgemachte Malaria, auf frühere Malaria mit Antikörperpersistenz, aber auch auf eine bestehende, eventuell asymptomatische Parasitämie hinweisen. Aus diesem Grund wurden in dieser Untersuchung nur Personen, die nicht aus Malariagebieten stammen oder über längere Zeiträume in Malariagebieten gelebt hatten (hier definiert als über drei Jahre Aufenthalt), berücksichtigt.

5.2 Serologische Testmethode

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Malariaerreger wurde der IFAT eingesetzt, der sich als spezifische und sensitive Methode auszeichnet, international als Standardmethode verwendet wird und seit vielen Jahren an der AITM durchgeführt wird. Nachteile sind die aufwendige Herstellung des Testes und die subjektive Beurteilung durch das visuelle Ablesen der Ergebnisse im Fluoreszenzmikroskop.

Durch Einsatz von *P. falciparum* und *P. vivax* als Antigen und Bestimmung des höheren der beiden Titer können abgelaufene Infektionen unterschieden werden, wobei jedoch Kreuzreaktionen untereinander vorkommen und interindividuelle Variationen beachtet werden müssen [17; 19].

Die Spezifität des IFAT für Malaria-Antikörper wurde in früheren Untersuchungen der AITM an Patienten, die nie in einem Malariagebiet gewesen sind und nie eine Malaria durchgemacht hatten, überprüft und lag bei 100% [19].

Die IFAT Ergebnisse der Kontrollgruppe zeigen, wie bereits in früheren Untersuchungen festgestellt wurde, dass nicht in jedem Fall Antikörper nach einer Malaria nachweisbar sind [15; 19; 47; 48].

Innerhalb der Zeitspanne von einer Woche bis sechs Monate nach Erkrankung bzw. Diagnosestellung waren bei 66,9 % der Patienten nach nachgewiesener Malaria tropica und bei 81,8 % nach Malaria tertiana die Ergebnisse des IFAT positiv. Die höchsten Raten von positiven Ergebnissen lagen innerhalb der Zeitspanne von 8 bis 60 Tagen vor: 86,4 - 95,1 % nach Malaria tropica und 90,5 – 100 % nach Malaria tertiana. Eine Bestätigung von durchgemachter Malaria sollte somit in den meisten Fällen innerhalb dieses Zeitraums möglich sein.

Ein Zusammenhang des Alters der Seren (Dauer der Lagerung bei -20°C) und den Ergebnissen des IFAT ist denkbar, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Andere serologische Testmethoden, wie z.B. neuere ELISAs, unterscheiden sich möglicherweise hinsichtlich Sensitivität und Spezifität [14; 22], das Verhältnis der Ergebnisse beider in dieser Arbeit untersuchter Gruppen wäre wahrscheinlich jedoch ähnlich wie in dieser Untersuchung.

5.3 Patienten dieser Untersuchung

5.3.1 Patienten

Von keinem der Patienten war eine relevante Immunsuppression zum Untersuchungszeitpunkt bekannt, die die Serologie-Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

Der Anteil positiver IFAT-Ergebnisse der Patienten, die angaben, während des Auslandsaufenthaltes Malaria durchgemacht zu haben ist innerhalb des untersuchten Zeitraums von sechs Monaten nach Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr niedrig.

Der seropositive Anteil lag bei 16/105 (15,2 %) im Vergleich zu 151/211 (71,6 %) bei der Kontrollgruppe. Innerhalb des Zeitraums von 8 bis 60 Tagen nach Erkrankung, während dem der Anteil positiver Ergebnisse in beiden Gruppen am höchsten war, zeigten 92 Seren der Kontrollgruppe und 56 Seren der Reisenden positive Anteile von 92,4 % bzw. 17,9 %.

Vermutlich ist bei den meisten der untersuchten Patienten während ihres Auslandsaufenthaltes eine Behandlung ohne zuverlässige parasitologische Bestätigung erfolgt. Nur ein kleiner Teil der Patienten konnte genaue Angaben zur Diagnose machen, einige brachten Laborbefunde oder Arztbriefe mit.

Wegen der Inkubationszeit kann bei einem der Patienten, der nur eine sechstägige Reisedauer angab, die Diagnose Malaria während des Auslandsaufenthaltes angezweifelt werden, da Malaria frühestens am letzten Tag der Reise oder bei Exposition während eines vorherigen Aufenthaltes in Endemiegebieten möglich wäre.

5.3.2 Prophylaxe

Es fällt auf, dass keiner der Patienten bei denen durch das positive Ergebnis des IFAT rückwirkend eine durchgemachte Malaria bestätigt werden konnte, eine regelmäßige Einnahme von Malariamedikamenten, die zum Zeitpunkt der Reise zur Prophylaxe empfohlen worden sind, angegeben hat. 10 der 16 Patienten waren in Hochrisikogebieten im tropischen Afrika erkrankt.

Andererseits waren bei keinem der Patienten, die eine regelmäßige Chemoprophylaxe mit den derzeit hierzu empfohlenen Medikamenten Atovaquon/Proguanil, Mefloquin oder Doxycyclin [16] angaben, Antikörper nachweisbar, was somit auf eine gute prophylaktische Wirksamkeit hinweist.

5.3.3 Behandlung

Angaben zur Behandlung waren unvollständig und oft ungenau. Es wurden jedoch Medikamente und Verabreichungsarten mit Risikopotential genannt, wie z.B. der Einsatz des Medikaments Halofantrin mit möglicher arrhythmogener Wirkung und dem Risiko, lebensbedrohliche ventrikuläre Rhythmusstörungen auszulösen, oder die parenterale Verabreichung von Medikamenten mit dem Risiko der Übertragung von Krankheitserregern.

Das Auftreten ernsthafter Nebenwirkungen, die auf die erfolgte Behandlung zurückgeführt wurden, ist im Rahmen dieser Untersuchung nicht festgestellt worden.

5.4 Probleme der Diagnose

Die mangelhafte Qualität der Malariadiagnostik ist ein bekanntes Problem. Fehler können bei der Qualität der Materialien, der Durchführung der Untersuchungen und der Interpretation der Ergebnisse auftreten.

Fehlende Qualifikation des Untersuchers, fehlerhafte Methodik z.B. bei Probengewinnung oder Transport, Fixierung, Färbung, sowie sehr niedrige Parasitämie, Verschleppung von parasitenreichen Präparaten bei Küvettenfärbung mehrerer Proben, besonders beim dicken Tropfen, oder Fehler bei der mikroskopischen Beurteilung (Artefakte, z.B. Schmutz- und Farbstoffpartikel, Thrombozyten, die zufällig auf Erythrozyten liegen, verschmutzte und beschädigte Mikroskope oder Verwechslung mit Howell-Jolly bodies, Babesiose) können zu falschen Ergebnissen führen.

Nicht überall sind adäquate und ausreichende Ressourcen wie z.B. funktionierende Mikroskope und ausgebildetes Personal, ausreichend, permanent oder überhaupt vorhanden [4; 7]. Wegen mangelhafter diagnostischer Möglichkeiten ist die Diagnose Malaria häufig nicht korrekt [13]. Viele Ärzte in Endemiegebieten verlassen sich außerdem nicht immer auf Laborergebnisse [11; 33; 34; 49]. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass es durch klinische Malaria-Diagnose im Vergleich zur mikroskopischen Bestätigung zu hohen Raten von Überschätzung kommt [2, Review].

Nach WHO-Empfehlung sollten Patienten auf Basis der klinischen Diagnose behandelt werden, falls parasitologische Untersuchungsergebnisse nicht innerhalb kurzer Zeit (zwei Stunden) nachdem sich der Patient vorgestellt hat, erhältlich sind [46]. Die klinische Diagnose, die auf Symptomen und Befunden der körperlichen Untersuchung beruht, ist jedoch ungenau und in verschiedenen Regionen unterschiedlich [10; 18; 26]. Auch mit parasitologischer Untersuchung ist die Diagnose oft nicht zuverlässig [3; 11; 13; 32-34; 42; 49], und hinzu kommt bei semiimmunen Patienten die Schwierigkeit zu beurteilen, ob eine Parasitämie auch Krankheitsursache [6] ist.

DISKUSSION

Malaria bleibt in vielen Fällen eine klinische Diagnose [3; 11; 13; 18; 28; 32-34] und somit eine Verdachtsdiagnose.

Falsch negative Ergebnisse können zu verspäteter Diagnose und Behandlung und so auch zu erhöhter Morbidität und Mortalität führen, und die Entscheidung, bei Verdacht zu behandeln, kann Leben retten.

Die zu viel diagnostizierte Malaria („over-diagnosis“), bringt jedoch auch Probleme mit sich, besonders für die Menschen, die in Endemiegebieten leben [2, Review].

Die Fehldiagnose Malaria kann zu fehlender oder verzögerter Diagnose und Behandlung anderer, potentiell lebensbedrohender Erkrankungsursachen führen [32]. Überhöhter Medikamentenverbrauch [50], unnötige Infektionsrisiken durch Injektionen oder Nebenwirkungen / Toxizität von Malariamedikamenten oder gefälschten Medikamenten sind weitere mögliche Folgen.

Der übermäßige Gebrauch von Medikamenten bei der Bevölkerung in Endemiegebieten könnte, besonders nach Einführung der Artemisinin-basierten Kombinationsbehandlung (ACT) als Therapieempfehlung durch die WHO [46], die Aufrechterhaltung der Medikamentenversorgung beeinträchtigen und könnte außerdem auch als wichtiger Faktor zu befürchteter Resistenzentwicklung beitragen.

Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit wäre vorteilhaft [28; 50]. Da es nicht einfach ist qualitativ gute mikroskopische Diagnostik aufrechtzuerhalten, wird die Einführung anderer diagnostischer Methoden, wie Schnelltests, die auch von wenig ausgebildetem Personal durchgeführt werden können, trotz der höheren Kosten zunehmend propagiert [5; 25].

6. Schlussfolgerungen

Obwohl ein negatives Ergebnis der serologischen Untersuchungen auf Malaria-Antikörper nicht beweist, dass jemand keine Malaria hatte, weisen die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf hin, dass ein großer Teil der Patienten, die eine durchgemachte Malaria angaben, wahrscheinlich nicht kürzlich an Malaria erkrankt gewesen sind. Der Anteil positiver serologischer Ergebnisse innerhalb des untersuchten Zeitraums von sechs Monaten nach Erkrankung ist im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr niedrig. Positive Ergebnisse lagen bei 16 von 105 (15,2 %) der Seren von Reisenden im Vergleich zu 151 von 211 (71,6 %) der Seren der Kontrollgruppe vor. Innerhalb des Zeitraums von 8 bis 60 Tagen nach Erkrankung während dem der Anteil positiver Ergebnisse in beiden Gruppen am höchsten war lag der Anteil positiver Ergebnisse bei 17,9 % (n = 56) bzw. 92,4 % (n = 92). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inzidenz von Malaria während Reisen stark überschätzt wird und die Qualität der medizinischen Versorgung in vielen Malariaendemiegebieten unzureichend ist, auch wenn die in der AIMT untersuchten Patienten nur eine kleine Auswahl der Reisenden repräsentieren, und Reisende nur ein kleiner Teil der Menschen sind, die mit Malaria konfrontiert werden.

7. Zusammenfassung

Malaria ist bezüglich Morbidität und Mortalität weltweit eine der bedeutendsten parasitären Infektionskrankheiten. Malaria muss bei allen Patienten mit Fieber, auch bei Reisenden, die sich in Endemiegebieten aufhalten oder aufgehalten haben differentialdiagnostisch in Betracht bezogen werden und ausgeschlossen bzw. diagnostiziert werden. In vielen Endemiegebieten kann die Malaria-Diagnose wegen mangelhafter diagnostischer Möglichkeiten jedoch ungenau sein. Um die Validität der Malaria-Diagnose bei Reisenden in Endemiegebieten zu überprüfen, wurde die retrospektive Bestätigung durch Nachweis von spezifischen Antikörpern untersucht.

Seren von 105 nicht-immunen Reisenden, die sich in der Ambulanz der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, München in den Jahren 2003 bis 2005 vorgestellt haben und über eine während eines Aufenthaltes in einem Endemiegebiet während der letzten sechs Monate diagnostizierte Malaria berichtet haben, wurden mittels eines indirekten Immunfluoreszenz-Antikörper-Test auf Antikörper gegen erythrozytäre Formen von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* untersucht. 241 Seren von Nachuntersuchungen von 176 nicht-immunen Patienten, bei denen in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin eine Malaria parasitologisch diagnostiziert worden war, dienten als Kontrollgruppe.

Antikörper gegen Plasmodien waren im Zeitraum von 180 Tagen nach angegebenem Erkrankungszeitpunkt nur bei 16 von 105 Reisenden (15,2 %) nachweisbar. In der Kontrollgruppe zeigten 71,6 % der untersuchten Seren (151 von 211) positive Ergebnisse in diesem Zeitintervall. Im Zeitintervall von 8 bis 60 Tagen nach während der Reise diagnostizierter bzw. parasitologisch nachgewiesener Malaria, lag der Anteil positiver IFAT-Ergebnisse bei 17,9 %, bzw. 92,4 %.

Auch wenn ein negatives Ergebnis der serologischen Untersuchungen auf Malaria-Antikörper nicht beweist, dass jemand keine Malaria hatte, weisen die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf hin, dass ein großer Teil der Patienten, die eine durchgemachte Malaria angaben, wahrscheinlich nicht an Malaria erkrankt waren und dass die Malaria-Diagnose während einer Reise in Endemiegebieten häufig inkorrekt ist.

8. Abkürzungen

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AITM	Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
ACT	Artemisinin-based combination therapy
Ak	Antikörper
C	Celsius
CDC	Centers for Disease Control
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin
franz.	französisch
Hg	Quecksilber
HIV	Human immunodeficiency virus
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IgG	Immunglobulin G
ital.	italienisch
i.v.	intravenös
KI	Konfidenzintervall
lat.	lateinisch
n	Grundgesamtheit
nm	Nanometer
P	Proportion
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PfHRP-2	<i>Plasmodium falciparum</i> -histidine rich protein 2
pLDH	parasitenspezifische Laktatdehydrogenase
QBC	Quantitative Buffy Coat
RKI	Robert Koch-Institut
SEP	Standard Fehler einer Proportion

ABKÜRZUNGEN

TM	trademark
v.Chr.	vor Christus
W	Watt
WHO	World Health Organization
z	kritischer Wert
z.B.	zum Beispiel
α	Fehler der 1. Art
μl	Mikroliter

9. Literaturverzeichnis

1. Ambroise-Thomas P. The immunofluorescence reaction in the seroimmunological study of malaria. *Bull World Health Organ.* 1974;50:267-76.
2. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet.* 2004;364:1896-98.
3. Barat L, Chipipa J, Kolczak M, Sukwa T. Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia? *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:1024-30.
4. Bates I, Bekoe V, Asamoah-Adu A. Improving the accuracy of malaria-related laboratory tests in Ghana. *Malar J.* 2004;3:38.
5. Bell D, Wongsrichanalai C, Barnwell JW. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(9 Suppl):S7-20. Review.
6. Berkley JA, Maitland K, Mwangi I, Ngetsa C, Mwarumba S, Lowe BS, Newton CR, Marsh K, Scott JA, English M. Use of clinical syndromes to target antibiotic prescribing in seriously ill children in malaria endemic area: observational study. *BMJ.* 2005;330(7498):995. Epub 2005 Mar 29.
7. Bojang KA, Obaro S, Morison LA, Greenwood BM. A prospective evaluation of a clinical algorithm for the diagnosis of malaria in Gambian children. *Trop Med Int Health.* 2000;5(4):231-36.
8. Bruce-Chwatt LJ, Dodge JS, Draper CC, Topley E, Voller A. Sero-epidemiological studies on population groups previously exposed to malaria. *Lancet.* 1972;1(7749):512-15.

LITERATURVERZEICHNIS

9. CDC [homepage on the Internet]. Preventing malaria in travellers (brochure). [cited 2007 Jul 1]. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/pdf/travelers.pdf>.
10. Chandramohan D, Jaffar S, Greenwood B. Use of clinical algorithms for diagnosing malaria. *Trop Med Int Health*. 2002;7:45-52. Review.
11. Chandler CI, Jones C, Boniface G, Juma K, Reyburn H, Whitty CJ. Guidelines and mindlines: why do clinical staff over-diagnose malaria in Tanzania? A qualitative study. *Malar J*. 2008;7:53.
12. Collins WE, Skinner JC, Jeffery GM. Studies on the persistence of malaria antibody response. *Am J Epidemiol*. 1968;87:592-98.
13. Dini L, Frean J. Quality assessment of malaria laboratory diagnosis in South Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:675-77.
14. Doderer C, Heschung A, Guntz P, et al. A new ELISA kit which uses a combination of Plasmodium falciparum extract and recombinant Plasmodium vivax antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J*. 2007; 6:19.
15. Draper CC, Sirr SS. Serological investigations in retrospective diagnosis of malaria. *Br Med J*. 1980;280(6231):1575-76.
16. DTG Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit: Empfehlungen zur Malariavorbeugung. Stand März 2008. Homepage im Internet: <http://www.dtg.org/malaria.html>.
17. Fisher GU, Sulzer AJ, Wilson M, Runcik K. Fluorescent-antibody patterns in naturally acquired vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1970;19(2):209-14.
18. Font F, Alonso Gonzalez M, Nathan R, Kimario J, Lwilla F, Ascaso C, Tanner M, Menendez C, Alonso PL. Diagnostic accuracy and case management of clinical malaria in the primary health services of a rural area in south-eastern Tanzania. *Trop Med Int Health*. 2001;6:423-28.

LITERATURVERZEICHNIS

19. Jelinek T, von Sonnenburg F, Kumlien S, Loscher T, Nothdurft HD.
Retrospective Immunodiagnosis of Malaria in Nonimmune Travelers Returning From the Tropics. *J Travel Med.* 1995;2:225-28.
20. Jensen JB. Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 1978;27:1274-76;
21. Kilian AH, Metzger WG, Mutschelknauss EJ, Kabagambe G, Langi P, Korte R, von Sonnenburg F: Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. *Trop Med Int Health.* 2000;5(1):3-8.
22. Kitchen AD, Lowe PH, Laloo K, Chiodini PL. Evaluation of a malarial antibody assay for use in the screening of blood and tissue products for clinical use. *Vox Sang.* 2004;87:150-55.
23. Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang.* 2006;90:77-84. Review.
24. Korenromp E, Miller J, Nahlen B, Wardlaw T, Young M: World Malaria Report 2005. [cited 2007 Jul 1]. WHO, RBM, UNICEF. Available from: <http://rbm.who.int/wmr2005/>.
25. Lubell Y, Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Chonya K, Whitty CJ, Mills A. The cost-effectiveness of parasitologic diagnosis for malaria-suspected patients in an era of combination therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(6 Suppl):128-32.
26. Luxemburger C, Nosten F, Kyle DE, Kiricharoen L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Clinical features cannot predict a diagnosis of malaria or differentiate the infecting species in children living in an area of low transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92:45-9.

LITERATURVERZEICHNIS

27. Manawadu BR, Voller A. Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria. *Trans Roy Soc Med Hyg.* 1978;72:456-62.
28. Masika PM, Semarundu WJ, Urassa R, Mosha J, Chandramohan D and Gosling RD. Over-diagnosis of malaria is not a lost cause. *Malaria Journal.* 2006;5:120.
29. Nothdurft HD, Jelinek T, Blüml A, et al. Seroconversion to circumsporozoite antigen of *Plasmodium falciparum* demonstrates a high risk of malaria transmission in travelers to East Africa. *Clin Infect Dis.* 1999; 28:641-642.
30. 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(5):357-63.
31. Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso ML, Newton CR: The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(9):582-88.
32. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, Saganda K, Shao J, Kitua A, Olomi R, Greenwood BM, Whitty CJ: Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ.* 2004;329:1212-17.
33. Reyburn H, Ruanda J, Mwerinde O, Drakeley C. The contribution of microscopy to targeting antimalarial treatment in a low transmission area of Tanzania. *Malar J.* 2006;5:4.
34. Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Mwerinde O, Olomi R, Drakeley C, Whitty CJ. Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomised trial. *BMJ.* 2007;334(7590):403. Epub 2007 Jan 26.

LITERATURVERZEICHNIS

35. Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2006, Berlin, 2007.
36. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*. 2004;363:1017-24.
37. Statistisches Bundesamt: Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Fachserie 12 Reihe 6.2.1 Erscheinungsfolge: jährlich.
38. Steffen R, Fuchs E, Schildknecht J, Naef U, Funk M, Schlagenhauf P, Phillips-Howard P, Nevill C, Stürchler D. Mefloquine compared with other malaria chemoprophylactic regimens in tourists visiting east Africa. *Lancet*. 1993;341(8856):1299-303.
39. Targett GA. Antibody response to Plasmodium falciparum malaria. Comparisons of immunoglobulin concentrations, antibody titres and the antigenicity of different asexual forms of the parasite. *Clin Exp Immunol*. 1970;7:501-17;
40. Toble JE, Abele DC, Hill GJ 2nd, Contacos PG, Evans CB. Fluorescent antibody studies on the immune response in sporozoite-induced and blood-induced vivax malaria and the relationship of antibody production to parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1966;15:676-83.
41. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-75.
42. Van Dillen J, De Jager AJ, De Jong I, Wendte JF. Overdiagnosis of malaria in hospitalized patients in Namibia. *Trop Doct*. 2007;37(3):185-86.
43. Voller A, O'Neill P. Immunofluorescence Method Suitable for Large-scale Application to Malaria. *Bull World Health Organ*. 1971;45:524-29.

LITERATURVERZEICHNIS

44. Voller A, Draper CC. Immunodiagnosis and sero-epidemiology of malaria. Br Med Bull. 1982;38:173-77. Review.
45. WHO memorandum. Malaria parasite strain characterization, cryopreservation, and banking of isolates. Bull World Health Organ. 1981;59:537-48.
46. WHO: Guidelines for the treatment of malaria. ISBN 92 4 154694 8 (NLM classification: WC 770). ISBN 978 92 4 154694 2 WHO/HTM/MAL/2006.1108.
47. Wilson M, Sulzer AJ, Runcik K. Malaria antibody patterns as determined by the IFA test in U.S. serviceman after chemotherapy. Am J Trop Med Hyg. 1970;19:401-4.
48. Wilson M, Fife EH Jr, Mathews HM, Sulzer AJ. Comparison of the complement fixation, indirect immunofluorescence, and indirect hemagglutination tests for malaria. Am J Trop Med Hyg. 1975;24:755-59.
49. Zurovac D, Midia B, Ochola SA, English M, Snow RW. Microscopy and outpatient malaria case management among older children and adults in Kenya. Trop Med Int Health. 2006;11:1-9.
50. Zurovac D, Larson BA, Akhwale W, Snow RW. The financial and clinical implications of adult malaria diagnosis using microscopy in Kenya. Trop Med Int Health. 2006;11:1185-94.

Quellen:

Abbildung 1:

<http://malaria.who.int/images/malariaandtravellers/malaria2006-WHO-Hires.pdf>

Abbildung 2:

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>

DANKSAGUNG

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Thomas Löscher danke ich sehr für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit und die gute Betreuung. Ihm und allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre Unterstützung.

11. Lebenslauf

Isabel Barreto Miranda,
geboren am 11.03.1975 in Pforzheim

Ausbildung

1985 – 1994	Albertus-Magnus-Gymnasium, Ettlingen
1995 – 2002	Medizinstudium an der Universität Hamburg
2003	Diplom-Kursus für Tropenmedizin am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Berufserfahrung

2003/2004	Ärztin im Praktikum und
seit 2004	Ärztin an der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin und der Medizinischen Klinik – Innenstadt der Ludwig Maximilians Universität München

Publikationen

Schunk M, Kumma WP, Barreto Miranda I, Osman ME, Roewer S, Alano A, Löscher T, Bienzle U, Mockenhaupt FP. High prevalence of drug-resistance mutations in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in southern Ethiopia. *Malaria Journal* 2006, 5:54.

Schönfeld M, Barreto Miranda I, Schunk M, Maduhu I, Maboko L, Hoelscher M, Berens-Riha N, Kitua A, Löscher T. Molecular surveillance of drug-resistance associated mutations of *Plasmodium falciparum* in south-west Tanzania. *Malaria Journal* 2007, 6:2.

Peter Borowski, Maite v. Heising, Isabel Barreto Miranda, Ching-Len Liao, Joonho Choe, Andrea Baier. Viral NS3 helicase activity is inhibited by peptides reproducing the Arg-rich conserved motif of the enzyme (motif VI). *Biochemical Pharmacology* (2008) *In Press, Available online 6 April 2008*