

**Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Diagnostik, Prävalenz und Komplexität der
Plasmodieninfektion bei drei Monate alten Kindern
aus der Ashanti-Region, Ghana**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Rieke Katja Neuhoff
aus
Esslingen am Neckar**

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Groß

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. H. Schwörer

III. Berichterstatter/in: -

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

	Seitenzahl
1	Einleitung 1
1.1	Epidemiologie 1
1.2	Parasitologie 2
1.2.1	Lebenszyklus des Plasmodiums 2
1.2.2	Vielfalt der Infektion 3
1.3	Pathogenese und Klinik 5
1.3.1	Pathogenese der Malaria tropica des Kindes 5
1.3.2	Klinik der Malaria tropica 6
1.4	Diagnostik 7
1.5	Immunität 9
1.5.1	Immunität im Sinne einer angeborenen Resistenz 9
1.5.2	Erworbene Immunität 10
1.6	Ziel dieser Arbeit 12
2	Material und Methoden 13
2.1	Studiendesign 13
2.2	Mikroskopie 14
2.3	DNA-Isolierung 15
2.4	DNA-Quantifizierung 16
2.5	PCR-Malariadiagnostik 16
2.5.1	Genus- und Spezies-spezifische PCR 16
2.5.2	Gelelektrophorese 19
2.6	MSP-Genotypisierung von <i>P. falciparum</i> 20

2.6.1	Allel-spezifische PCR	20
2.6.2	Genetic Analyser	22
2.7	Falldefinitionen und diagnostische Parameter	26
2.8	Datenanalyse	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Ergebnisse der Mikroskopie	28
3.1.1	Prävalenz und Parasitämien	28
3.1.2	Qualität der Mikroskopie	28
3.2	DNA-Isolierung	31
3.3	Messung der DNA-Konzentration mittels Fluoreszenz-Methodik (PicoGreen)	31
3.4	Genus- und Spezies-spezifische PCR	32
3.4.1	Prävalenz der Infektion	32
3.4.2	Speziesdifferenzierung	32
3.5	Vergleich Mikroskopie und PCR	32
3.5.1	PCR-Nachweis von Plasmodien und Parasitendichte	32
3.5.2	Sensitivität, Spezifität und positiver prädiktiver Wert der PCR	33
3.5.3	Prävalenzen der Spezies	35
3.6	MSP-1- und -2-Genotypisierung	36
3.6.1	MSP-1- und -2-Längenpolymorphismen	36
3.6.2	Diversität der Infektion	37
3.7	Saisonale Verteilung der Malariainfektion	41
3.7.1	Klima, Prävalenz und Parasitendichte der Infektion	41
3.7.2	Polyklonalität	44

3.8	Klinische Parameter der Studienkinder	48
3.8.1	Symptomatik der Infektion	48
3.8.2	Hämoglobinwert-Veränderungen	49
4	Diskussion	55
4.1	DNA-Isolierung aus Filter-Papieren	55
4.2	Malariadiagnostik	55
4.2.1	Mikroskopie und PCR im Vergleich	55
4.2.2	Malaria – klinisch diagnostiziert?	58
4.3	Prävalenz, saisonales Muster und Diversität der Infektion	60
4.4	Erworbene Immunität und Symptomatik	63
4.5	Anämie	67
4.6	Polyklonalität im Kontext des klinischen Bildes	70
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	77

1 Einleitung

Eine Million Menschen versterben jährlich an Malaria; mehr als 75% von ihnen sind afrikanische Kinder unter fünf Jahren. Nach einer Phase des Nestschutzes entwickelt sich im Kindesalter nach wiederholten Infektionen mit Plasmodien eine Semiimmunität. Der Aufbau von Immunität wird erschwert durch die Variabilität von Oberflächenproteinen des Parasiten. Die Diversität von Plasmodienstämmen kann mittels einer Genotypisierung der polymorphen Markergene ermittelt werden. Das Verständnis der Entwicklung von Immunität ist Voraussetzung einer Impfstoffentwicklung.

Anhand einer Studiengruppe von 1070 drei Monate alten Kindern aus Ghana soll hier die Prävalenz der Infektion und deren klinische Relevanz im frühen Kindesalter dargestellt werden, sowie eine Differenzierung von Plasmodien-Spezies und Subtypen der Erreger im saisonalen Verlauf erfolgen. Die molekulargenetische Diagnostik der Infektion soll mit der Mikroskopie verglichen werden.

1.1 Epidemiologie

Die *World Health Organization* (Weltgesundheitsorganisation, WHO) berichtet von 500 Millionen Fällen klinischer Malaria und einer Million Todesfälle pro Jahr weltweit; 75% der Todesfälle betreffen afrikanische Kinder unter fünf Jahren, fast ausschließlich infiziert von *Plasmodium falciparum* (Black RE et al. 2003; Bryce et al. 2005). In Afrika südlich der Sahara werden jährlich ungefähr 500000 Kinder mit schwerer Malaria in ein Krankenhaus eingeliefert (Roca-Feltrer et al. 2008). Ghana zählte 2008 3,2 Millionen Malariafälle, davon 33% bei den unter Fünfjährigen. 35% der Todesfälle der unter fünf Jahre alten Kinder in Ghana wurden 2008 ursächlich der Malaria zugeschrieben (aus *World Malaria Report* 2009).

Malaria ist in tropischen und subtropischen Regionen endemisch, da die Erreger und ihre Überträgermücken temperaturabhängig sind (vgl. Kapitel 1.2.1). Malariagebiete lassen sich unterteilen in hypo-, meso-, hyper- und holoendemische Gebiete. Für letztere ist – wie in Westafrika typisch – eine hohe Prävalenz der Infektion von über 75% bei den bis zu elf Monate alten Kindern charakteristisch. In hyperendemischen Gebieten bleibt die Transmission ganzjährig und intensiv; jedes zweite Kind im Alter von zwei bis neun Jahren ist mit Malariaparasiten infiziert. In Gebieten instabiler Malaria dagegen ist die Intensität der Malaria stark von saisonalen Schwankungen geprägt. Bezeichnend sind hier Erkrankungen auch im Erwachsenenalter.

Abbildung 1 bietet eine Übersicht der weltweiten unterschiedlichen Endemizitäten.

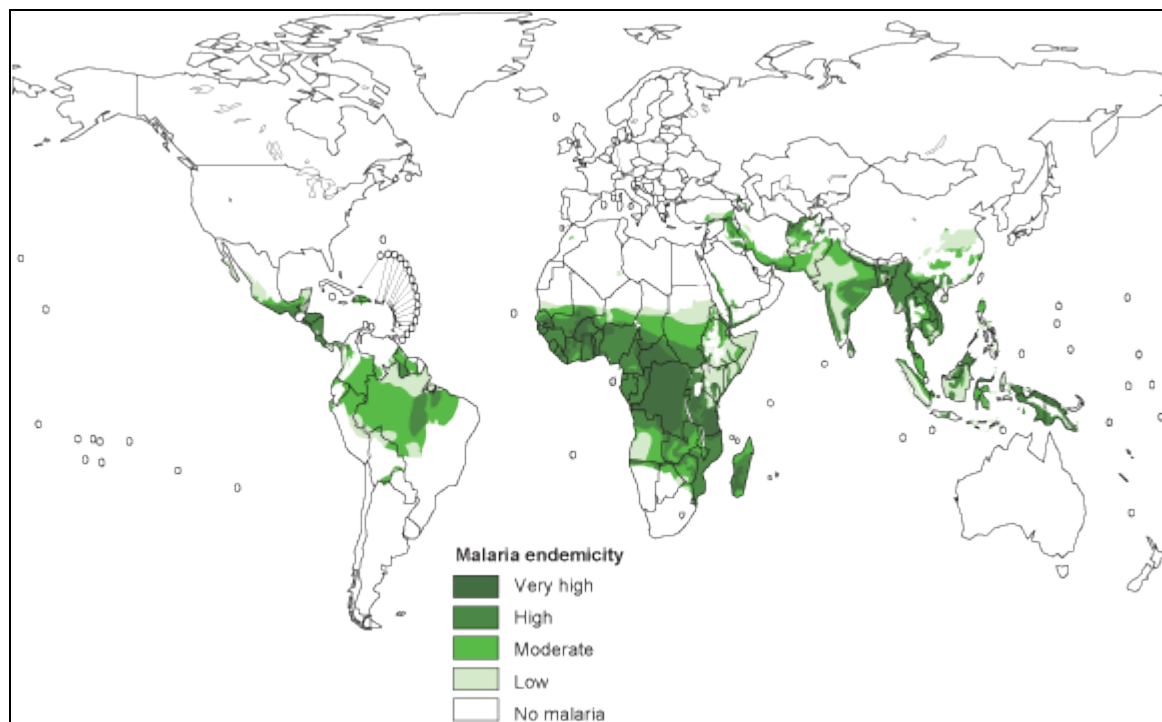


Abbildung 1: Globale Verteilung des Erkrankungsrisikos von Malaria, 2004. Quelle: *Roll back Malaria* (WHO 2005).

1.2 Parasitologie

1.2.1 Lebenszyklus des Plasmodiums

Alphonse Laveran (1845-1922) wurde im Jahr 1907 für die Entdeckung des Malaria-Parasiten mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts konnte das Genom von *P. falciparum* entschlüsselt werden (Gardner et al. 2002). Unter mehr als 100 Spezies von Plasmodium, einem Protozoon, gelten die fünf folgenden als humanpathogene Erreger der Malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und seit neuestem *P. knowlesii*. Zu Erkrankung und Tod führen vor allem die Infektion mit *P. falciparum* und in selteneren Fällen mit *P. vivax*. Die weibliche Anophelesmücke ist Hauptvektor, Menschen und andere Säuger sind Nebenvektoren. Sporozoiten, die infektiösen Stadien der Plasmodien, erreichen in der Blutbahn des Wirts rasch die Leber und dringen in Hepatozyten ein. Innerhalb eines Hepatozyten entwickeln sich aus einem Sporozoiten zehntausende Merozoiten (Gewebschizogonie). Werden die Merozoiten in die Blutbahn entlassen, hüllen sie um sich Bestandteile hepatozytärer Membranen, um der Immunabwehr zu entgehen (Sturm et al. 2006), bevor sie die roten Blutzellen befallen. Bei der Bindung

an Erythrozyten fungieren u.a. das *Erythrocyte Binding Antigen 175* (EBA 175) und Glycophorin A (bei *P.-falciparum*-Infektionen) bzw. das Duffy-Blutgruppen-Antigen (bei *P.-vivax*-Infektionen) als Liganden (Chitnis et al. 1996). Bei seiner Bewegung in die rote Zelle mittels eines Aktin-Myosin-Netzwerks streift der Merozoit einen Großteil seiner Oberflächenmerkmale ab; von dem zuvor die Oberfläche der Plasmamembran dominierenden *Merozoite Surface Protein-1* (MSP-1) bleibt ihm nur ein kleiner 19-kDa-Rest, der mit einem Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI)-Anker fixiert ist. Der intraerythrozytär heranwachsende Trophozoit phagozytiert hauptsächlich Hämoglobin. Er entledigt sich des toxischen eisenhaltigen Abbauprodukts mittels einer Häm-Polymerase unter Bildung von Hämozoin, welches lichtmikroskopisch als Malaria-pigment imponiert. Der infizierte Erythrozyt exprimiert an seiner Oberfläche unter anderem *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1* (PfEMP1), welches das Anheften (Zytoadhärenz) des Erythrozyten an Endothelzellen der Blutgefäße (Sequestration) vermittelt. Der Krankheitsausbruch setzt mit der Multiplikation des Parasiten im Erythrozyten als periodisches „Wechselfieber“ ein: Innerhalb von 48 Stunden (bei *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale*) bzw. 72 Stunden (bei *P. malariae*) bilden sich aus einem Merozoiten circa 20 neue Merozoiten. Sie durchlaufen verschiedene Stadien - Ring, Trophozoit, Schizont - (erythrozytäre Schizogonie) und befallen nach der Zerstörung der roten Blutzelle weitere Erythrozyten. Die Periodizität findet Ausdruck in den Termini Malaria tertiana (*P. vivax* und *P. ovale*) bzw. Malaria quartana (*P. malariae*). Malaria tropica zeigt keine Periodizität, da die Zyklen mehrerer *P.-falciparum*-Familien kaum synchron ablaufen. Während sich die meisten Merozoiten zu asexuellen Schizonten entwickeln, bilden sich aus einigen wenigen Gametozyten die sexuellen Parasitenstadien. Die Anophelesmücke nimmt die mit weiblichen Makro- bzw. mit männlichen Mikrogametozyten infizierten Erythrozyten während ihrer Blutmahlzeit auf. In der Mücke läuft jetzt die sexuelle Vermehrung (Sporogonie) ab: Nach Bildung einer Zygote kommt es zur meiotischen Teilung, und Sporozoiten werden frei. Unterhalb von 16°C kommt die Entwicklung des Parasiten in der Anophelesmücke zum Stillstand (Sachs und Malaney 2002); der plasmodiale Lebenszyklus unterbricht.

1.2.2 Vielfalt der Infektion

1.2.2.1 Mischinfektionen verschiedener Spezies

Mischinfektionen sind in Malariaendemiegebieten häufig (Mayxay et al. 2001). In Westafrika finden sich die humanpathogenen Spezies *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae* (vgl. Kapitel

1.5.1). Neben einem altersabhängigen Spezies-spezifischen Aufbau der Immunität wird auch eine gegenseitige Beeinflussung gleichzeitig vorhandener Spezies diskutiert, die zu einer Limitierung der Parasitendichte und einem Schutz vor schwerer *P.falciparum*-Malaria führen könnten (vgl. Kapitel 1.5.2).

1.2.2.2 Multiplizität der Infektion

Die Multiplizität der Infektion, *Multiplicity Of Infection* (MOI), gibt die Anzahl unterschiedlicher *P.falciparum*-Erregerstämme wieder, die die Infektion eines Individuums ausmacht. MOI wird durch Genotypisierung polymorpher Markergene ermittelt. Longitudinale Studien zeigen, dass Kinder mit neun Klonen und mehr infiziert sein können. Die MOI variiert dabei mit dem Alter: Parallel zu einem Anstieg der Klonanzahl zeichnet sich in Gebieten stabiler Transmission die Entwicklung der Semiimmunität ab (Smith et al. 1999b) (vgl. Kapitel 1.5.2). In einer Studie in Tansania fanden sich bei den bis zwei Jahre alten Kindern mit Plasmodieninfektion nur zwei Erregerstämme pro Isolat; asymptomatische Kinder im Alter von drei bis sieben Jahren dagegen waren im Schnitt mit jeweils fünf Klonen infiziert (Felger et al. 1999). Weitere Studien bestätigen, dass die Prävalenz der Parasitämie und die Komplexität der Infektionen mit den ersten Lebensjahren zunehmen (Branch et al. 2001; Henning et al. 2004; Konate et al. 1999; Mayor et al. 2003). Im Gegensatz dazu kommt es ab dem sechsten Lebensjahr zu einer Reduzierung der Klonanzahl. Die Multiklonalität bleibt allerdings auch bis ins Erwachsenenalter auf einem niedrigeren Niveau erhalten (Owusu-Agyei et al. 2002).

1.2.2.3 MSP-1 und -2-Polymorphismen als Maß der Multiplizität

Die *P.falciparum*-Oberflächenantigene MSP-1 und MSP-2 (*Merozoite Surface Protein-1* bzw. -2) werden im Merozoitenstadium exprimiert. Bei einer infizierten roten Blutzelle werden beide Antigene Bestandteil der erythrozytären Oberfläche. MSP-1 und -2 werden durch ein polymorphes *single-copy*-Gen kodiert; Isolate mit mehr als einem MSP-Allel werden als multiple Infektion eingestuft. Die Genotypisierung der MSP-Allele gilt als Standardmethode der Beurteilung der MOI (Viriyakosol et al. 1995). Das MSP-1-Gen besteht aus 17 eigenständigen Blöcken. Der zweite Block beinhaltet jeweils eine von drei möglichen Allel-Familien, nämlich Mad20, K1 oder Ro33 (Tanabe et al. 1987). K1- und Mad20-Variationen unterscheiden sich in Tripeptid- oder Hexapeptid-*repeats*; für Block 2 der Ro33-Familie sind keine *repeats* typisch, sondern eine ausgeprägte Mikroheterogenität (Miller et al. 1993). Das MSP-2-Gen weist zwei konservierte

außen liegende Genabschnitte auf, die eine variable Domäne flankieren, welche die Allelfamilien FC27 und 3D7 definieren (Smythe et al. 1990).

1.3 Pathogenese und Klinik

1.3.1 Pathogenese der Malaria tropica des Kindes

Am Anfang des Krankheitsgeschehens steht eine metabolische Azidose, die streng assoziiert ist mit Schwere und Letalität der Erkrankung (Day et al. 2000; Taylor et al. 1993). Eine erhöhte plasmoidale Laktatsynthese (Sasi et al. 2007), eine verminderte Entgiftung durch die kindliche Leber und die Minderperfusion des Gewebes nach Sequestration und Obstruktion der kleinen Gefäße in Folge einer reduzierten Verformbarkeit der Erythrozyten bedingen die azidotische Stoffwechsellage (Dondorp et al. 2000). Eine Dehydratation des erkrankten Kindes mit konsekutiv erniedrigtem Perfusionsdruck verschärft die Situation. Die Clusterbildung der infizierten mit nicht-infizierten Erythrozyten (*Rosetting*) bedingt einen verlangsamten Blutfluss (Shelby et al. 2003; Taylor-Robinson 2004).

Die Sequestration infizierter roter Blutzellen im zerebralen Gefäßbett führt zur zerebralen Malaria und scheint zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke zu führen (Brown et al. 2001).

Die bei Malaria im Kindesalter oft ausgeprägte Anämie erklärt sich zum einen durch die Hämolyse infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten und eine Dyserythropoese. Zusätzlich neigen die infizierten roten Blutzellen aufgrund veränderter Oberflächenmembraneigenschaften dazu, im Gefäßbett Schaden zu nehmen und werden schneller durch die Milz gefiltert. In Endemiegebieten resultieren vor allem wiederholte Plasmodieninfektionen und/oder persistierende Parasitämien in einem Hämoglobin-Abfall. Repetitive Infektionen können auch bei niedriger Parasitendichte lebensbedrohlich sein. Begleitende Hakenwurminfektionen und Mangelernährung, Eisendefizit und Sichelzellerkrankheit fördern die Anämie (Newton et al. 1997; Stoltzfus et al. 2001).

Die inflammatorische Zytokinantwort führt zu Grippe-ähnlichen Symptomen. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFalpha) induziert das Malariafieber und scheint durch Hemmung der hepatischen Glukoneogenese eine Hypoglykämie zu bewirken, die häufig bei afrikanischen Kindern mit schwerer Malaria zu finden ist. Als Malariatoxin und Induktor der Zytokinfreisetzung gilt der GPI-Anker von MSP-1, der bei der Ruptur der Schizonten freigesetzt wird.

Bakterielle Infektionen sind eine Hauptursache von Todesfällen afrikanischer Kinder (Mulholland und Adegbola 2005). Eine Zunahme der Resistenzen gegen Standardantibiotika ist zu befürchten (Zimmermann et al. 2005). Eine koinzidente bakterielle Infektion eines an Malaria erkrankten Kindes beeinflusst das Ausmaß der Erkrankung. In einer Kohorte kenianischer Kinder, die an schwerer Malaria erkrankt waren, verdreifachte sich die Mortalität derjenigen mit manifester Bakteriämie (Berkley et al. 1999). Eventuell kann Malaria aufgrund einer immunsuppressiven Komponente gar als Prädisposition für bakterielle Infektionen, z.B. Atemwegsinfektionen, gewertet werden (Roca et al. 2006).

Neben Multiplikationsrate, Zytoadhärenz, *Rosetting* und Malariatoxin gilt auch der polymorphe Charakter des Parasiten als Virulenzfaktor (vgl. Kapitel 1.2.2). Das Ausmaß und die Ausprägung der Erkrankung hängen ab einerseits von diesen parasitären Faktoren, andererseits von Wirtsfaktoren wie Immunität, Zytokinausschüttung, genetischen Varianten wie Sichelzellerkrankheit oder Thalassämie, Alter und Schwangerschaft, und drittens von geographischen und sozialen Faktoren (Miller et al. 2002, Pullan et al. 2010). Zu letzteren zählen die jeweilige Endemizität, politische Stabilität bzw. Instabilität sowie kulturelle und ökonomische Faktoren, die den Zugang zu Prävention und Behandlung ermöglichen oder erschweren.

1.3.2 Klinik der Malaria tropica

Die klinische Ausprägung der Infektion mit *P. falciparum* reicht von asymptomatischen Infektionen über milde Verlaufsformen mit Fieber, Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen bis hin zur schweren lebensbedrohlichen Erkrankung. Die schwere Malaria ist definiert durch das Vorhandensein asexueller Plasmodienformen (Parasitämie > 4% bei einer nicht-immunen Person) begleitet von klinischen und laborchemischen Parametern: körperliche Erschöpfung, Atemnot, Bewusstseins-trübung und/oder Krampfanfälle als praxisnahe Definition der zerebralen Malaria, Ikterus, Blutungsstigmata und Schock. Laborchemisch bedingen eine schwere Anämie (Hb<5g/dl), Hypoglykämie (Glucose < 40mg/dl), Azidose (Bikarbonat < 15mmol/l) und renale Schädigungsmuster (Kreatininanstieg) die Diagnose *schwere Malaria*.

Der akuten Malariaattacke geht ein Prodromalstadium mit Unwohlsein, Müdigkeit, Gliederschmerzen, Übelkeit und Erbrechen voraus. Zwei bis drei Tage später setzt die fiebrige Malariaattacke mit anämischen bis ikterischem Habitus ein. Typisch sind Schüttelfrost, Kopfschmerzen und v.a. bei Kindern Fieberkrämpfe. Es folgen Tachypnoe, Tachykardie und körperliche Er-

schöpfung. Delir bis hin zum Koma ist möglich. Schon früh wird eine Splenomegalie manifest. Eine Periodizität der Fieberschübe findet sich bei einem *P. falciparum*-Infizierten selten.

Die wichtigsten Komplikationen der Malaria im Kindesalter sind Anämie und zerebrale Malaria einhergehend mit einer schweren metabolischen Azidose (vgl. Kapitel 1.3.1). Bei Kindern unter 24 Monaten steht die Anämie im Vordergrund, bei älteren dominiert die zerebrale Malaria mit einem Peak bei den dreijährigen. 5 bis 15% der Kinder, die wegen schwerer Anämie in Krankenhäusern aufgenommen werden, versterben. In 15 bis 30% der Fälle zerebraler Malaria bei Kindern nimmt die Erkrankung einen letalen Verlauf.

Eine metabolische Azidose zeigt sich klinisch durch die Kussmaul-Atmung, den Versuch überschüssige Säure in Form von CO₂ abzuatmen. Das an Malaria erkrankte Kind bietet zuweilen allein Symptome eines akuten Atemnotsyndroms: eine tiefe und erschwerte Atmung, Brustwand-einziehungen und den Einsatz der Atemhilfsmuskulatur (English et al. 1996). Auskultation und ggf. Röntgen-Thorax differentialdiagnostisch zur Pneumonie sind jedoch unauffällig.

Die zerebrale Malaria ist eine *per definitionem* durch *P. falciparum* hervorgerufene Enzephalopathie. Dem Koma gehen Bewusstseinstörung oder generalisierte oder fokale Krämpfe voraus. 9% der Kinder, die eine zerebrale Malaria überlebten und in eine Studie in Gambia eingeschlossen wurden, trugen neurologische Schäden davon, die auch einen Monat nach Entlassung aus dem Krankenhaus noch manifest waren (van Hensbroek et al. 1997). Das neurologische Defizit nach zerebraler Malaria umfasst Ataxie, Hemiplegie und Sprachschwierigkeiten (Brewster et al. 1990; Meremikwu et al. 1997). Einige Betroffene büßen auch längerfristig kognitive Fähigkeiten ein (Carter et al. 2005; Holding et al. 1999; Kihara et al. 2006). Allein im Jahr 2000 wurden in Sub-Sahara-Afrika 24000 Kinder unter fünf Jahren gezählt, die in Folge zerebraler Malaria persistierende neurologische Defizite davontrugen (Roca-Feltrer et al. 2008).

Der Blutfarbstoff des reifen Neugeborenen enthält 50 bis 80% fetales Hämoglobin. Die Umstellung von fetalem zu adultem Hämoglobin (Hb) bedingt einen Hämoglobinabfall bis auf 11,5 g/dl (im Mittel) im dritten Lebensmonat (Trimenonreduktion). Der Hämoglobin-Normwert schwankt dem entsprechend im Kindesalter; bei drei Monate alten Kindern liegt er bei 9,5 bis 14,0 g/dl. Werte unterhalb des Normbereichs stehen für eine Anämie. Eine schwere Anämie bezeichnet einen Hb-Gehalt von ≤ 5 g/dl.

1.4 Diagnostik

Malaria wird für gewöhnlich lichtmikroskopisch diagnostiziert. Mit Hilfe des Dicken Tropfens, eines Anreicherungsverfahrens, und eines Ausstrichs (vgl. Kapitel 2.2) gelingt eine Einschätzung der Parasitendichte sowie eine Differenzierung zwischen den Plasmodienspezies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Die Mikroskopie erreicht eine hohe Sensitivität; sie detektiert eine Parasitämie von bis zu 0,0001%, bzw. ab einer Parasitendichte von 20 Plasmodien/ μ l (Hommel 2002). Die Technik der Mikroskopie ist leicht zu erlernen, wenn auch die Qualität des Leseergebnisses stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängt. Bei streng synchron verlaufenden Plasmodienzyklen (z.B. bei *P. vivax*) kann die Periodizität der Parasitämie ein negatives Leseergebnis bedingen, wenn sich die Parasiten zu diesem Zeitpunkt im Gewebe absondern. Deshalb sollen immer mehrere Dicke Tropfen unterschiedlicher Zeitpunkte untersucht werden. Das Mikroskop bedarf keiner aufwendigen Labortechnik und ist relativ leicht und billig zu erwerben. Es findet sich auch in kleinen, unter Umständen schlecht ausgerüsteten Gesundheitszentren tropischer Länder.

In Endemiegebieten beweist ein positiver Dicker Tropfen zwar eine Infektion, das aktuelle klinische Bild kann jedoch auch auf einer anderen Erkrankung beruhen, da asymptomatische Plasmodieninfektionen auf niedrigem Niveau häufig sind (vgl. Kapitel 1.3.2). Einen Grenzwert der Parasitendichte zu bestimmen, ab dem von einer Malariaerkrankung gesprochen wird, fällt schwer. Das Alter des Infizierten und die vorherrschende Endemizität bedingen eine Variabilität dieses Grenzwerts.

In ländlichen Gebieten, wo ein Krankenhaus aus logistischen oder finanziellen Gründen nicht erreichbar ist, wird oft versucht, eine Diagnose der Malaria mittels rein klinischer Kriterien zu stellen. Besonders bei *P.-falciparum*-Infektionen zeigt die Temperaturkurve keine Periodizität und kann so nicht als diagnostischer Parameter dienen (vgl. Kapitel 1.2.1). So wird in Gebieten hoher Transmission oft jedwedes Fieber einer Malariaerkrankung gleichgesetzt. *Health worker* behandelten im Jahre 2003 im ländlichen Tansania fiebrige Kinder unter fünf Jahren mit Antimalariamitteln, von denen 61% tatsächlich eine Plasmodieninfektion aufwiesen (Eriksen et al. 2007). Etwas spezifischere Kriterien klinischer Diagnostik sind intermittierendes Fieber bei Abwesenheit von Otitis, Tonsillitis und Atemwegsinfektion. Anhand eines ausgefeilten Algorithmus sollen auch Nicht-Mediziner befähigt werden, die Diagnose Malaria mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität zu stellen (Olaleye et al. 1998). Ein solcher *Malaria score* könnte die Kriterien Blässe, heißer Körper, Splenomegalie und normale Auskultation auflisten. Goldstandard der

Malariadiagnostik bleibt die Kombination von Klinik und Mikroskopie. Die Anamneseerhebung eines Aufenthalts in den Tropen ist in unseren Breiten der Schlüssel zur Diagnosestellung.

Eine Alternative zur mikroskopischen Diagnostik der Malaria stellt – stehen entsprechende Laborbedingungen zur Verfügung – die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dar (vgl. Kapitel 2.5). Diese molekulargenetische Methode beruht auf der Amplifizierung Plasmodien-spezifischer Genabschnitte. Mittels Elektrophorese werden die DNA-Fragmente im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und auf dem Agarosegel im ultravioletten Licht visualisiert. Eine nun sichtbare Bande zeigt eine Plasmodieninfektion an; ihre Position gibt Aufschluss über die Basenpaarlänge des DNA-Fragments, die spezifisch ist für eine bestimmte Spezies. So gelingt eine Spezies-spezifische Alles-oder-nichts-Antwort auf die Frage nach dem Vorliegen einer Infektion. Eine Aussage über die Quantität der Infektion kann bei diesem Routineverfahren, das auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde, nicht getroffen werden. Die *real-time* quantitative PCR dagegen verfolgt die Kinetik der Amplifizierung mittels kontinuierlicher Fluoreszenz-Messungen (*fluorescence resonance energy transfer*); sie stellt eine moderne Form der Quantifizierung von Nucleinsäuren dar und gilt im Rahmen der Forschung als sensitive und viel versprechende Methode der Malariadiagnostik (de Monbrison et al. 2003; Mangold et al. 2005; Mens et al. 2006; Swan et al. 2005).

Inzwischen stehen auch Antigen-Schnelltests der Malariadiagnostik zur Verfügung: Parasitäre Antigene und auf einem Trägermedium aufgebrachte Antikörper gehen eine Bindung ein, die eine Enzym-gesteuerte Farbreaktion auslöst (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Bislang wurden Malaria-Schnelltests, die auf den plasmoidalen Antigenen *Histidine-Rich Protein-2* (HRP-2) oder *parasite Lactate Dehydrogenase* (pLDH) basieren, kommerzialisiert. Die Sensitivität der Tests wird kontrovers beurteilt, überwiegend jedoch hoch eingeschätzt (Fogg et al. 2008, Metzger et al. 2007, Noedl et al. 2006; Wongsrichanalai und Miller 2002). Einige Tests weisen jedoch Variabilitäten der Sensitivität innerhalb eines Produkts auf und sind nicht robust genug, beispielsweise gegenüber Hitze (Chiodini et al. 2007; Murray et al. 2003). Die Handhabung ist schnell zu erlernen (Mayxay et al. 2004 a), erfordert jedoch eine adäquate Einweisung (Rennie et al. 2007). Ohne die Mikroskopie gelingt keine sichere Spezies-Differenzierung und keine Aussage über die Parasitendichte (Wiese et al. 2006).

1.5 Immunität

1.5.1 Immunität im Sinne einer angeborenen Resistenz

Verschiedene Polymorphismen der roten Blutzellen des Menschen bedingen eine angeborene Resistenz gegenüber Plasmodien, sind aber in homozygoter Ausprägung pathogen bzw. nicht mit dem Leben vereinbar. Ihre geographische Verteilung spiegelt einen enormen Vorteil der Heterozygoten wider, der evolutionsgeschichtlich den Nachteil derer, die homozygot sind, wett zu machen scheint. Die hohe Prävalenz von Sichelzellanämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel und Thalassämie in Malariaendemiegebieten liefert einen epidemiologischen Hinweis auf deren protektive Mechanismen bei Plasmodien-Infizierten. In einer Fall-Kontroll-Studie in Ghana mit an schwerer Malaria erkrankten Kindern und insgesamt 4639 Fällen bzw. Kontrollen bestätigt sich die negative Assoziation der HbS-Träger (Sichelzellanämie) mit Malariamaniifestationen insgesamt; HbC- und Alpha-Thalassämie-Träger wiesen einen Schutz vor zerebraler Malaria und schwerer Anämie auf (May et al. 2007). Zu wirtsspezifischen Faktoren, die vermutlich einen angeborenen Schutz oder eine bestimmte Vulnerabilität des Plasmodien-Infizierten mitbedingen, zählen polymorphe Gene, die für die Promoter-Region von TNFalpha, für ICAM-1 oder auch das Humane-Leukozyten-Antigen (HLA) kodieren (Fernandez-Reyes et al. 1997; Knight et al. 1999; May et al. 1999a).

Selektionsdruck kann sich auch auf den Parasiten auswirken: In Westafrika, wo humane Erythrozyten Duffy-negativ sind, ist *P. vivax* nicht zu finden. Neuere Arbeiten stellen dieses Dogma jedoch in Frage: In einer kenianischen Duffy-negativen Population kam es zur Übertragung von *P. vivax* (Pasvol 2007; Ryan et al. 2006).

1.5.2 Erworbene Immunität

Der Immunschutz eines in einem Endemiegebiet lebenden Menschen baut sich im Kindesalter auf. Demzufolge erkranken vor allem Kinder an der Malaria. Von ungefähr 200 Millionen Episoden klinischer Malaria in afrikanischen Kindern pro Jahr gehen 4 bis 6 Millionen in eine schwere Form der Malaria über. Jede Episode klinischer Malaria birgt ein Risiko von 0,5 bis 2%, einen letalen Ausgang zu nehmen. Die Mehrheit der mit *P. falciparum* infizierten Kinder macht nur eine leichte fiebrige Erkrankung durch. Longitudinale Studien zeigen, dass sich erste asymptomatische Parasitämien bei Neugeborenen und bei Säuglingen ab der zweiten Lebenswoche detektieren lassen; Episoden klinischer Malaria setzen dagegen meist im Alter von vier bis sechs

Monaten ein (Kitua et al. 1996; Snow et al. 1998; Wagner et al. 1998). In den ersten Lebensmonaten limitieren das fetale Hämoglobin und maternale Antikörper die Infektion und Krankheitsentwicklung (McGregor 1964; Pasvol et al. 1976). Niedrige Parasitämien von kurzer Dauer sind in den ersten Lebenswochen charakteristisch (Kitua et al. 1996). Bis zum dritten Lebensmonat sind Kinder immuner Mütter vor der Erkrankung geschützt; noch innerhalb des ersten Lebensjahres erreicht die Prävalenz der klinischen Malaria ihren Peak, während die Infektionsrate weiter ansteigt und die Prävalenz der Infektion im Alter von drei bis fünf Jahren am höchsten ist (Smith et al. 1999a; Snow et al. 1998). Die Mehrheit der Kinder bleibt trotz manifester Infektion gesund. Malaria bei älteren Kindern tritt seltener und in leichterer Form auf; letale Verläufe sind sehr selten. Bei Erwachsenen schließlich geht die Erkrankung nicht über kurzfristige, jedoch häufig auftretende Fieberattacken und Cephalgien hinaus. Hierbei wird von Semiimmunität gesprochen, einer erworbenen Immunität infolge kontinuierlicher Exposition, die zu einer Parasitämie auf niedrigem Niveau und schließlich zur Clearance der Infektion führe (Tanner et al. 1999, basierend auf Ross 1910). In Regionen mit großen saisonalen Schwankungen der Übertragung von Plasmodien unterbleibt die Entwicklung der Semiimmunität. Hier erkranken auch Erwachsene häufiger und schwerer an Malaria.

Eine antitoxische Komponente der Immunität, die vor schwerer nicht-zerebraler Erkrankung schützt, scheint nach ein oder zwei Infektionen mit *P. falciparum* erworben zu sein (Gupta et al. 1999b). In Regionen intensiver Transmission kann sich die antitoxische Immunität frühzeitig im Rahmen des Nestschutzes entwickeln. Kommt es in Gebieten mit geringerer Transmissionsrate erst außerhalb der Phase des Nestschutzes zur ersten Infektion, steigt das Risiko für die Entwicklung einer schweren Malaria (Snow et al. 1997). Nach dem Modell der antitoxischen Immunität bleiben Kinder trotz hoher Parasitämien klinisch gesund, jedoch empfänglich für eine Krankheitsentwicklung bei erneuter Infektion, weshalb von einer Genotyp-spezifischen Immunität ausgegangen wird. Die antiparasitäre Immunität, die vor unkomplizierter Malaria schützt, entwickelt sich wohl erst durch repetitive bzw. simultane Infektionen mit verschiedenen Erregerstämmen (Konate et al. 1999). Die Auseinandersetzung mit unterschiedlichen parasitären Antigenen erhöht zwar die Wahrscheinlichkeit zu erkranken (Ofosu-Okyere et al. 2001), führt jedoch im Anschluss zu der Entwicklung eines spezifischen Immunschutzes (Bull et al. 1998). Das Prinzip *Premunition* beschreibt diesen Schutz vor Superinfektion infolge einer persistierenden Infektion (Sergent und Parrot, 1935). Ältere Kinder bieten denn auch das Bild einer chronischen Parasitämie auf niedrigem Niveau. In Kleinstkindern dagegen kommt es begleitet von Fieber als Indikator einer Zytokinantwort zu einer raschen Klärung der Infektion. Die Herrunterregulierung

der Zytokine im Verlauf scheint in Zusammenhang zu stehen mit dem Aufbau von Immunität (Rhee et al. 2001). Andere Stimmen postulieren jedoch einen protektiven Effekt von Zytokinen (Doodoo et al. 2002). Es wird von einem nur partiell Genotyp-spezifischen Immunschutz ausgegangen, der sich auf neu auftretende Typen ausdehnt im Sinne eines Cross-Immunschutzes. Die Dynamik asymptomatischer Parasitämien unterliegt auch dem Einfluss nicht-spezifischer Regulationsmechanismen, die von der Parasitendichte getriggert werden; verschiedene Plasmodien-Spezies und –Klone in einem infizierten Individuum agieren nicht unabhängig voneinander (Bruce und Day 2003). Spezies- und Genotyp-spezifische Immunität, Modellierung der Zytokinausschüttung und unspezifische, zum Beispiel Parasitendichte-abhängige Regulationsmechanismen greifen ineinander und fördern die Entwicklung der Semiimmunität (Bruce et al. 2000; Gurarie et al. 2006).

1.6 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll bei drei Monate alten Kindern aus aus einem hyper-/holoendemischen Gebiet in Ghana

- die Prävalenz verschiedener Plasmodienspezies bestimmt werden,
- eine Genus- und Spezies-spezifische PCR (Singh B et al. 1999) hinsichtlich Sensitivität und Spezifität mit der Mikroskopie als Referenz verglichen werden,
- die Diversität der P.-falciparum-Infektion anhand einer Typisierung mit varianten Genbereichen der Erreger im saisonalen Verlauf ermittelt werden,
- der Einfluß der Infektion auf die Hämoglobinwerte der Kinder untersucht werden,
- die Rolle der asymptomatischen Infektion als Risiko- oder Schutzfaktor für eine Erkrankung diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im ländlichen Afigya Sekyere District in der Ashanti-Region im westafrikanischen Ghana wurden neun benachbarte Studiendörfer ausgewählt: Afamanaso, Agona, Asamang, Bedomase, Bipoa, Jamasi, Kona, Tano-Odumasi und Wiemoase.

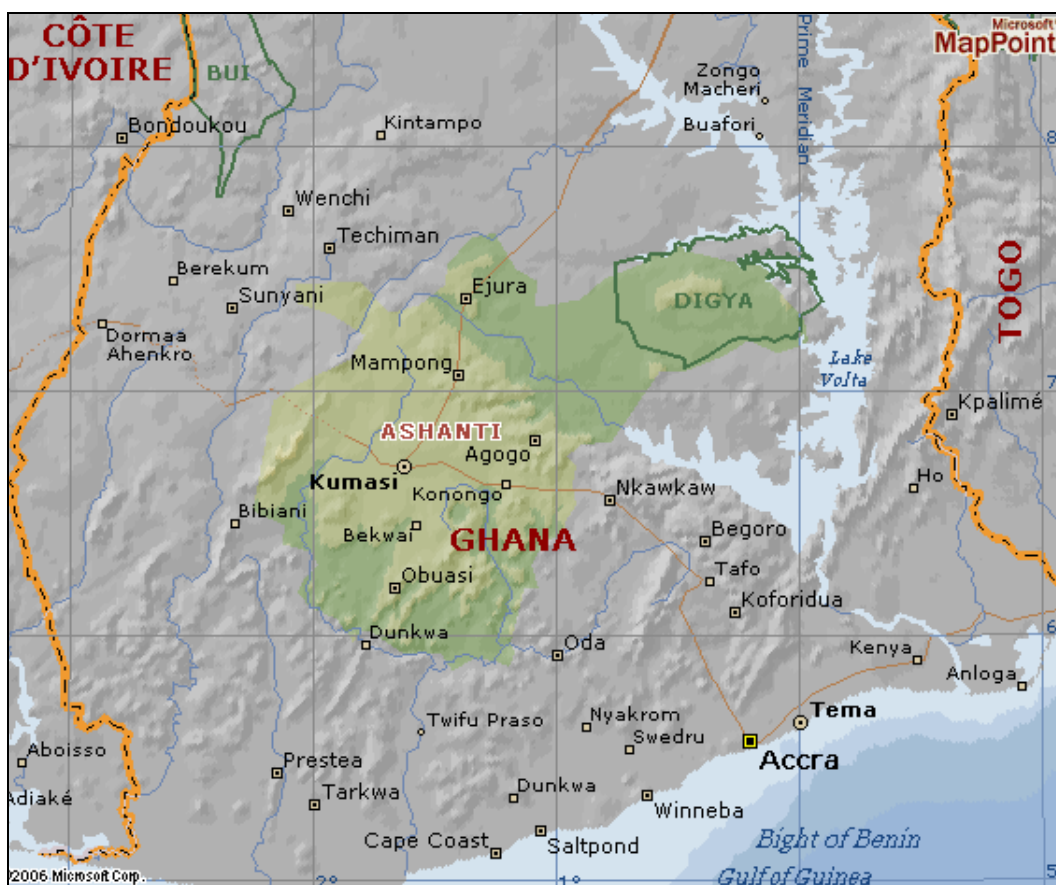


Abbildung 2: Die Ashanti-Region in Ghana, Quelle: [http://encarta.msn.com/map_701510260/Ashanti \(region Ghana\).html](http://encarta.msn.com/map_701510260/Ashanti_(region_Ghana).html)

Die Landschaft ist von sekundärem Regenwald mit tropischem Klima geprägt. Die Temperatur nimmt Werte zwischen 20 und 36°C an. Die Regenzeit, definiert als Monate mit einer mittleren Anzahl von Regentagen > 10, liegt in den Monaten Mai bis Oktober; die Trockenzeit, definiert als Monate mit einer mittleren Anzahl von Regentagen \leq 10, erstreckt sich von November bis

April. Die Daten zu den mittleren Regentagen pro Monat basieren auf Angaben des *Ghana Meteorological Services Departments*, das Daten zu Niederschlägen im Zeitraum 1960 bis 1991 zur Verfügung stellt (<http://www.worldweather.org/151/c00922.htm>; Juni 2005).

Von Januar bis Dezember 2003 wurden in den oben genannten Studiendörfern 1070 Kinder im Alter von drei Monaten in eine klinische Studie zur intermittierenden präventiven Malaria-Behandlung mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (*Intermittent Preventive Treatment in infants (IPTi)*) (Kobbe et al. 2007) aufgenommen. Die Daten dieser Arbeit basieren auf der Dokumentation der klinischen Untersuchung der Kinder, der Messung des Hämoglobinwerts und der Blutentnahme, die bei Aufnahme der Kinder in die Studie erfolgten. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Kinder noch kein Sulfadoxin-Pyrimethamin- bzw. Placebo-Präparat im Rahmen der Studie eingenommen. Die Eltern stellten sich am Tag der Rekrutierung an einem vorab bekannt gegebenen zentralen Ort im Dorf mit ihren Kindern vor, unabhängig von deren Gesundheitszustand. Es handelte sich also nicht um ein Krankenhaus-Kollektiv. Wurde bei den Kindern im Rahmen der Untersuchung eine Erkrankung festgestellt, wurde diese auf Kosten der Studie vor Ort vom Team der Studienärzte oder ggf. in einem nahe gelegenen Krankenhaus behandelt.

Die Studie wurde vom *Committee of Human Research, Publications and Ethics, School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana* gebilligt. Die Mütter der an der Studie teilnehmenden Kinder gaben per Unterschrift oder Fingerabdruck ihre Einwilligung.

2.2 Mikroskopie

1070 Kinder wurden mittels Dicken Tropfen auf eine mögliche Plasmodieninfektion hin untersucht. 3 bis 5 μl Kapillarblut aus der Ferse oder der Fingerkuppe wurden auf einem Objektträger aufgebracht. Die getrockneten Blutstropfen wurden im Anschluss nach Giemsa für 35-40 Minuten gefärbt, anschließend mit Wasser abgespült. Unter dem Mikroskop wurden 100 Felder, die ca. 0,25 μl Blut entsprechen, nach Plasmodien (Ringform, Gametozyten) abgesucht. Blieb die Anzahl der Parasiten dabei unter 10, wurde die Suche nach Parasiten erst beim 500. Leukozyten abgebrochen. Die Parasitämie errechnete sich aus der Zahl der Parasiten in Relation zur Leukozytenzahl bei einem normierten Maß von 8000 Leukozyten/ μl Blut. Die Einteilung der Parasitämie folgte einer geometrischen Progression mit dem Faktor 10 (<1 Parasit/160 Leukozyten entspricht 1 Parasiten/ μl , 1-9 Parasiten/160 Leukozyten entsprechen 50-<500 Parasiten/ μl , 1-9 Parasiten/16 Leukozyten entsprechen 500-<5000 Parasiten/ μl). Diese Methode gilt als Stan-

dard der Ermittlung der Parasitämie (Trape 1985). Ein Dicker Tropfen wurde von zwei unabhängigen Untersuchern gelesen. Unterschieden sich die beiden Lesungen erstens im Sinne eines positiven und eines negativen Resultats oder zweitens in der Parasitendichte um $> 300\%$, studierte ein dritter Untersucher das Präparat erneut. Mindestens zwei Plasmodien-positive Lesungen mussten vorliegen, damit das Präparat als positiv bewertet wurde. Der Median der Parasitämie ergab sich aus den positiven Ergebnissen.

Der Dicke Tropfen ist 15 Mal sensitiver als ein Blutaussstrich; letzterer, ebenfalls mit Fersenblut (ca. 1 μl) angefertigt, diente nicht der Bestimmung der Parasitendichte, sondern der Spezies-Spezifizierung. Die Blutstropfen wurden auf dem Objektträger mit Hilfe eines zweiten Objektträgers verstrichen. Die Fixierung erfolgte mit Methylalkohol und die Färbung nach Giemsa.

2.3 DNA-Isolierung

Zu Beginn der molekulargenetischen Untersuchung stand die Isolierung der plasmodialen sowie humanen DNA aus Blut. Die DNA-Extraktion erfolgte aus Kapillarblut und aus Filter-Papieren:

Die DNA-Extraktion aus Kapillarblut wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit dem NucleoMag-96-Blood®-System durchgeführt. Es basiert auf reversibler Adsorption von Nukleinsäuren an paramagnetischen Beads. 50 bis 100 μl Blut wurden unter Schüttelbedingungen mit 125 μl Lysepuffer vermischt, sowie im Verlauf mit fünf Waschpuffern. Beim Abpipetieren der jeweiligen Lyse- bzw. Waschlösung wurden die Nukleinsäuren im Komplex mit magnetischen Beads am Boden gehalten und schließlich in 50 μl Elutionspuffer gelöst.

Die Filter-Papiere (IsoCode® ID™, Schleicher & Schuell Bioscience, Einbeck, Deutschland) mit jeweils 150 μl Blut wurden an der Luft getrocknet und bei Umgebungstemperatur zusammen mit einem Trockenmittel in abgedichteten Plastikbeuteln aufbewahrt. Die Filterpapiere sind bakterizid und virizid. Die DNA-Extraktion aus den Filter-Papieren erfolgte nach Angaben der Firma: Aus einem Filterpapier wurde mit einer sterilen Hautbiopsiestanze ein kreisrundes Stück mit 6 mm Durchmesser ausgeschnitten; dieses wurde mit 500 μl sterilem Wasser gewaschen und gevortext, dann in 30 μl sterilem Wasser über 30 Minuten ausgekocht. Das Eluat, ca. 30 μl , konnte direkt für die PCR eingesetzt werden.

2.4 DNA-Quantifizierung

Eine Fluoreszenz-Intentionsmessung mit PicoGreen® diente der DNA-Quantifizierung der Proben. Die Bestimmung der DNA-Konzentration basiert darauf, die Proben und eine vorab gemessene Standardreihe mit bekannten Konzentrationen zueinander in Relation zu setzen (Singer et al. 1997). Die Fluoreszenzmessung eines Ansatzes aus jeweils 50 µl 1xTBE und 2 µl DNA-Eluat wurde mit Genios, V 4.62, XFLUOR4 als Fluorimeter durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 485nm; die Messung der Lichtemission bei 535nm. Anhand einer Eichkurve konnte die DNA-Konzentration des Eluats ermittelt werden.

2.5 PCR-Malariadiagnostik

2.5.1 Genus- und Spezies-spezifische PCR

Die PCR ermöglicht eine selektive Vervielfältigung von Gensequenzen. Die DNA wird thermisch denaturiert. Oligonukleotide (*Primer*), komplementär zu der DNA-Basenfolge, die als Matrize dient, hybridisieren an die Endabschnitte der gesuchten Sequenz. Die Polymerase synthetisiert aus bereit gestellten Mononukleotiden (dNTPs) komplette DNA-Stränge. Wiederholungen dieses Vorgangs führen zur Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Fragments. Die *Nested-PCR* („geschachtelte“ PCR) ermöglicht den Nachweis geringer Mengen an DNA und erhöht die Spezifität: Das Produkt einer ersten PCR (*Outer-PCR*) wird in eine zweite (*Nested-PCR*) eingebracht. Die *Primer* der zweiten PCR sind dabei zwischen den *Primern* der ersten PCR lokalisiert. Fehlerhafte Produkte der ersten PCR werden nicht weiter vervielfältigt und gehen so nicht in das Endergebnis des Amplikons ein.

Die Genus- und Spezies-spezifische *Nested-PCR* zur Detektion und Differenzierung von Plasmodien erfolgte dem Protokoll gemäß (Singh B et al. 1999); die entsprechenden *Primer* basieren auf der *small subunit ribosomal RNA* (ssrRNA). Alle Proben (n = 958) wurden in einem ersten Durchlauf mittels *Outer*- und Genus-spezifischer *Nested-PCR* auf Plasmodien untersucht. Danach erfolgte die Spezies-Differenzierung der als Plasmodien-positiv definierten Proben: Hierbei diente das Produkt der *Outer-PCR* aus dem ersten Durchlauf als Probe für drei weitere *Nested-PCRs*, spezifisch für *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae*. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes der *Outer*- und *Nested* - PCRs betrug jeweils 20 µl.

Die *Primer* – Sequenzen entsprachen den Angaben von Singh B et al. 1999:

Genus-spezifische *Primer*: rPLU1: 5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3', rPLU5: 5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC-3'. Genus-spezifische *Primer*: rPLU3: 5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3', rPLU4: 5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3'. Spezies-spezifische *Primer* für *P. falciparum*: rFAL1: 5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3', rFAL2: 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'. Spezies-spezifische *Primer* für *P. ovale*: rOVA1: 5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3', rOVA2: 5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG-3'. Spezies-spezifische *Primer* für *P. malariae*: rMAL1: 5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3', rMAL2: 5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3'.

Materialien:

Primer MWG ®, Ebersberg, Deutschland, 10pmol/µl
dNTP working solution, Hybaid ®, Heidelberg, Deutschland, 10mM
MgCl₂, Qiagen ®, Hilden, Deutschland, 25mM
10xPuffer, Pharmacia ®, Freiburg, Deutschland, 1,5mM
Taq DNA-Polymerase, Pharmacia ®, Freiburg, Deutschland, 5u/µl
Hot StarTaq Polymerase, Qiagen ®, Hilden, Deutschland, 5u/µl
Q Solution, Qiagen ®, Hilden, Deutschland.

Methoden:

Outer-PCR:

- DNA-Probe 2 µl
- Forward- und Reverse Primer je 0,5 µl (rPLU1 und rPLU5)
- dNTPs 0,2 µl
- MgCl₂ 2 µl
- 10x Puffer 2 µl
- Taq DNA-Polymerase 0,1 µl
- H₂O 12,7 µl.

Genus-spezifische Nested-PCR:

- DNA-Probe 2 µl
- Forward- und Reverse-Primer je 1 µl (rPLU3 und rPLU4)
- dNTPs 0,2 µl

- MgCl₂ 2 µl
- 10x Puffer 2 µl
- Taq DNA-Polymerase 0,1 µl
- H₂O 11,7 µl.

Spezies-spezifische Nested-PCR:

- DNA-Probe 1 µl
- Forward- und Reverse Primer je 1 µl (rFAL1 und rFAL2, bzw. rOVA1 und rOVA2, bzw. rMAL1 und rMAL2)
- dNTPs 0,2 µl
- MgCl₂ 2 µl
- 10x Puffer 2 µl
- HotStart Polymerase 0,1 µl
- Q-Solution 4 µl
- H₂O 8,7 µl.

Die PCRs wurden unter folgenden Bedingungen im T3-Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt:

Outer-PCR:

- | | |
|---|--------------|
| a.) Initiale Denaturierung | 94°C 4 min. |
| b.) Denaturierung | 94°C 30 sec. |
| c.) Annealing | 75°C 1 min. |
| d.) Extension | 72°C 1 min. |
| e.) Wiederholung von b) bis d) in 30 Zyklen | |
| f.) Finale Extension | 72°C 4 min. |
| g.) Abkühlen auf 4°C. | |

Genus-spezifische Nested-PCR:

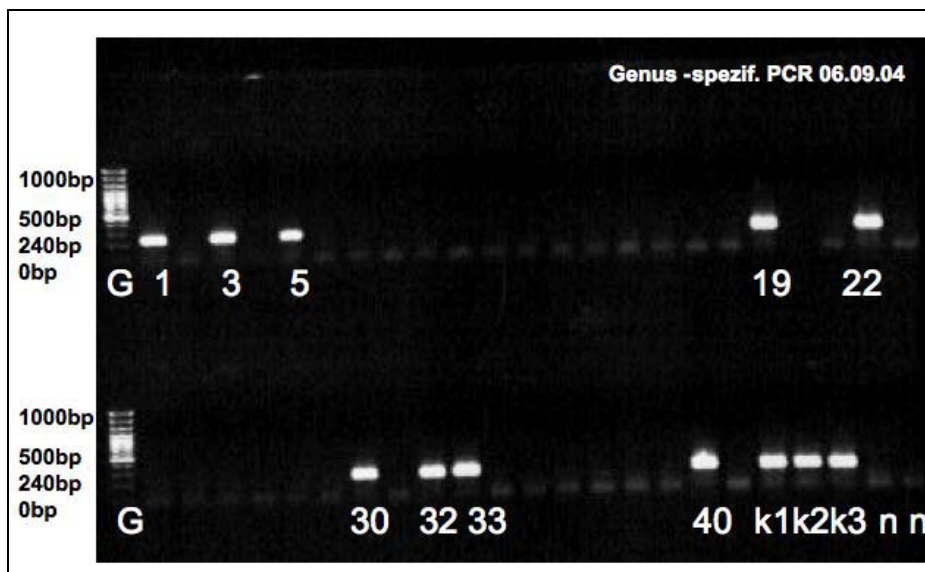
Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR, bis auf c): Annealing-Temperatur: 64°C.

Spezies-spezifische Nested-PCR:

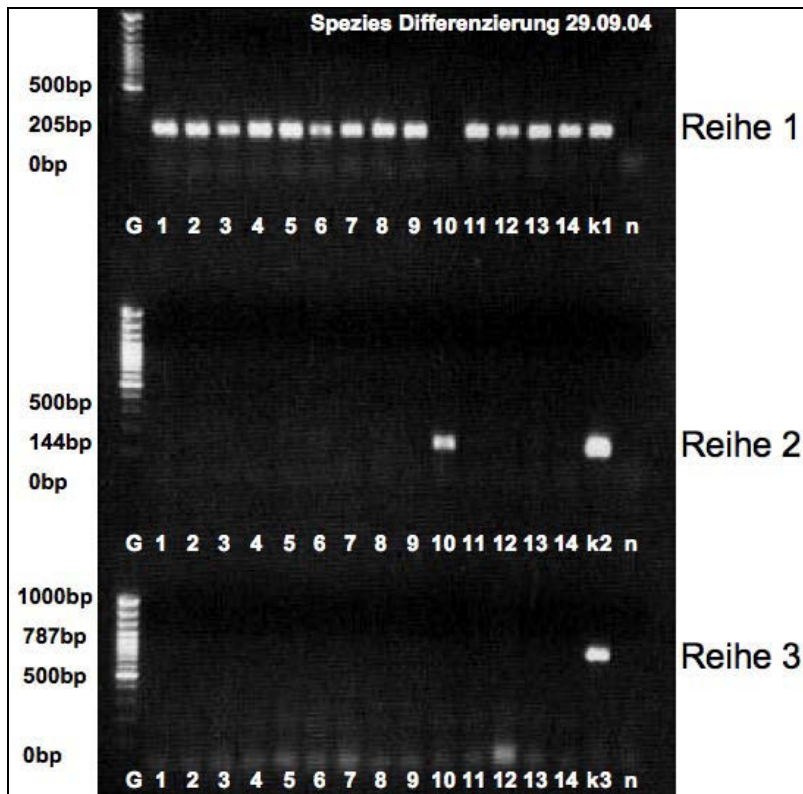
Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR, bis auf c): Annealing-Temperatur: 57°C.

2.5.2 Gelelektrophorese

Die Visualisierung und Größenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese in Ethidiumbromid-gefärbtem 1%igem Agarosegel. Die Agarose wurde in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Die Taschen des erstarrten Gels, horizontal in TAE gebettet, wurden anschließend mit den mit Ladepuffer versetzten Proben befüllt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wanderten bei angelegter Spannung in Richtung Anode. Die zurückgelegte Distanz hängt ab von der Größe des Moleküls sowie der Konzentration des Gels. Positiv- und Negativkontrollen sowie ein Größenstandard liefen mit. Das Produkt der Genus-spezifischen PCR ist 240 Basenpaare lang; die Größen der *P.falciparum*-, bzw. *P.ovale*-, bzw. *P.malariae*-spezifischen DNA-Fragmente liegen bei ca. 205, bzw. 787, bzw. 144 Basenpaaren. Die Labordokumentationen 1 und 2 zeigen beispielhaft positive Banden als unspezifischen Nachweis von Plasmodien und spezifischen Nachweis der entsprechenden Spezies.



Labordokumentation 1: Genus-spezifische Outer PCR; G=Größenstandard (0-1000 bp), PCR-Produkte 1,3,5,19,22,30,32,33 und 40 zeigen positive Banden für Plasmodien bei 240 Basenpaaren (bp), k1=Kontrolle für *P. falciparum*, k2=Kontrolle für *P. malariae*, k3=Kontrolle für *P. ovale*, n=negative Kontrolle.



Labordokumentation 2: Spezies-spezifische Nested PCR: Reihe 1 für *P. falciparum*, Reihe 2 für *P. malariae*, Reihe 3 für *P. ovale*; G=Größenstandard (0-1000 bp); PCR-Produkte 1-9 und 11-14 positiv für *P. falciparum* bei 205 bp, PCR-Produkt 10 positiv für *P. malariae* bei 144 bp; kein PCR-Produkt positiv für *P. ovale* bei 787 bp; k1=Kontrolle *P. falciparum*, k2=Kontrolle *P. malariae*, k3=Kontrolle *P. ovale*, n=negative Kontrolle.

2.6 MSP-Genotypisierung von *P. falciparum*

2.6.1 Allel-spezifische PCR

DNA-Eluat (n=139), in denen die Genus- und Spezies-spezifische PCR *P. falciparum* amplifiziert hatte (vgl. Kapitel 2.5.1), wurden mittels MSP-Genotypisierung auf eine mögliche Diversität der Infektion hin untersucht. MSP-1- und -2-Varianten wurden mit einer Allelfamilien-spezifischen *Nested*-PCR (Robert et al. 1996) amplifiziert und entsprechend ihren Längenpolymorphismen klassifiziert (vgl. Kapitel 2.6.2). Die MSP-1-*Outer*-PCR synthetisierte ein 460 bis 480 Basenpaare (bp) langes DNA-Fragment. Drei *Nested*-PCRs amplifizierten hieraus spezifisch DNA-Fragmente der MSP-1-Allelfamilien RO33 (150 bis 280 bp), K1 (100 bis 300 bp) und Mad20 (100 bis 300 bp). Das 700 bis 900 Basenpaare lange MSP-2-Fragment, Produkt einer weiteren *Outer*-PCR, wurde in zwei Allelfamilien-spezifische *Nested*-PCRs eingesetzt, die 3D7-

Allele (ca. 270 bp) und FC27-Allele (ca. 400 bp) nachwiesen. Zur Differenzierung der *Nested-PCR*-Produkte wurden die Vorwärts-Primer der *Nested-PCRs* mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert: RO33 HEXTM-markiert (grün) und Mad20 und 3D7 FAMTM-markiert (blau) (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland), K1 und FC27 NEDTM-gelabelt (gelb, bzw. schwarz in der GenMapper Software, vgl. Kapitel 2.6.2) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Die Primer-Sequenzen lauten wie folgt (Robert et al. 1996):

MSP-1, A: 5'-AAG CTT TAG AAG ATG CAG TAT TGAC-3', B: 5'-ATT CAT TAA TTT CTT CAT ATC CATC-3'. K1, K1: 5'-GAA ATT ACT ACA AAA GGT GCA AGTG-3', K2: 5'-AGA TGA AGT ATT TGA ACG AGG TAA AGTG. Mad 20, M1: 5'-GAA CAA GTC GAA CAG CTG TTA-3', M2: 5-'TGA ATT ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA-3'. RO33, R1: 5-'GCA AAT ACT CAA GTT GTT GCA AAGC-3', R2: 5-'AGG ATT TGC AGC ACC TGG AGA TCT-3'. MSP-2, 1: 5-,ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA-3', 4: 5-'ATA TGG CAA AAG ATA AAA CAA GTG TTG CTG-3'; 2: 5-'AAC GAA TTC ATA AAC AAT GCT TAT AAT ATG AGT-3', 3: 5-'GAT GAA TTC TAG AAC CAT GCA TAT GTC CAT GTT-3'.

Materialien: vgl. Kapitel 2.5.1

Methoden:

Outer-PCR (20 µl PCR-Ansatz):

- DNA-Probe 2 µl
- Forward- und Reverse Primer je 0,5µl
- dNTPs 0,4 µl
- 10x Puffer 2 µl
- Taq DNA-Polymerase 0,12 µl
- H₂O 14,48 µl.

Nested-PCR (20 µl PCR-Ansatz):

- DNA-Probe 1 µl
- Forward- und Reverse Primer je 0,5 µl
- dNTPs 0,4 µl
- 10xPuffer 2 µl
- Taq DNA-Polymerase 0,12 µl
- H₂O 15,48 µl.

Die PCRs wurden unter folgenden Bedingungen im T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt:

Outer-PCR MSP-1:

- a) Initiale Denaturierung 95°C 4 min.
- b) Denaturierung 94°C 30 sec.
- c) Annealing 56°C 40 sec.
- d) Extension 72°C 40 sec.
- e) Wiederholung von b) bis d) in 40 Zyklen
- f) Finale Extension 72°C 10 min.
- g) Abkühlen auf 4°C.

Outer-PCR MSP-2:

Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR MSP-1, bis auf c): Annealing-Temperatur: 52°C.

Nested-PCR RO33:

Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR MSP-1, bis auf c): Annealing-Temperatur: 63°C.

Nested-PCR Mad20:

Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR MSP-1, bis auf c): Annealing-Temperatur: 65°C.

Nested-PCR K1:

Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR MSP-1, bis auf c): Annealing-Temperatur: 66°C.

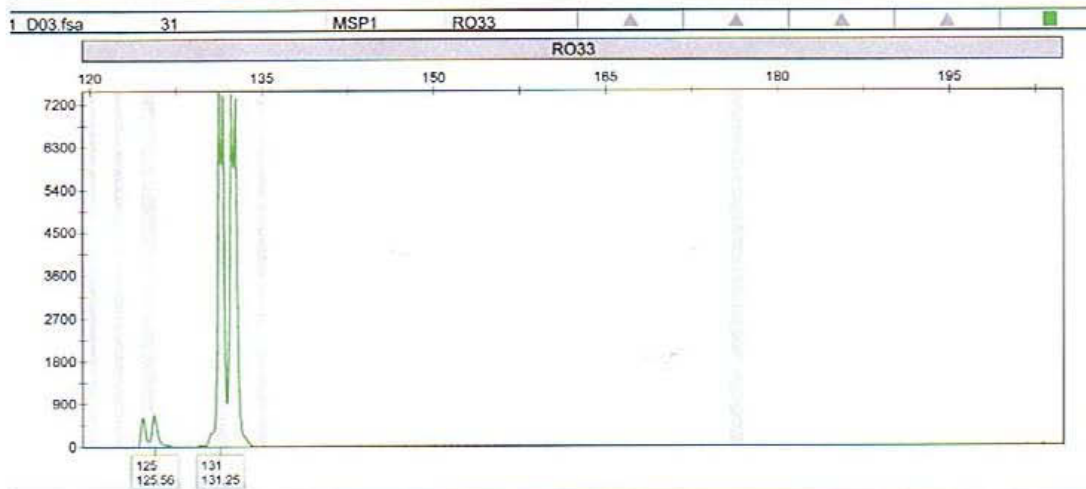
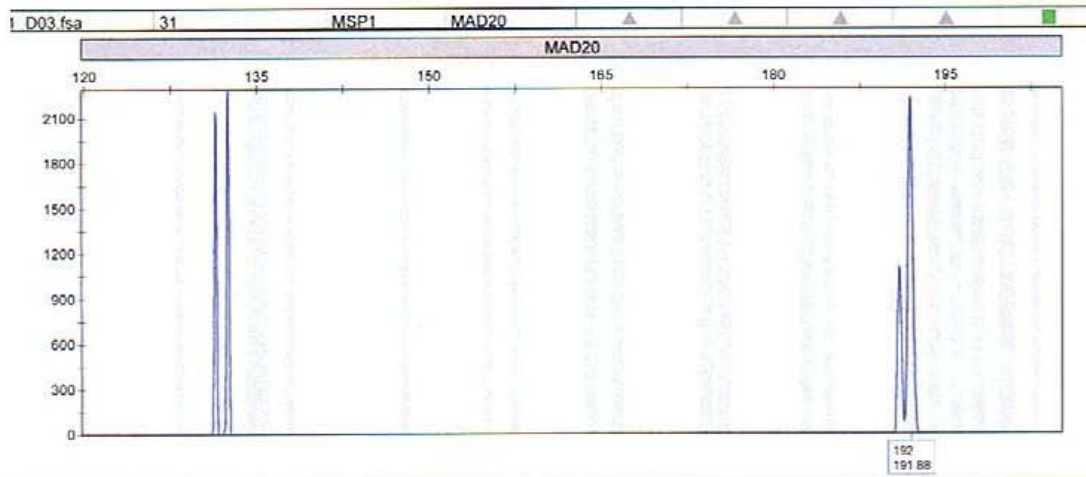
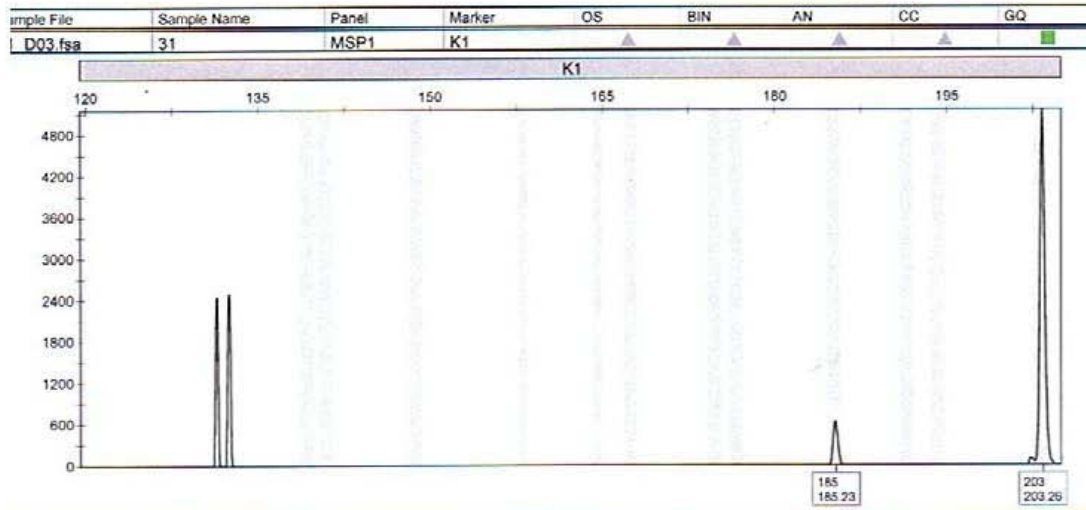
Nested-PCRs 3D7 und FC27:

Die PCR-Bedingungen entsprechen denjenigen der Outer-PCR MSP-1, bis auf c): Annealing-Temperatur: 55°C, sowie Wiederholung von b) bis d) in 38 Zyklen.

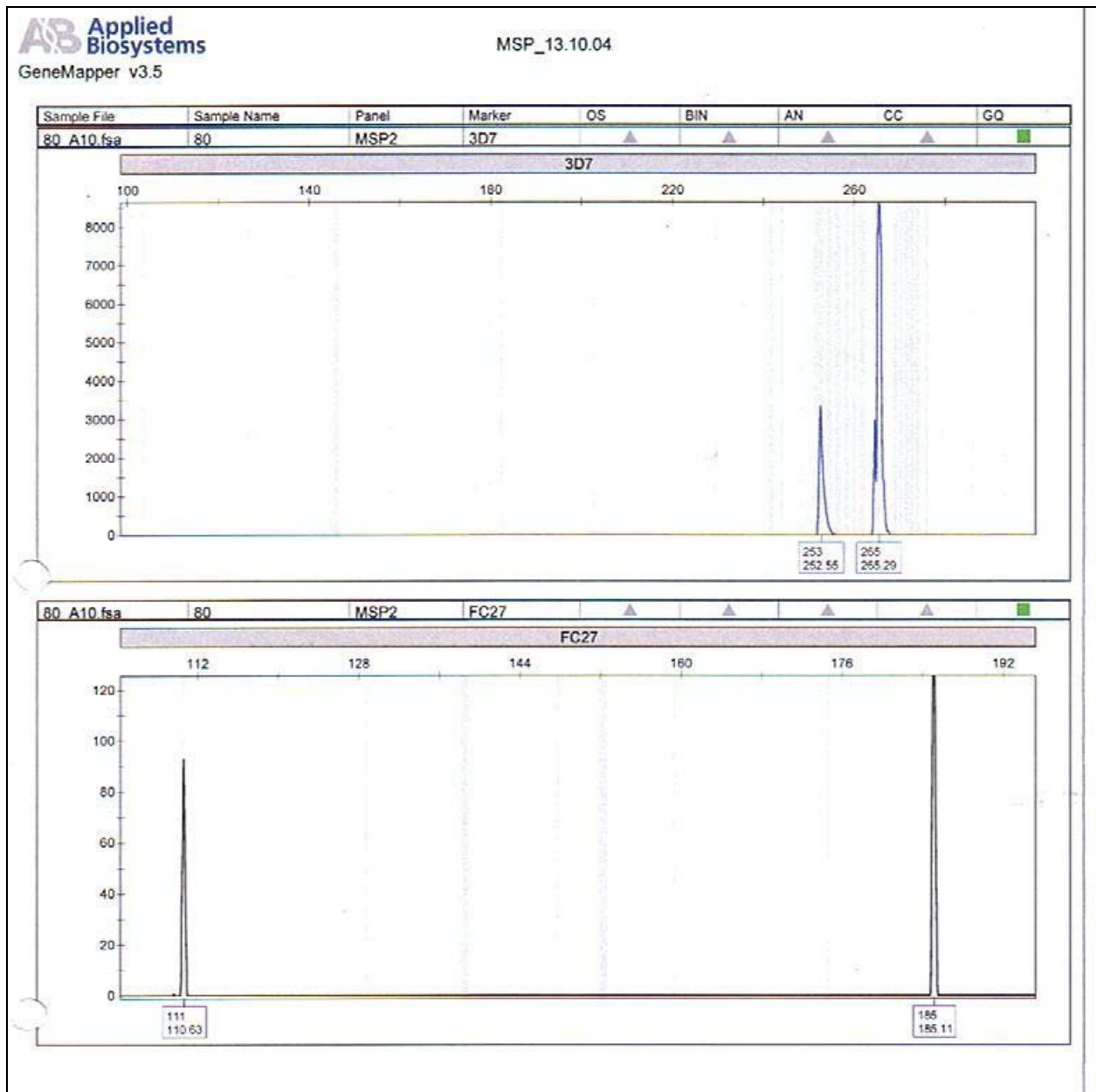
2.6.2 Genetic Analyser

Die Fragmentgrößen der MSP-1- und MSP-2-*Nested*-PCR-Produkte (vgl. Kapitel 2.6.1) wurden mit einer Auflösung von einem Basenpaar auf dem ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser unter Einsatz der GENEMAPPER[®] 3.5 Software (Applied Biosystems) ermittelt. Die PCR-Produkte

wurden im Verhältnis 1:4 mit H₂O verdünnt. 2 µl dieses Eluats wurden mit jeweils 15 µl HiDi™-Formamid und 0,25 µl GeneScan®-ROX500™-Längenstandard (Applied Biosystems) vermischt und wie folgt untersucht: Die DNA-Fragmente wurden denaturiert, die Einzelstränge dann elektrophoretisch im Polymer (POP6) aufgetrennt. Die fluoreszierenden Farbstoffe, mit denen die *Primer* markiert waren (vgl. Kapitel 2.6.1), wurden mit einem Laser angeregt und ermöglichten die Erstellung eines virtuellen Gelbildes. Der Kapillarsequenzierer arbeitete dabei mit 16 Kapillaren, in denen die Proben getrennt voneinander verarbeitet wurden; eine Verfälschung des Ergebnisses durch Nachbarproben wurde so verhindert. Die GENEMAPPER®-Software erstellte ein Elektropherogramm; sie setzte die Fragmentlängen in Peaks unterschiedlicher Intensität um und benannte diese mit Allelnamen (in ganzen Zahlen), die einer gerundeten Anzahl von Basenpaaren entsprachen (siehe Labordokumentation 3 und 4). Die Signalintensität von 80 Fluoreszenz-Einheiten wurde als unterer Grenzwert gewählt, um Allel-Peaks von Hintergrundsignalen zu unterscheiden.



Labordokumentation 3: GENEMAPPER®-Darstellung K1-Fragmente in schwarz, Mad20-Fragmente in blau und RO33-Fragmente in grün (siehe Erklärung zu Labordokumentation 4).



Labordokumentation 4: GENEMAPPER®-Darstellung: MSP-2-PCR-Produkte als Peaks: Position auf der x-Achse entsprechend der Fragmentlänge des PCR-Produkts in Basenpaaren, Höhe des Peaks auf der y-Achse entsprechend der Intensität des Signals in Fluoreszenzeinheiten. Mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Primer zeigen im GENEMAPPER®-Programm 3D7-Fragmente in blau und FC27-Fragmente in grün.

2.7 Falldefinitionen und diagnostische Parameter

Malaria wurde definiert als asexuelle Parasitämie mit entweder einer rektal gemessenen Körpertemperatur von $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$ oder anamnestisch Fieber oder Krankheitszeichen in den letzten 48 Stunden. Fieber, Abgeschlagenheit, Anämiezeichen wie blasse Lidränder und Handflächen und Tachypnoe bezeichneten eine symptomatische Infektion. Eine andere Ätiologie der Krankheit (Infekt der Atemwege, Harnwegsinfekt, Meningitis, Gastroenteritis) wurden, wenn möglich, klinisch ausgeschlossen. Der Hämoglobinwert der Kinder floss in die klinische Einschätzung der Untersucherin oder des Untersuchers vor Ort ein. Untersucherinnen und Untersucher waren deutsche oder ghanaische Ärztinnen oder Ärzte oder deutsche Medizinstudentinnen und -studenten in einem fortgeschrittenen klinischen Semester. Bei den Studienkindern wurde nicht wie in einem Krankenhauskollektiv per se von einer Krankheit ausgegangen.

Die Bezeichnung symptomatische Parasitämie entspricht der Definition für Malaria. Als asymptomatische Parasitämie wurde eine asexuelle Parasitämie ohne Symptome und mit einer Körpertemperatur unter $38,0^{\circ}\text{C}$ definiert.

Malariaanämie wurde definiert als eine Parasitämie zusammen mit einem Hämoglobinwert von $< 7,5$ g/dl. Der Hämoglobinwert wurde vor Ort im Kapillarblut mittels eines Stichs in die Ferse oder Fingerkuppe des Kindes mit einem HemoCue-Photometer ermittelt (HemoCue Hemoglobin Analyzer, HemoCue GmbH, Großostheim, Deutschland). Die Hämoglobinmessung beruht auf dem Prinzip der Transmissionsphotometrie; 10 μl Vollblut werden für eine einzelne Messung benötigt.

2.8 Datenanalyse

Statistische Auswertungen wurden vorgenommen mit der STATA® 8.2 Software (StataCorp LP, College Station, USA), mit JMP®, Version 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) und Microsoft Excel®.

Die größere Anzahl von entweder MSP-1- oder MSP-2-Fragmenten im Isolat eines Individuums ging in die Beschreibung des Ausmaßes der Multiplizität dieser einzelnen Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) ein. Der MOI-Mittelwert errechnete sich, indem die Summe der individuellen MOIs durch die Anzahl der Proben, die mittels PCR als *P.falciparum*-positiv gewertet worden waren, geteilt wurde. Die Diversität einer Infektion wurde als Anteil ihrer MSP-Allele an der Gesamtheit aller MSP-Fragmente dargestellt.

Chi-square-Tests lieferten Aussagen über den Vergleich der Prävalenz der Infektion in der Regen- und Trockenzeit. Zur Beurteilung eines Effekts dienten *odds ratios* (OR) mit einem Konfidenzintervall von 95%. Bei nicht-normal verteilten Parasitämien und MOIs ermöglichten Wilcoxon-Tests, saisonale Variationen darzustellen. Ein P-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Mikroskopie

3.1.1 Prävalenz und Parasitämien

Von 1070 untersuchten Dicken Tropfen im Zeitraum Januar bis Dezember 2003 wurden 144 als mikroskopisch positiv für Plasmodien gewertet. Die Prävalenz der Plasmodieninfektion bei drei Monate alten Kindern lag im Untersuchungszeitraum bei 13,5%. 140 der 144 Infektionen waren Monoinfektionen mit *P. falciparum* (97,2%). In drei Fällen lag eine Mischinfektion von *P. falciparum* und *P. ovale* vor (K18, K344, K512). Eine Monoinfektion mit *P. ovale* (K694) wurde gefunden.

Die Parasitämien der 144 infizierten Kinder reichten von 24 bis 45180 Erregern/ μ l. Der Median der Parasitendichte lag bei 1200 Parasiten/ μ l mit einer oberen Quartile von 3230 Parasiten/ μ l und einer unteren Quartile von 263 Parasiten/ μ l (Mittelwert der Parasitämie 2689 Parasiten/ μ l, Standardabweichung 4826 Parasiten/ μ l).

3.1.2 Qualität der Mikroskopie

Die Abbildungen 3 und 4 beschreiben, welche Schwankungen zwischen den Leseergebnissen eines Präparats vorlagen.

3.1.2.1 Relative Schwankungen der mikroskopischen Lesungen

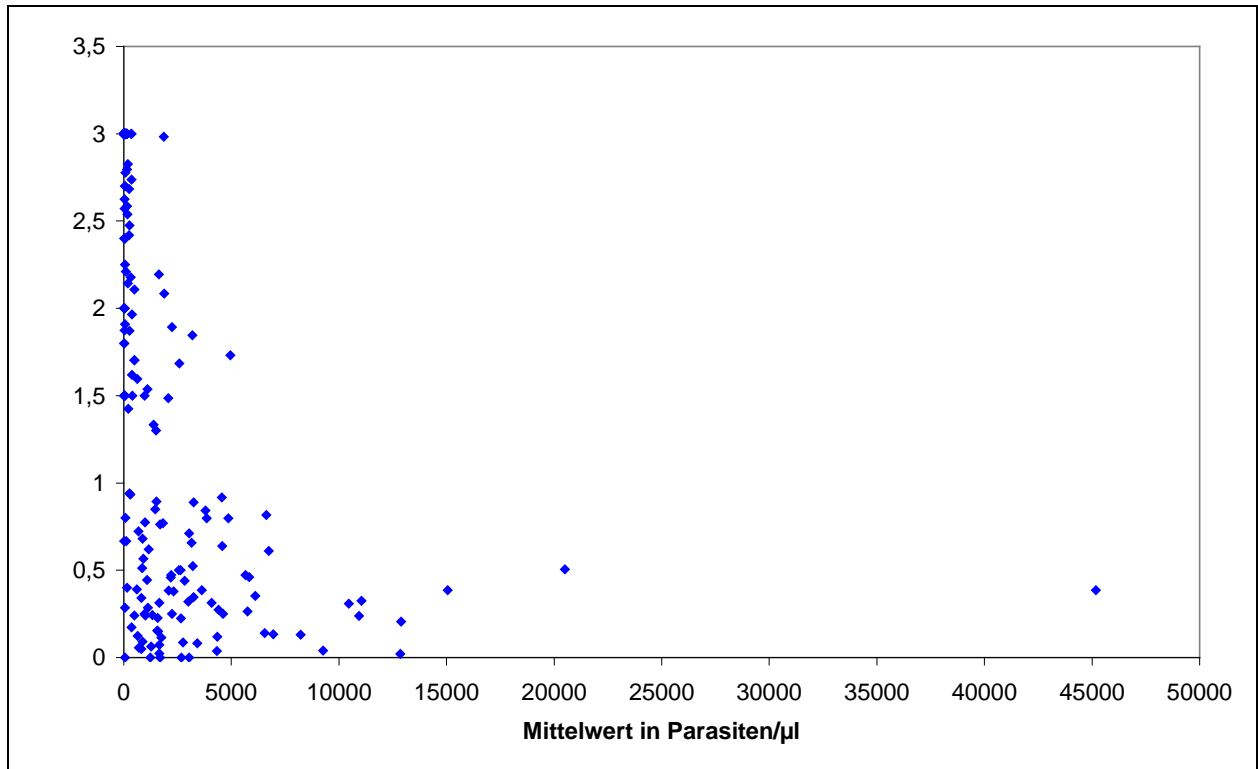


Abbildung 3: Schwankungen der zwei bzw. drei mikroskopischen Lesungen

Abbildung 3 integriert alle Präparate, die mindestens ein Mal als Plasmodien-positiv beurteilt wurden ($n = 199$). Sie beschreibt den Minimal- (min) und Maximalwert (max) der zwei bzw. drei Lesungen in Bezug auf den daraus errechneten Mittelwert. Es zeigt sich, dass min und max an den Mittelwert heran rücken, wenn dieser – bei Infektionen mit größerer Parasitendichte – höhere Werte einnimmt: $(\max - \min) / \text{Mittelwert}$ liegt dann zwischen 0 und 1. Bei Parasitämien auf niedrigerem Niveau zeigt sich eine größere Varianz der Lesungen: $(\max - \min) / \text{Mittelwert}$ wird > 1 , wenn die Werte sehr voneinander abweichen und/oder eine von drei Lesungen mit 0 Parasiten/µl definiert worden war.

Punkte, die sich an $y = 3$ häufen, verdeutlichen beispielsweise folgende Konstellation: 1. Lesung: 16 Parasiten/µl, 2. und 3. Lesung: 0 Parasiten/µl. Damit wird $(\max - \min) / \text{Mittelwert} = (16 - 0) / 5,3333 \approx 3$. Weitere 54 Lesungen bieten mit ebenfalls zwei negativen Lesungen eine ähnliche Konstellation.

3.1.2.2 Verteilung von Median, Mittelwert und Maximalwert

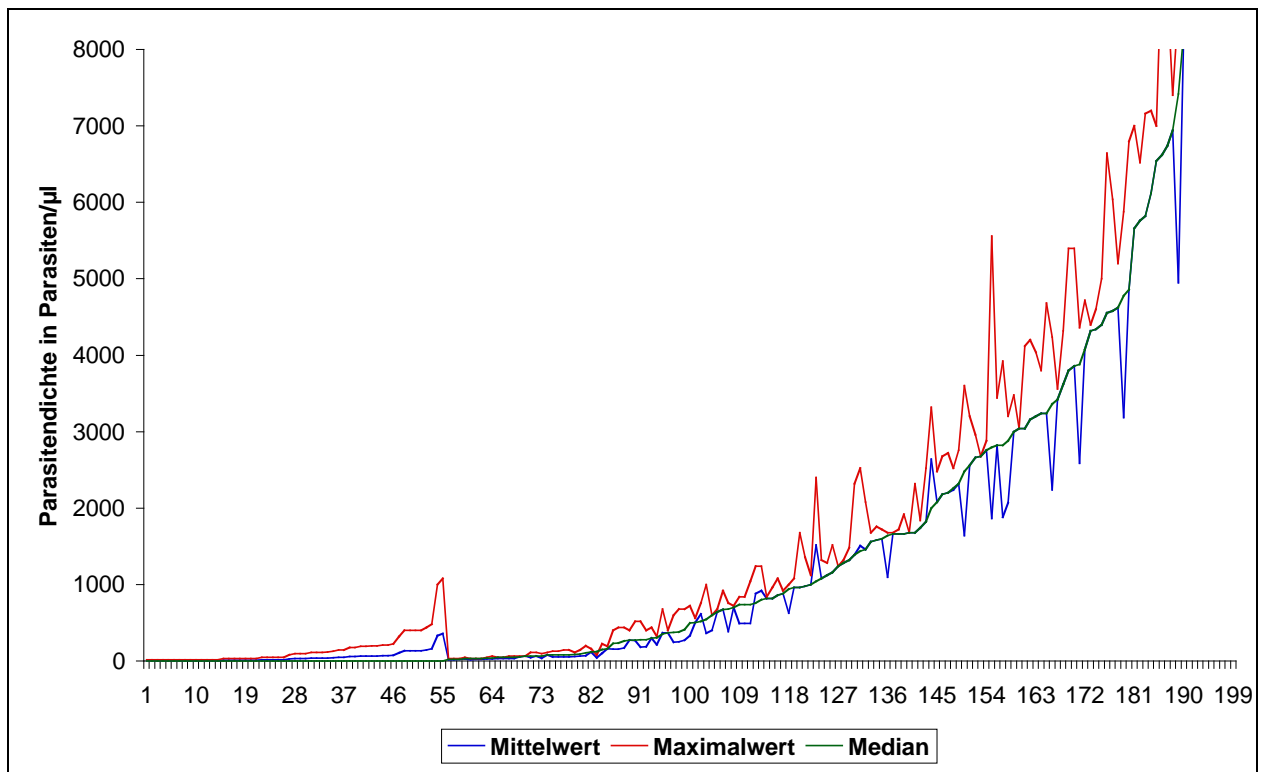


Abbildung 4: Median, Mittelwert und Maximalwert der mikroskopischen Lesungen in Parasiten/ μl (y-Achse), 199 Slides mit mindestens einer positiven Lesung (x-Achse)

Abbildung 4 setzt Median, Mittelwert und Maximalwert der zwei bzw. drei mikroskopischen Lesungen jeweils eines Präparats in Bezug zueinander. 199 Slides fließen in die Kurve ein: Sie sind auf der x-Achse aufgetragen, sortiert nach dem Median der Parasitendichte in aufsteigender Richtung. Die ersten 55 sind Plasmodien-negativ bei einer positiven Lesung; weitere 144 sind Plasmodien-positiv. Die 199 Präparate verteilen sich mit zunehmender Parasitendichte bezogen auf den Median von links nach rechts. Die Präparate 1 bis 55 (Plasmodien-negativ) weisen einen Median von 0 auf; im Bereich 50 bis 55 der X-Achse beschreiben die jeweils positiven Lesungen jedoch hohe Parasitämien, die in diesem Fall von schlechter Lesequalität oder Verwechslungen der Präparate zeugen. Ab Slide 56 steigt die grüne Median-Kurve stetig an; ihr gleichmäßiger Anstieg spiegelt das breite Spektrum an Parasitämien wider. Idealerweise sollten bei guter mikroskopischer Lesequalität Median und Mittelwert aufeinander fallen. Der Maximalwert bildet die obere Begrenzung der Grafik.

3.2 DNA-Isolierung

Zwei Methoden der DNA-Extraktion (vgl. Kapitel 2.3) sollten anhand einer kleinen Stichprobe verglichen werden, um die DNA aller Blutproben dann mittels der besseren Methode zu isolieren, um ein vergleichbares Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchungen zu erreichen. Filter-Papiere und entsprechende Kapillarblutproben von elf Kindern, die eine mikroskopisch gesicherte (doppelte unabhängige Lesung) Plasmodieninfektion aufwiesen, wurden zufällig ausgewählt, die DNA isoliert (vgl. Kapitel 2.3) und Plasmodien-Fragmente amplifiziert (vgl. Kapitel 2.5.1). Es zeigte sich, dass alle PCRs von elf ausgewählten Filter-Papier-Eluaten positiv für Plasmodien waren (100%); nur sechs von elf PCRs, deren DNA-Template per Macherey-Nagel-Methode aus 50-100 µl Kapillarblut isoliert worden war, zeigten auf dem Agarosegel Banden (54,6%). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen PCR-Ergebnis und Parasitämie. Methode unserer Wahl für die DNA-Extraktion aller Isolate war im Folgenden die DNA-Isolierung aus Filter-Papieren der Firma Schleicher&Schuell.

Einhundertdrei Proben auf Filter-Papiere eines anderen Herstellers wurden wegen mangelhafter Qualität aus allen weiteren molekulargenetischen Untersuchungen ausgeschlossen. Diese waren Proben der Studienkindern K1 bis K103 zugeordnet. Die neun mikroskopisch gesicherten Plasmodieninfektionen innerhalb dieser Gruppe konnten molekularbiologisch (vgl. Kapitel 2.5.1) auch nach mehrmaligen (zwei bis vier) Versuchen nur in einem einzigen Fall nachgewiesen werden.

3.3 Messung der DNA-Konzentration mittels Fluoreszenz-Methodik (PicoGreen)

DNA von 20 Eluaten aus Filter-Papieren wurde mittels der PicoGreen-Methode quantifiziert (vgl. Kapitel 2.4). Bei allen Proben wurden Plasmodien mikroskopisch nachgewiesen. Der Plasmodien-DNA-Gehalt lag bei allen 20 Eluaten im nicht messbaren Bereich, obwohl die PCR plasmoidale DNA amplifizieren konnte.

Die PicoGreen-Intentionsmessungen von zehn Eluaten der Macherey-Nagel-Kapillarblut-Methode (vgl. Kapitel 2.3), die ebenfalls - wie aus mikroskopischen Paralleluntersuchungen bekannt - eine Plasmodieninfektion aufwiesen, lieferten nur positive Ergebnisse: Der plasmoidale und humane DNA-Gehalt entsprach im Median 22,9 ng. Der Anteil plasmoidaler DNA in der Gesamt-DNA kann allerdings nicht ermittelt werden. Die Amplifizierung plasmoidaler DNA und ihre Visualisierung mittels Gelelektrophorese gelang jedoch nur bei sechs der zehn Proben.

3.4 Genus- und Spezies-spezifische PCR

3.4.1 Prävalenz der Infektion

103 Filter-Papiere konnten nicht verwertet werden (vgl. Kapitel 3.2), weitere neun Filter-Papiere (K304 bis K311 und K602) aus der Kohorte von 1070 Studienkindern waren nicht verfügbar.

139 der 958 Proben erwiesen sich in der PCR als positiv für Plasmodien. Die hieraus resultierende Prävalenz von 14,5% lag somit in der selben Größenordnung wie das mikroskopische Resultat (Prävalenz = 13,5%, vgl. Kapitel 3.1.1). Die Schnittmenge der mikroskopisch und molekular-genetisch definierten Plasmodieninfektionen betrug 106. Dreiunddreißig positive PCR-Ergebnisse können somit als submikroskopisch eingestuft werden (3,4%) oder waren falsch positiv. Wird von der Richtigkeit sowohl der Mikroskopie als auch der PCR ausgegangen, ergibt sich eine Prävalenz von insgesamt 16,5% in der Studiengruppe ((144+33)/1070, vgl. Kapitel 3.1.1).

3.4.2 Speziesdifferenzierung

Von 139 positiven Spezies-spezifischen PCR-Ergebnissen waren 120 (86,3%) in der Genus-spezifischen PCR für *P. falciparum* positiv. Zwei *P. malariae*-Infektionen wurden detektiert, sowie eine Mischinfektion mit *P. falciparum* und *P. malariae*. 16 Proben blieben in der Genus-spezifischen PCR ohne Ergebnis. Eine *P. ovale*-Infektion ließ sich nicht nachweisen bei jeweils mitlaufender positiver *P. ovale*-Kontrolle.

3.5 Vergleich Mikroskopie und PCR

3.5.1 PCR-Nachweis von Plasmodien und Parasitendichte

In den Vergleich der Methoden PCR und Mikroskopie zum Nachweis von Plasmodien gingen 958 Proben ein (vgl. Kapitel 3.4). Die Zahl der positiv gewerteten dicken Tropfen betrug 133. Von diesen 133 mikroskopisch gesicherten Plasmodieninfektionen wurden 106 molekular-genetisch bestätigt (79,7%); die restlichen 27 DNA-Proben waren in den Plasmodien-spezifischen PCRs negativ. Abbildung 5 setzt positive und negative PCR-Ergebnisse bei positivem Dicken Tropfen in Relation zu der entsprechenden Parasitendichte. Die 106 Plasmodien-positiven Dicken Tropfen, deren Ergebnisse durch die PCR bestätigt wurden, wiesen eine höhere Parasitendichte auf (geometrisches Mittel = 1479,7 Parasiten/ μ l) als die übrigen 27 (geometrisches Mittel = 110,1 Parasiten/ μ l), die die PCR als falsch negativ wertete ($p < 0,001$). Der Median lag bei 1660 Parasiten/ μ l versus 66 Parasiten/ μ l. Im Bereich der 25%- bis 75%-Quartile lag die Parasitendich-

te im ersten Fall zwischen 730 und 3930 Parasiten/ μ l, im zweiten Fall zwischen 40 und 236 Parasiten/ μ l, (vgl. Box Plots, Abbildung 5). Falsch negative PCR-Ergebnisse gehen also einher mit geringeren Parasitämien.

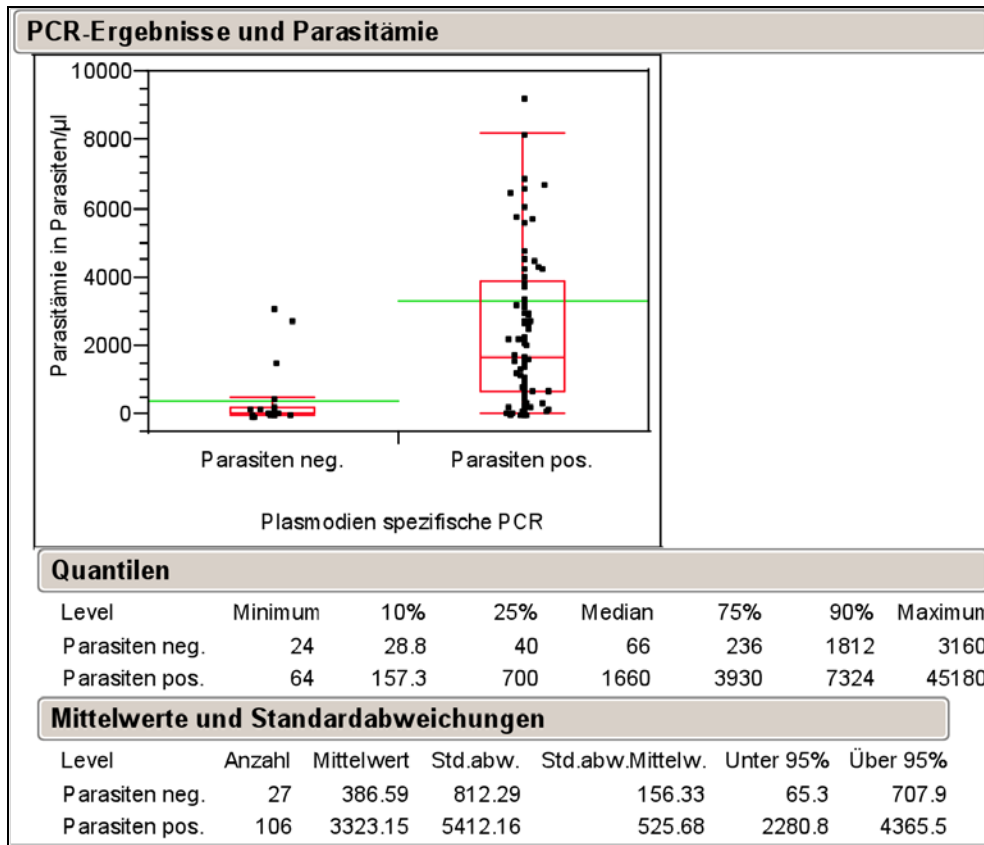


Abbildung 5: 133 mikroskopisch gesicherte Plasmodieninfektionen, Parasitendichte von PCR-negativer versus PCR-positiver Gruppe (rot: Box Plots, rotes Rechteck: 25-75%-Quartile, darin grün Median-Linie).

3.5.2 Sensitivität, Spezifität und positiver prädiktiver Wert der PCR

Die Sensitivität und Spezifität der PCR sowie der positive prädiktive Wert errechnen sich mit Hilfe von 4-Felder-Tests. Als Goldstandard wurde die mikroskopische Lesung gewählt. Insgesamt wurde eine Sensitivität von 80% erreicht (106 PCR-Proben waren richtig positiv von 133 mikroskopisch positiven Proben). Erst bei steigenden Parasitämien erhöhte sich die diagnostische Aussagekraft der Plasmodien-spezifischen PCR. Wurde beispielsweise erst eine Parasitendichte von mindestens 300 Parasiten/ μ l als positiv gewertet, erhöhte sich die Sensitivität der PCR deutlich auf 94,8%. Bei Parasitämien von 600 Parasiten/ μ l wurde die maximale diagnostische Sensitivität der PCR mit 96,6% erreicht, allerdings auf Kosten der Spezifität (vgl. Abbildung 6).

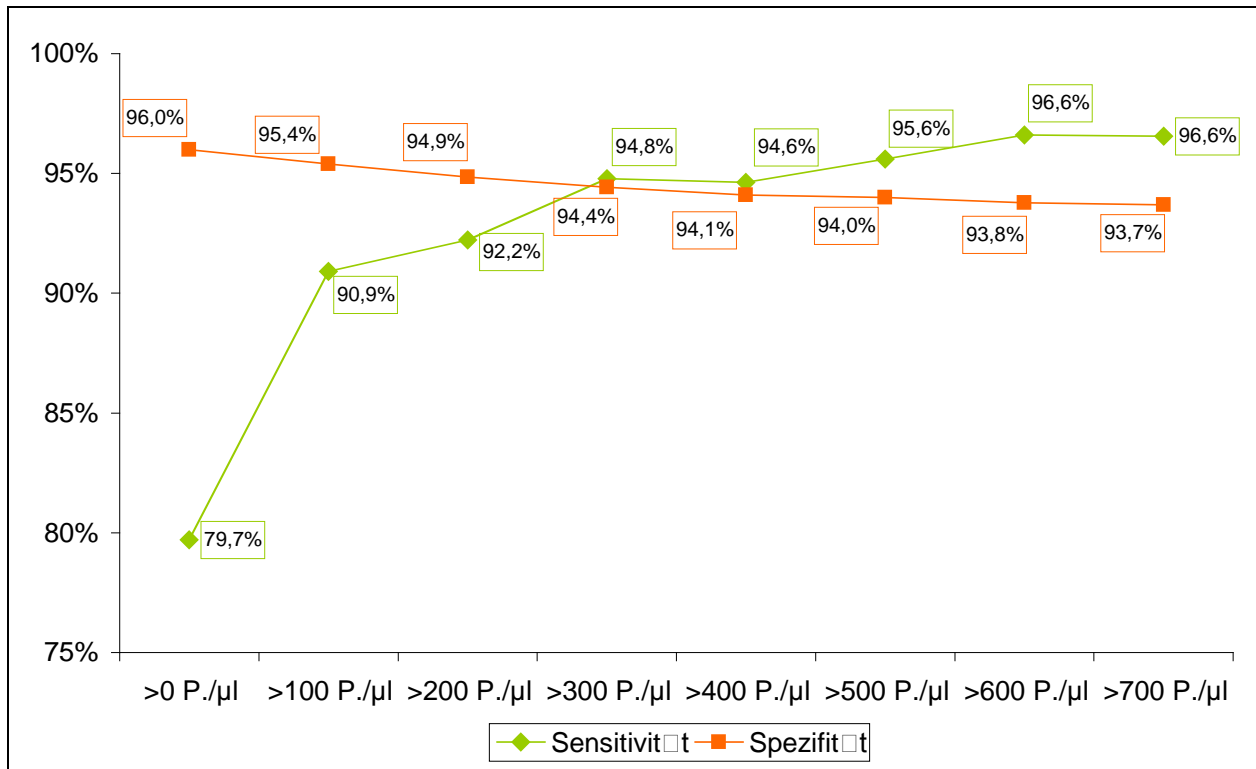


Abbildung 6: Sensitivität und Spezifität der PCR im Vergleich zur Mikroskopie als Referenz in Abhängigkeit von verschiedenen Parasitämien, n=958.

	Alle: > 0 Parasiten/µl	mikroskop.pos. ab 100 Parasiten/µl	Mikroskop.pos. ab 200 Parasiten/µl	mikroskop.pos. ab 300 Parasiten/µl
Sensitivität	106/(106+27)	100/(100+10)	95/(95+8)	91/(91+5)
Spezifität	792/(792+33)	809/(809+39)	811/(811+44)	814/(814+48)
Mikrosk.pos (n)	133	110	103	96
PCR pos. (n)	139	139	139	139
PCR neg. (n)	819	819	819	819
PCR pos., wenn Mikros.pos. (n)	106	100	95	91

	mikroskop.pos. ab 400 Parasiten/µl	mikroskop.pos. ab 500 Parasiten/µl	Mikroskop.pos. ab 600 Parasiten/µl	mikroskop.pos. ab 700 Parasiten/µl
Sensitivität	88/(88+5)	87/(87+4)	85/(85+3)	84/(84+3)
Spezifität	814/(814+51)	815/(815+52)	816/(816+54)	816/(816+55)
Mikrosk.pos (n)	93	91	88	87
PCR pos. (n)	139	139	139	139
PCR neg. (n)	819	819	819	819
PCR pos., wenn Mikros.pos. (n)	88	87	85	84

3.5.3 Prävalenzen der Spezies

Tabelle 1 gibt die Ergebnisse der Speziesdifferenzierung wider. Bei 78,3% bzw. 72,3% der Plasmodien-infizierten Kinder konnte mikroskopisch bzw. mittels PCR eine *P.-falciparum*-Infektion gesichert werden. Der prozentuale Anteil bezieht sich hierbei auf alle nachgewiesenen Infektionen und ist deshalb geringer als der Anteil der mikroskopisch detektierten *P.-falciparum*-Infektionen in der Gruppe der positiven Dicken Tropfen (97%, vgl. Kapitel 3.1). Mikroskopisch ließen sich eine *P.-ovale*-Monoinfektion, molekulargenetisch zwei *P.-malariae*-Monoinfektionen nachweisen. Der Anteil gemischter Infektionen lag lediglich im Bereich von 1% (*P.-ovale*/*P.-falciparum*-Mischinfektion mikroskopisch 1,2%; *P.-malariae*/*P.-falciparum*-Mischinfektion 0,6%). In der Mikroskopie ließ sich keine *P.-malariae*-Infektion darstellen. Die PCR zeigte für *P. ovale* bei laufenden positiven Kontrollen stets negative Ergebnisse an. Die Prävalenz der Plasmodieninfektion lag in der Gruppe der 958 Kinder insgesamt bei 17,3% (positive Mikroskopie n=133 und positive PCR, submikroskopisch n=33). Die submikroskopische Prävalenz betrug 3,4%.

Tabelle 1: Vergleich PCR und Mikroskopie: Speziesdifferenzierung zwischen *P. falciparum* (P.f.), *P. ovale* (P.o.) und *P. malariae* (P.m.).

PCR	Mikroskopie					Summe
	P. f.	P. o.	P. f. + P. o	P. m.	Negativ	
P. f.	93	0	1	0	26	120 (72,3%)
P. o.	0	0	0	0	0	0 (0%)
P. m.	2	0	0	0	0	2 (1,2%)
P. f. + P. m.	1	0	0	0	0	1 (0,6%)
ohne Speziesnachweis	9	0	0	0	7	16 (9,6%)
negativ	25	1	1	0	0	27 (16,3%)
Summe	130 (78,3%)	1 (0,6%)	2 (1,2%)	0 (0%)	33 (19,9%)	166

3.6 MSP-1- und -2-Genotypisierung

3.6.1 MSP-1- und -2-Längenpolymorphismen

Mittels der MSP-Genotypisierung wurden 380 MSP-1-Fragmente amplifiziert und 75 unterschiedliche MSP-1-Allele identifiziert, darunter 35 zugehörig der K1-Familie, 31 der Mad20-Familie und 9 der Ro33-Familie. Die parasitäre Diversität lag somit insgesamt bei 19,7% (75/380). In der K1-Familie fand sich die höchste Anzahl von Fragmenten (n=153, 40,3%); die Anzahl der Mad20-Fragmente betrug dagegen nur 89 (23,4%). Bei nur neun unterschiedlichen Ro33-spezifischen-Fragmenten waren diese 138 Mal vertreten (36,3%).

Die MSP-2-Genotypisierung erbrachte 80 unterschiedliche Allele bei einer Gesamtanzahl von 530 MSP-2-Fragmenten. 47 der Allele gehörten zur 3D7-Familie, 33 zur FC27-Familie. Die parasitäre Diversität der Infektion betrug daher 15,1% (80/530). Die Anzahl der 3D7-spezifischen Fragmente belief sich auf 331 (62,5%); die FC27-Familie wies 199 Fragmente auf (37,5%).

Die Längenpolymorphismen der MSP-1- und -2-Fragmente waren nicht normal verteilt (vgl. Abbildungen 7 und 8).

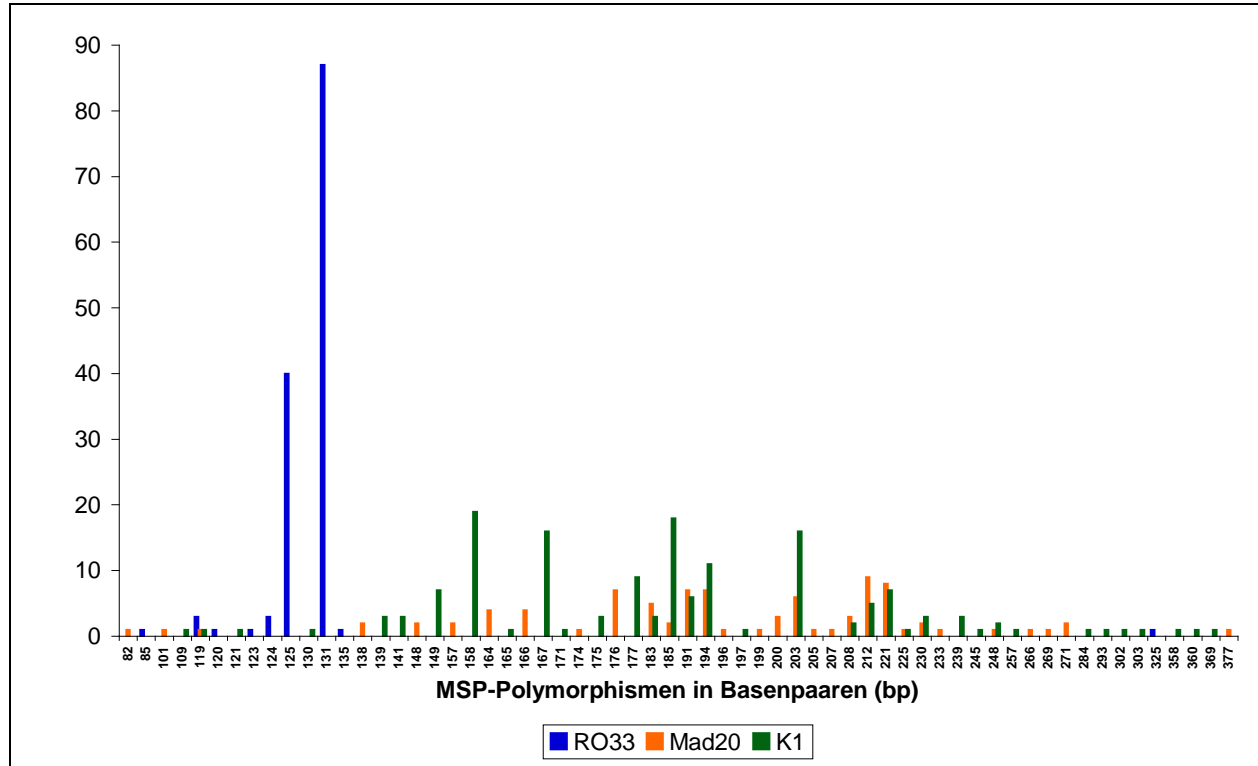


Abbildung 7: Längenpolymorphismen der MSP-1-Familie RO33, Mad20 und K1.

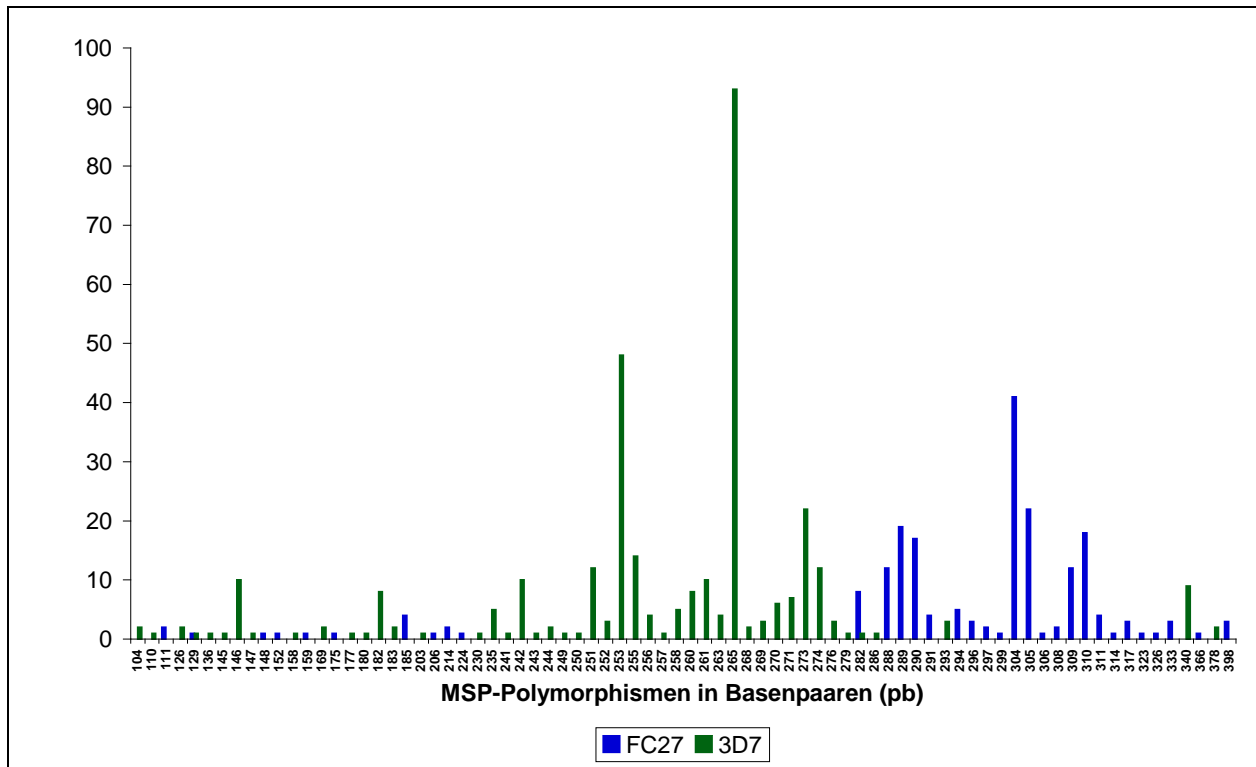


Abbildung 8: Längenpolymorphismen der MSP-2-Familie FC27 und 3D7.

3.6.2 Diversität der Infektion

MSP-Untersuchungsgruppe

Insgesamt wurden 166 PCR- oder Mikroskopie-positive Proben für die MSP-1- und -2-PCR Genotypisierung eingesetzt. Unter den 139 Proben, die in der Spezies-spezifischen PCR positiv waren, gelang der Plasmodiennachweis per MSP-1- und/oder -2-PCR bei 137 Proben. Die 27 Eluate, die sich in der Plasmodien-spezifischen PCR als negativ erwiesen hatten, aber mikroskopisch positiv waren, erbrachten in 18 Fällen (66,7%) ein positives Ergebnis in der MSP-1- und/oder MSP-2-PCR. Unter 33 Proben mit positiver Plasmodien-spezifischer PCR, aber negativem Dicken Tropfen, bestätigte die MSP-Genotypisierung in 32 Fällen (97%) das Vorliegen einer Infektion mit Plasmodien.

155 Kinder (137+18) wurden mittels der MSP-1- und -2-PCR hinsichtlich der Diversität ihrer molekulargenetisch und/oder mikroskopisch gesicherten Plasmodieninfektion untersucht.

3.6.2.1 Klonanzahl im Mittel

Die mittlere Klonanzahl der infizierten Kinder lag bei 3,9 (+/-2,4 Standardabweichung). Die minimale Klonanzahl eines infizierten Kindes betrug 1, die maximale Klonanzahl war 14. Der Median betrug 3 bei einer 25%-Quartile von 2 und einer 75%-Quartile von 6.

3.6.2.2 Multiklonalität und Parasitendichte

Im Folgenden soll die Komplexität der Infektion in Relation zur Parasitämie des Kindes gesetzt werden. Tabelle 2 beschreibt die Klonanzahl in einzelnen Untergruppen, unterteilt nach Nachweismethode und/oder Parasitendichte: Mikroskopisch gesicherte Infektionen mit einer Parasitämie von ≤ 1000 P./ μ l wiesen im Mittel eine Klonanzahl von 3,0 (+/-1,8) auf. Bei submikroskopischen Infektionen konnte bei zweifacher negativer mikroskopischer Lesung ebenfalls von relativ niedrigen Parasitämien ausgegangen werden, die Klonzahl betrug im Mittel 3,2 (+/-1,7). Eine hohe Parasitendichte ab 1001 Parasiten/ μ l scheint mit einer erhöhten Diversität einherzugehen (im Mittel 4,9 Klone, +/-2,5).

Tabelle 2: Plasmodien-infizierte Kinder (n=155), Gruppierung nach Nachweismethode bzw. Parasitendichte.

	Mittlere Klon-Anzahl	Std. abw.	25% Quar-tile	Me-dian	75% Quar-tile
mikroskop.pos. ≤ 100 P./ μ l P. spezif. PCR neg. n=11	1,9	1,4	1	1	2
mikroskop. pos. >100 P./ μ l P. spezif. PCR neg. n=7	1,6	0,8	1	1	2
submikrosk., P. spezif. PCR pos. n=33	3,2	1,7	2	3	5
mikroskop. pos., ≤ 100 P./ μ l P. spezif. PCR pos. n=6	3,5	1,4	2,25	3,5	4,75
mikroskop pos., >100 P./ μ l ≤ 500 P./ μ l P. spezif. PCR pos. n=14	3,1	1,8	2	2	4
mikroskop. pos. >500 P./ μ l ≤ 1000 P./ μ l P. spezif. PCR pos. n=20	3,7	1,8	2	3	6

mikroskop. pos., >1000 P./ μ l \leq 10 000 P./ μ l P. spezif. PCR pos. N=56	4,9	2,6	3	4	6
mikroskop. Pos >10 000 P./ μ l P. spezif. PCR pos. n=8	4,9	2,1	3	5	6,25

Unter 27 Proben mit positivem Mikroskopieergebnis, aber negativer Plasmodien-spezifischer PCR, waren 18 MSP – positiv. Diese wiesen im Mittel eine Parasitendichte von 366 Parasiten/ μ l auf (vgl. Kapitel 3.1.1: mittlere Parasitendichte aller positiver Dicker Tropfen 2689 Parasiten/ μ l (n=144)). In der Gruppe dieser 18 Proben war in der MSP-1-Familie RO33 vorherrschend, das sich kaum polymorph zeigte (131 Basenpaare). In der MSP-2-Familie war nur das 3D7-Allel nachweisbar.

Abbildung 9 zeigt den Zusammenhang zwischen Parasitendichte und Klonanzahl. Die Anzahl der Klone steigt linear mit dem Logarithmus der Parasitendichte (Steigung 0,68, +/- Standardabweichung 0,11). Die lineare Regression ist signifikant (<0,001).

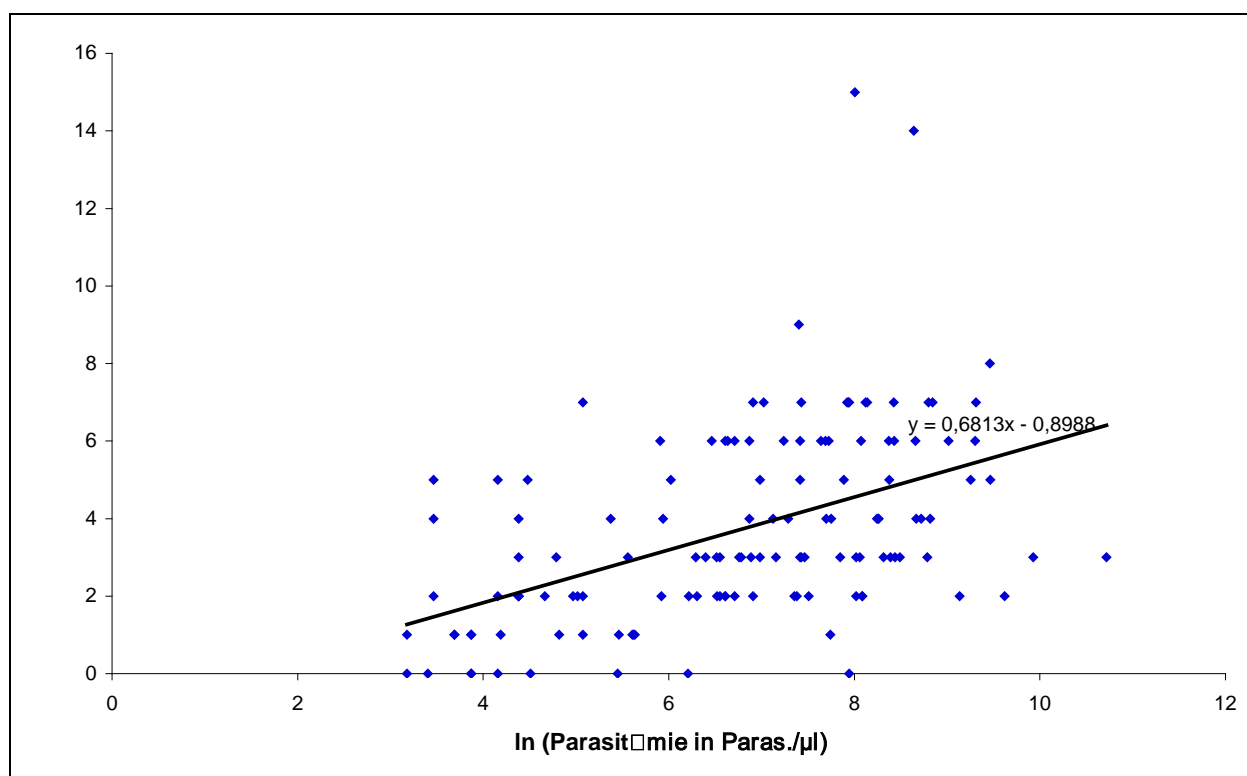


Abbildung 9: Lineare Regression: natürlicher Logarithmus (ln) der Parasitämie und Klonanzahl.

3.6.2.3 Multiklonalität in geschlechts- und ortsspezifischen Gruppen

Die Polyklonalität der Plasmodieninfektion lag bei drei Monate alten Mädchen und Jungen im gleichen Bereich: Mädchen waren im Mittel mit 3,9 Klonen, Jungen mit 3,8 Klonen infiziert (vgl. Abbildung 10).

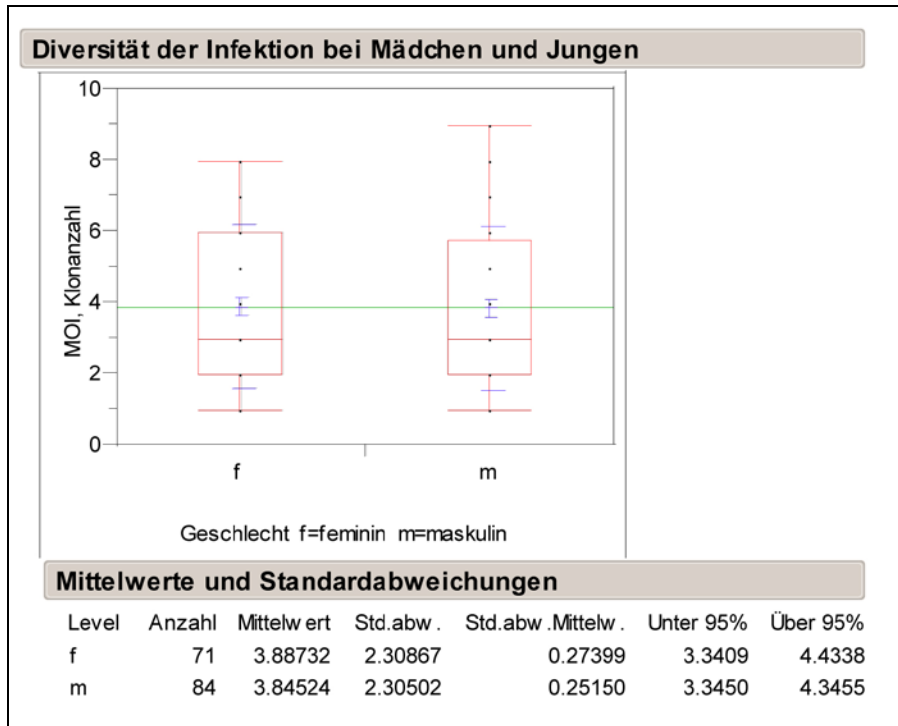


Abbildung 10: Polyklonalität der Infektion bei drei Monate alten Mädchen und Jungen (grün: Mittelwerte, rot: Box Plot, blau: Std.abw.).

Die 155 Kinder, deren Plasmodieninfektion hinsichtlich ihrer Polyklonalität untersucht wurde, leben in neun verschiedenen Dörfern im ländlichen Afigya Sekyere District, Ashanti-Region. Eine signifikante Variabilität in einer ortsgebundenen spezifischen Multiklonalität zeigte sich nicht (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Polyklonalität in den neun Studiendörfern.

	Afama naso n=18	Agona n=15	Asama ng n=11	Bedom ase n=14	Bipoa N=26	Jamasi N=14	Kona N=19	Tano n=24	Wiamo ase n=14
Mittlere Klon- Anzahl	3,7	4,3	3,6	3,1	4,7	3,8	3,4	3,7	3,9
Std.ab w.	1,7	3,6	1,7	1,8	2,7	1,8	2,1	2,0	2,2

25% Quar-tile	3	2	2,5	2	3	2,25	2	2	2
Median	3	4	3	3	4	3	2	3,5	4
75% Quar-tile	4	5,5	4,5	3	6	5,75	5	5,25	5

3.7 Saisonale Verteilung der Malariainfektion

3.7.1 Klima, Prävalenz und Parasitendichte der Infektion

3.7.1.1 Klima in der Ashanti-Region

Die Proben umfassen den Zeitraum 01/2003 bis 12/2003 und ermöglichten so eine Aussage über die saisonale Verteilung der Malariainfektion. Tabelle 5 und Abbildung 11 beschreiben die Niederschläge in Kumasi, Ashanti-Region, übers Jahr verteilt. Monate mit mehr als zehn Regentagen wurden zur Regenzeit gezählt (vgl. Kapitel 2.1), also der Zeitraum von Mai bis Oktober.

Tabelle 5: Klimainformationen Kumasi: <http://www.worldweather.org/151/c00922.htm>, Quelle am 14.11.2006 zitiert.

	Mittlerer Regenfall total (mm)	Mittlere Anzahl der Regentage
Januar	15,1	2
Februar	66,3	5
März	137	9
April	129,3	10
Mai	174,4	14
Juni	214,3	17
Juli	157,5	14
August	89,9	12
September	165,2	17
Oktober	153,3	17
November	74,3	8
Dezember	25,8	3

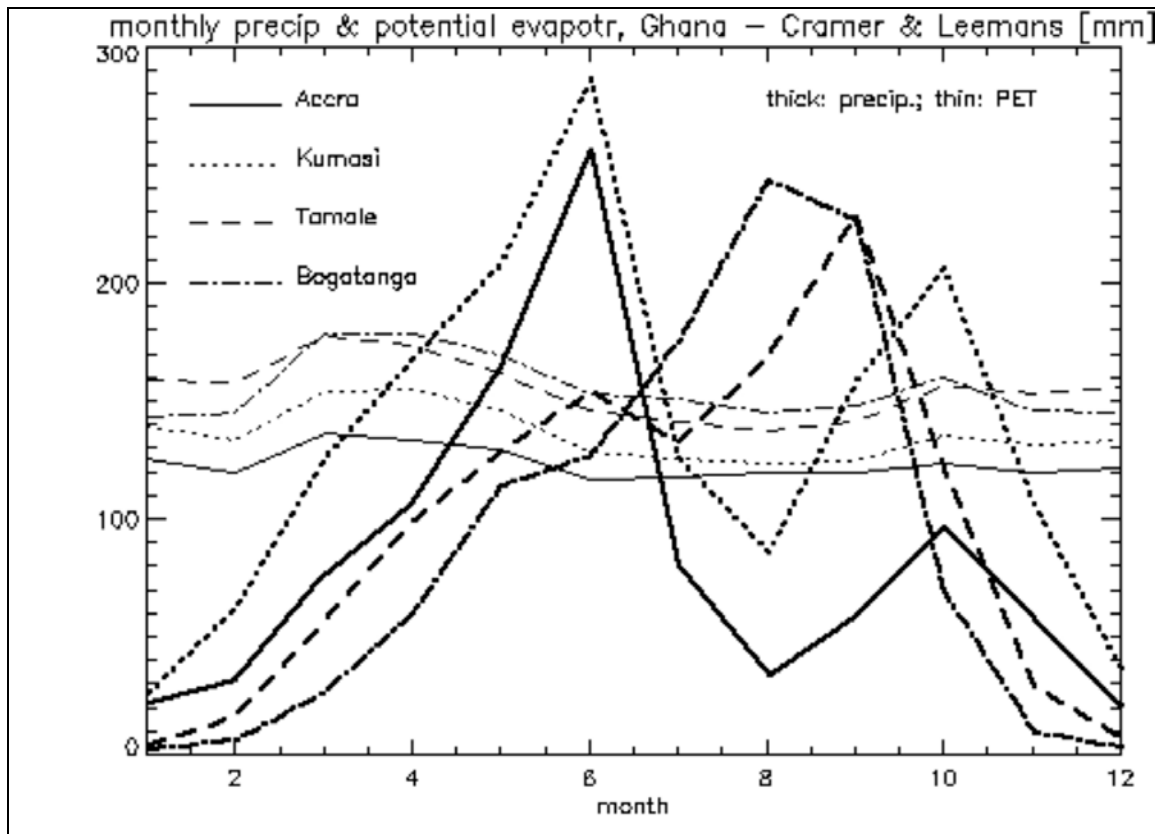


Abbildung 11: Meteorologische Daten, © Cramer&Leemans / Global Precipitation Climatology Centre Offenach (GPCC).

3.7.1.2 Prävalenz

Die Prävalenz der plasmoidalen Infektion schwankte in unserer Studiengruppe in Abhängigkeit von der Jahreszeit. In der Regenzeit (n=503) betrug die Prävalenz der Infektion durchschnittlich 23,2%, in der Trockenzeit (n=567) sank die Prävalenz auf 8,5%. Die jahreszeitliche Differenz der Prävalenzen ist signifikant ($p < 0,001$). Die höchste Prävalenz wurde im August verzeichnet (30%), die geringste Prävalenz im Januar und März (jeweils 8%, vgl. Abbildung 12). Dem Anstieg der mittleren Niederschlagswerte von April bis Juni folgte zeitversetzt ein Anstieg der Prävalenz von Mai bis August. Auch der zweite Niederschlagsgipfel im September wurde mit einem Anstieg der Prävalenz einen Monat später beantwortet. Ein Hochpunkt der Prävalenz im Dezember ging nicht mit vorangehenden hohen Niederschlagswerten einher.

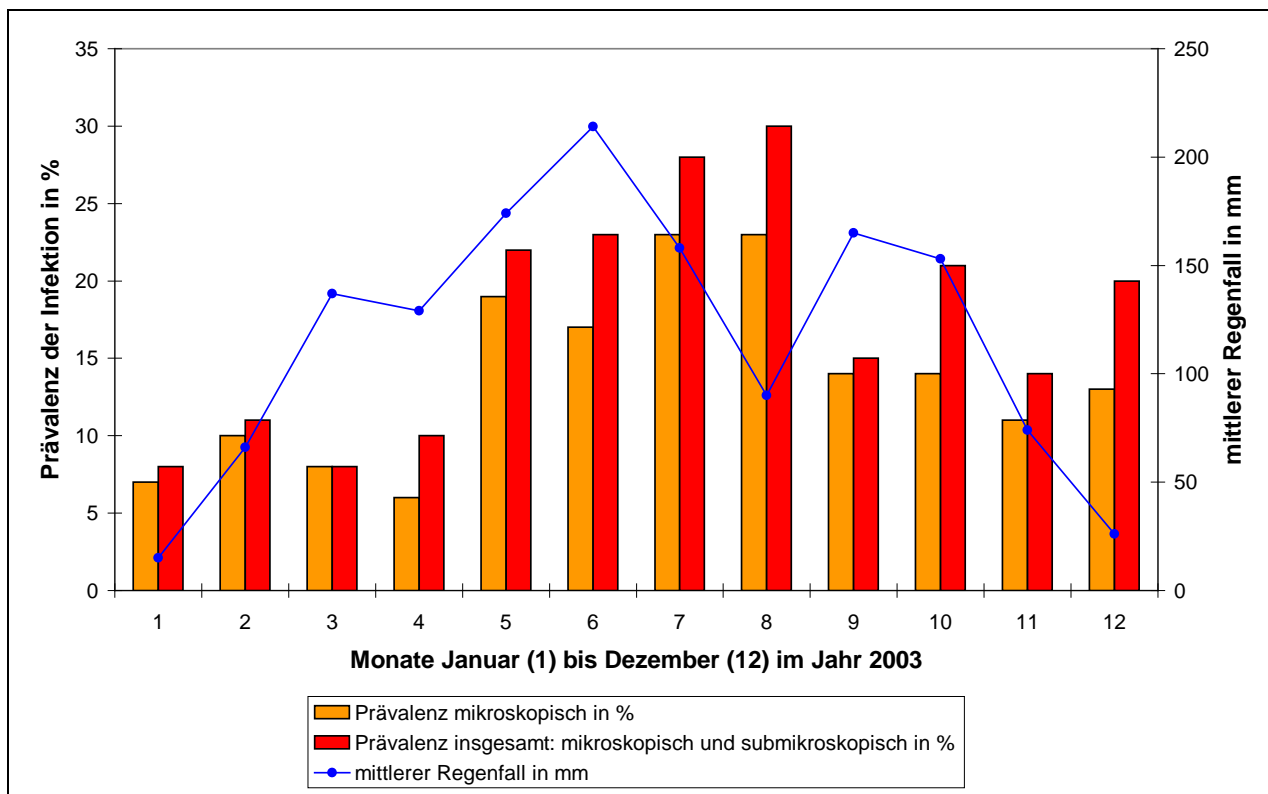


Abbildung 12: Prävalenz der Plasmodieninfektion im Kontext der mittleren Niederschlagswerte im Verlauf eines Jahres.

3.7.1.3 Parasitendichte

In der Regenzeit betrug die mittlere Parasitendichte bei 144 Kindern mit mikroskopisch gesicherter Plasmodieninfektion 2851 Parasiten/ μ l, in der Trockenzeit 2410 Parasiten/ μ l, jeweils mit hohen Standardabweichungen (n.s.). Der Median der Parasitämie lag in der Trockenzeit etwas höher (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Parasitämien in Regen- und Trockenzeit bei 144 infizierten Kindern.

Parasitämie in P./ μ l	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mittelwert	Std. Abw.
Regenzeit (n=94)	24	202	1040	3180	45180	2851	5636
Trockenzeit (n=50)	24	351	1542	3665	12880	2410	2746

3.7.2 Polyklonalität

3.7.2.1 Polyklonalität und Parasitämie im Jahresverlauf

Abbildung 13 setzt die monatliche mittlere Parasitendichte eines infizierten Kindes in Relation zu der Multiplizität der Infektion. Aus der Gruppe der 155 Proben mit erfolgreicher MSP-Genotypisierung wurden 33 mit negativer mikroskopischer Lesung ausgeschlossen. Daher gingen Parasitendichte und Allelzahl von 122 Kindern in die Abbildung ein. Die Plasmodieninfektionen der drei Monate alten Kinder differierten bezüglich ihrer Polyklonalität im Verlauf der Monate. Auffällig ist, dass Parasitendichte und Allelzahl parallel verlaufen, wobei der Monat Mai mit ausgesprochen hohen Parasitämien aus der Reihe fällt. Eine lineare Korrelation zwischen natürlichem Logarithmus der Parasitendichte und der Allelzahl wurde bereits in Kapitel 3.6.2.2 beschrieben. Der Monat Januar wurde bei unzureichender Fallzahl infolge mangelhafter DNA-Extraktion nicht in die Abbildung integriert.

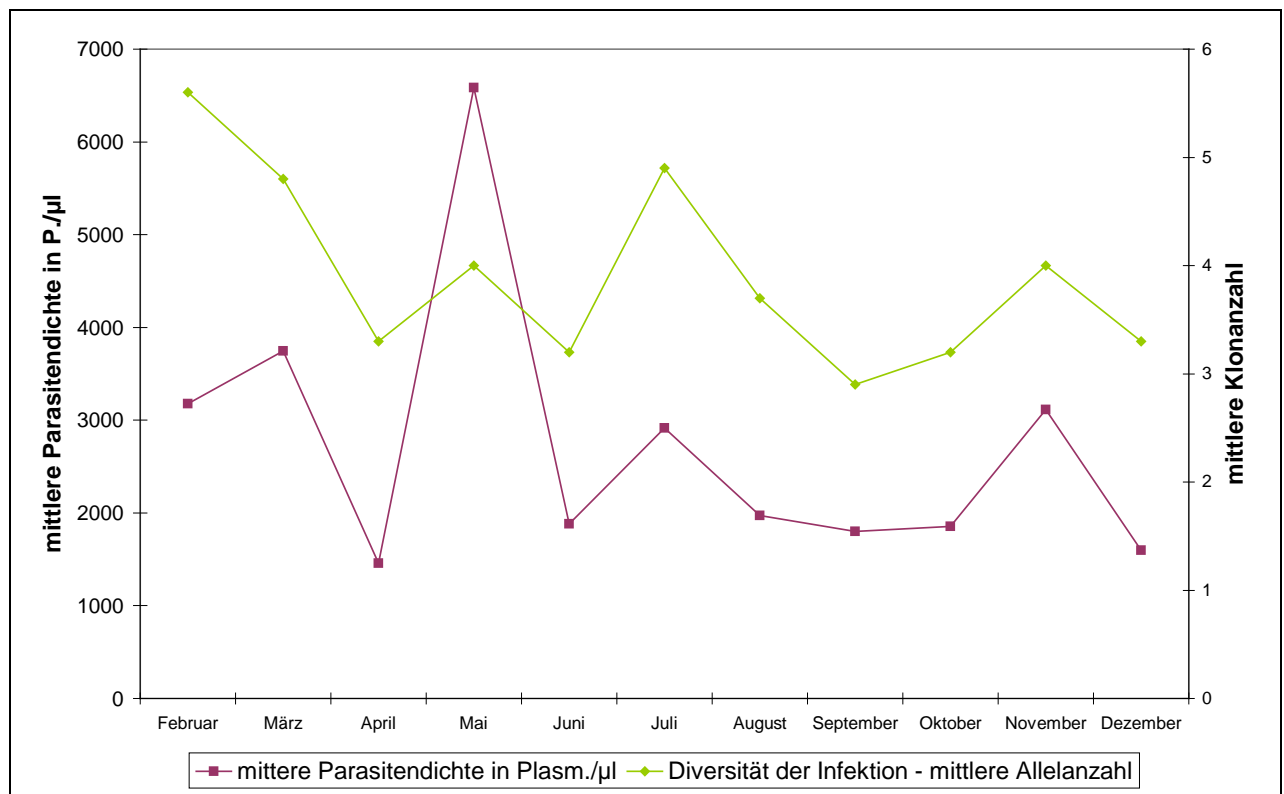


Abbildung 13: Monatliche Parasitämien und Multiplizität der Plasmodien-Infektionen, n = 122.

	Feb	März	April	Mai	Juni	Juli	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez
Mittlere Parasitendichte in P./µl	3177	3745	1457	6583	1881	2914	1974	1799	1855	3115	1597

Mittlere Klonanzahl	5.6	4.8	3.3	4	3.2	4.9	3.7	2.9	3.2	4	3.3
---------------------	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	---	-----

3.7.2.2 Polyklonalität saisonal

Die mittlere Klonanzahl betrug in der Regenzeit (Mai bis Oktober) 3,7 (+/- 2), in der Trockenzeit (November bis April) 4,2 (+/-2,9), und blieb somit ohne signifikanten Unterschied.

3.7.2.3 Diversität der Infektion

Die MSP-1- und-2-Familie spiegelten in der Trockenzeit eine deutlich höhere parasitäre Diversität der Infektion wider als in der Regenzeit: Es ergab sich in der MSP-1-Familie eine parasitäre Diversität von 22% (61/278) in der Regenzeit und von 44,1% (45/102) in der Trockenzeit (signifikanter Unterschied, $p < 0,001$). Die parasitäre Diversität in der MSP-2-Familie betrug in der Regenzeit 17,7% (67/379) und in der Trockenzeit 29,8% (48/161) (signifikanter Unterschied, $p < 0,001$). Die Abbildungen 14 bis 18 bilden die Präsenz der verschiedenen MSP-1- und -2-Polymorphismen in Abhängigkeit von Regen- und Trockenzeit ab.

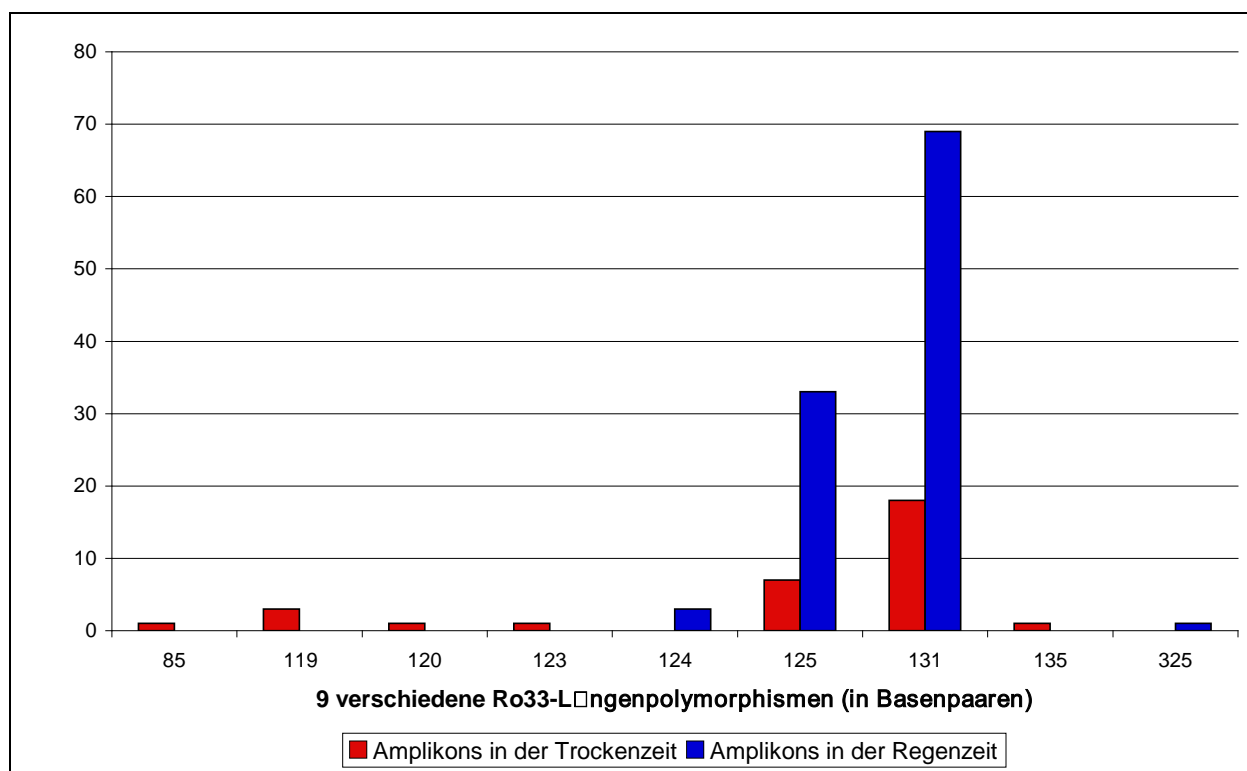


Abbildung 14: Längenpolymorphismen der Ro33-Familie (MSP1) in Trocken- und Regenzeit.

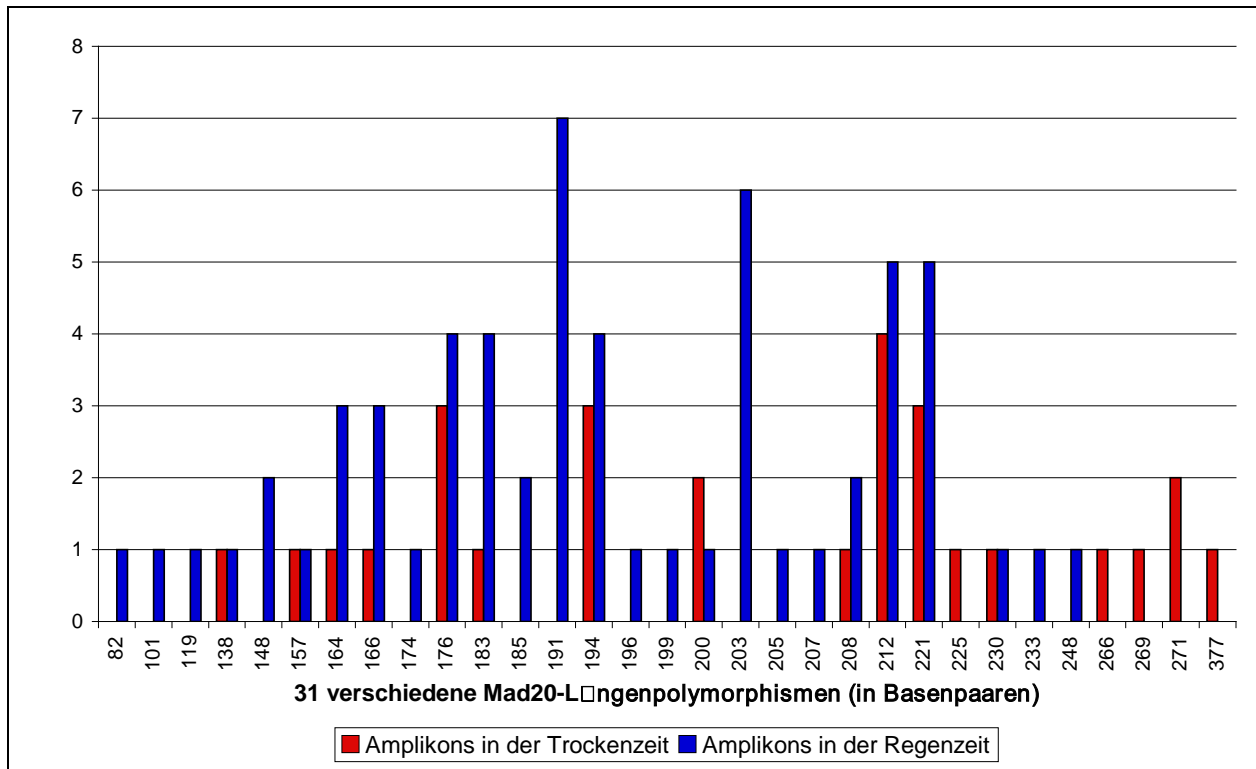


Abbildung 15: Längenpolymorphismen der Mad20-Familie (MSP1) in Trocken- und Regenzeit.

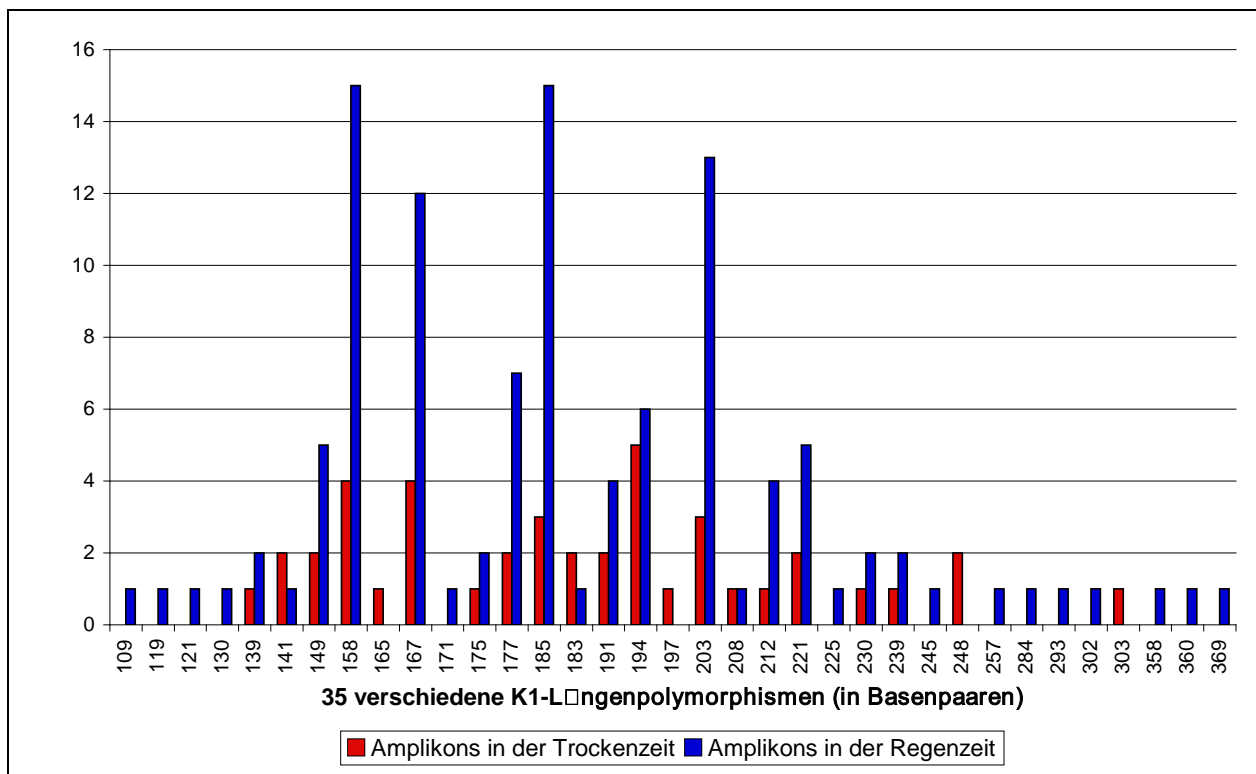


Abbildung 16: Längenpolymorphismen der K1-Familie (MSP1) in Trocken- und Regenzeit.

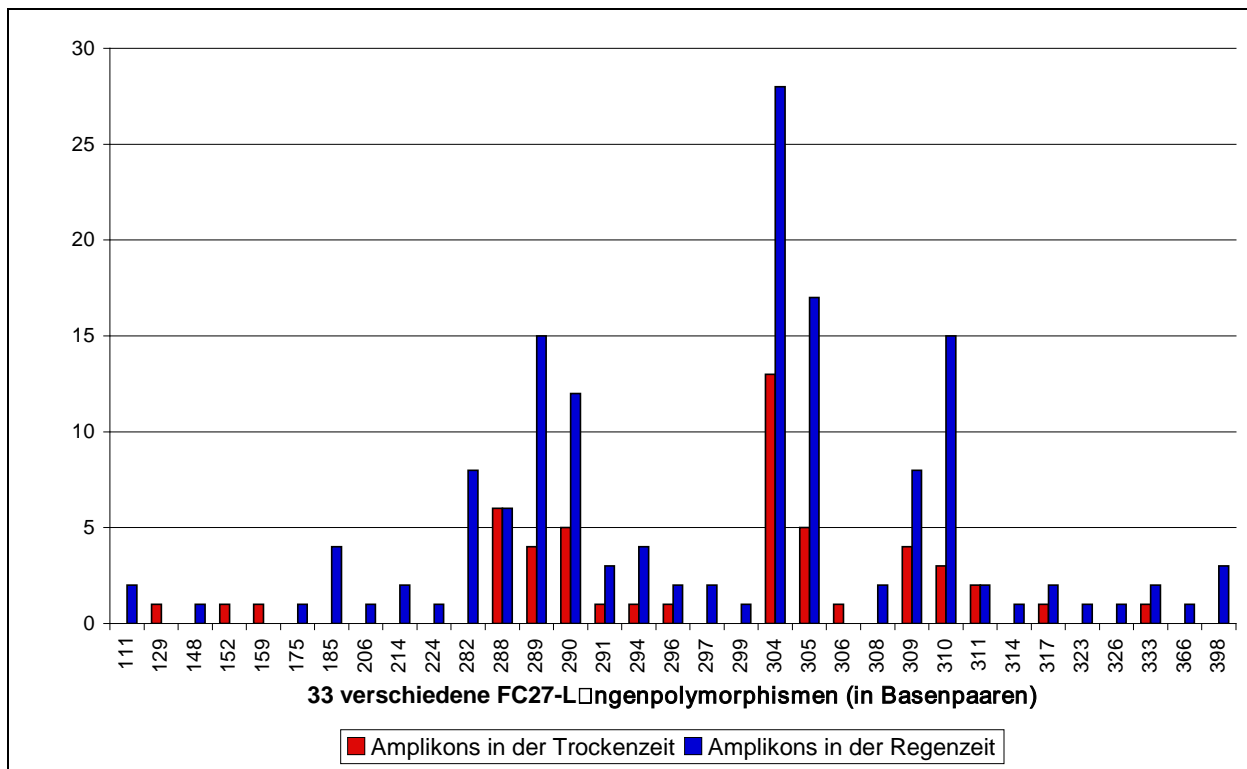


Abbildung 17: Längenpolymorphismen der FC27-Familie (MSP2) in Trocken- und Regenzeit.

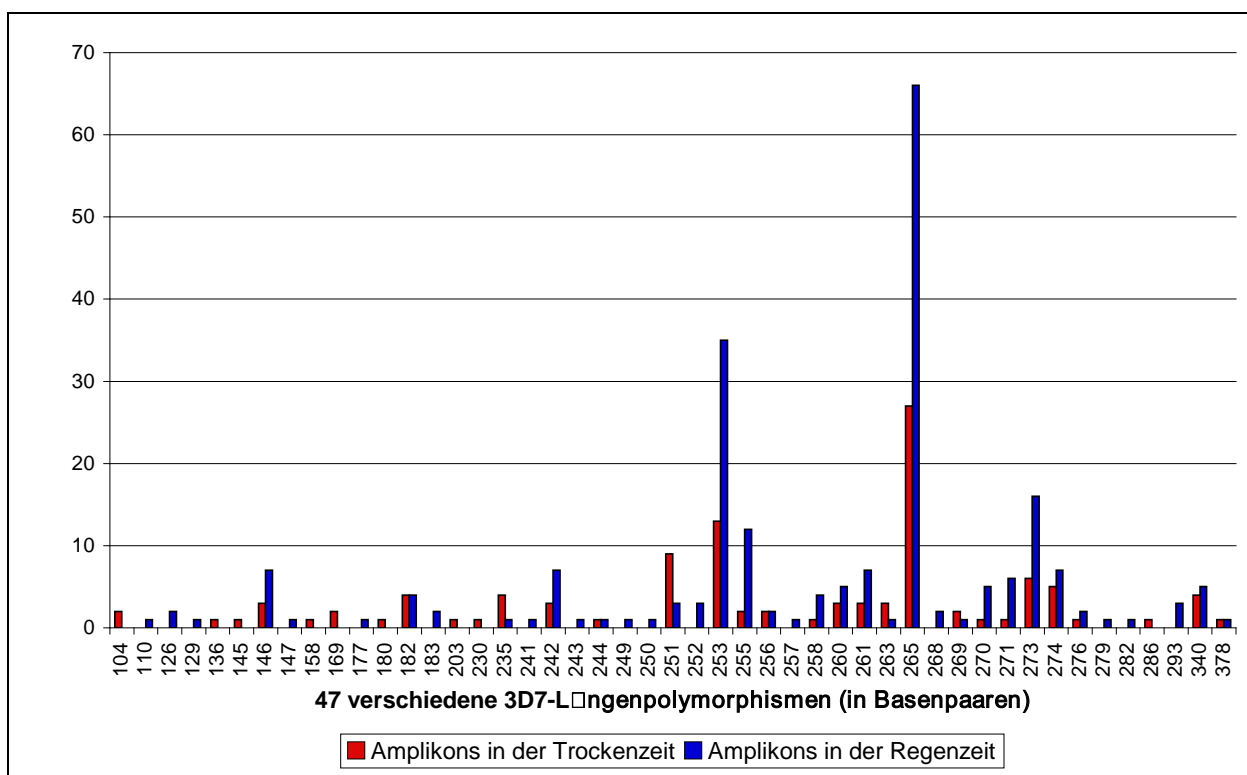


Abbildung 18: Längenpolymorphismen der 3D7-Familie (MSP2) in Trocken- und Regenzeit.

3.8 Klinische Parameter der Studienkinder

3.8.1 Symptomatik der Infektion

3.8.1.1 Klinisches Bild des Plasmodien-infizierten Kindes und Polyklonalität

Von 956 Kindern lagen klinische Daten sowie ein Ergebnis der Plasmodien-spezifischen PCR vor. Unter ihnen boten 42 Kinder eine symptomatische Malaria. Weitere 97 Kindern hatten eine asymptomatische Plasmodieninfektion. In beiden Gruppen lag die mittlere Klonanzahl bei 3,9 (jeweils +/- 2,3 Standardabweichung). In symptomatischen und asymptomatischen Plasmodien-infizierten Kindern zeigte sich somit kein Unterschied in der Komplexität der Infektion.

3.8.1.2 Klinisches Bild und Parasitendichte

Symptomatische Kinder mit Plasmodieninfektion wiesen im Mittel eine höhere Parasitendichte auf (im Mittel 4697 Parasiten/ μ l) als klinisch inapparente Kinder (im Mittel 1981 Parasiten/ μ l) (vgl. Abbildung 19) (nicht signifikant).

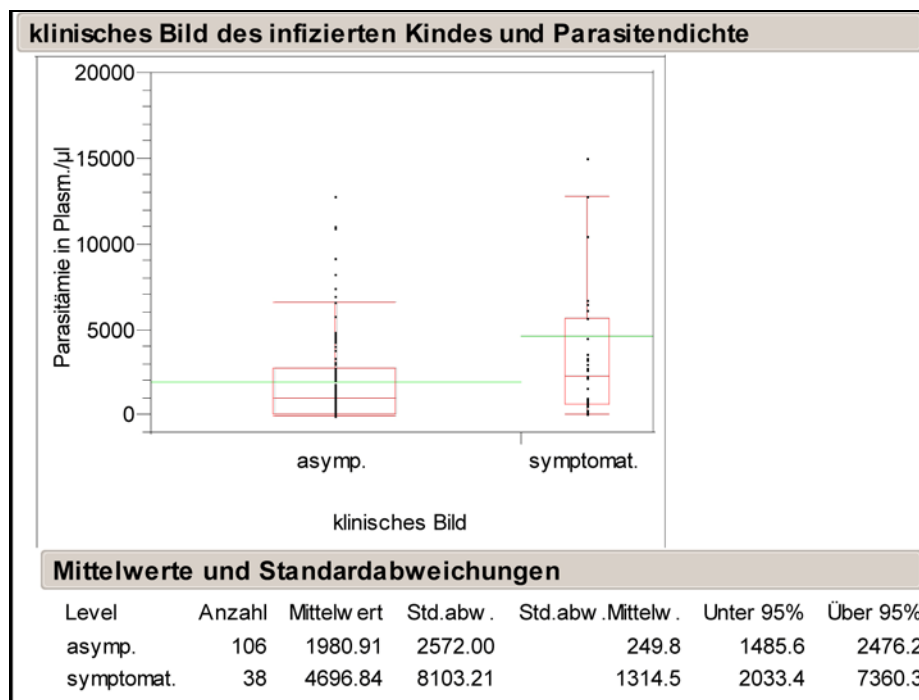


Abbildung 19: Klinisches Korrelat der Kinder mit nachgewiesener Plasmodieninfektion in Relation zur mittleren Parasitendichte (n = 144).

3.8.2 Hämoglobinwert-Veränderungen

3.8.2.1 Hämoglobin-Mittelwerte im Verlauf eines Jahres

Bei 1060 der 1070 Studienkinder lagen Daten inklusive der Hämoglobinwerte vor. Innerhalb des Jahres 2003 wurden kontinuierlich drei Monate alte Kinder in die Studie aufgenommen. In den Monaten Mai bis August innerhalb der Regenzeit war die Prävalenz der Plasmodieninfektion besonders hoch; im September und Oktober dann konnte ein deutlicher Abfall der mittleren Hämoglobinwerte beobachtet werden (vgl. Abbildung 20). In den Monaten November bis Februar stiegen die Hämoglobinwerte wieder an und erreichten im Februar ihren Maximalwert. Die Infektionsprävalenz lag im September bis Dezember im mittleren Bereich. Von März bis Mai war eine erneute Reduktion der mittleren Hämoglobinwerte zu verzeichnen. Im Januar bis April war die Infektionsprävalenz niedriger als 10%. Von Mai bis Juni dann kam es zu einem deutlichen Anstieg der Hämoglobinkurve.

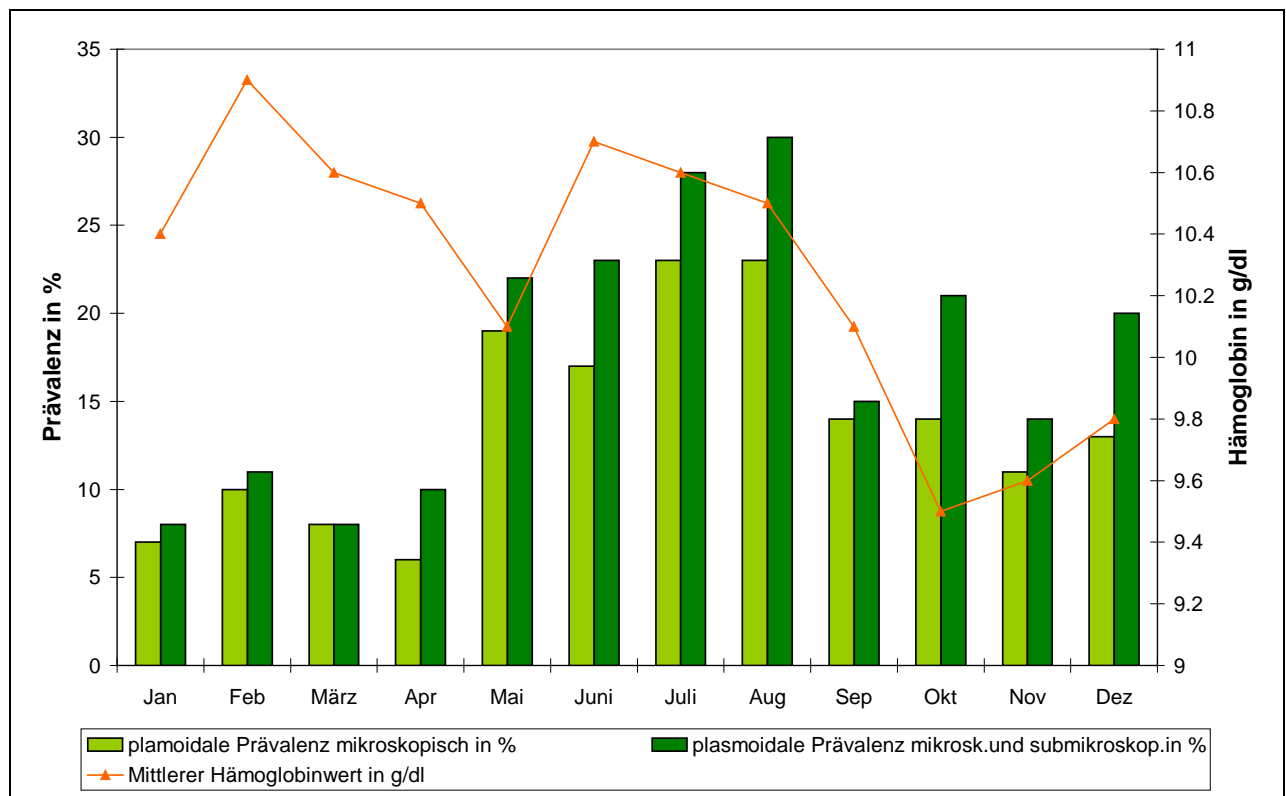


Abbildung 20: Hämoglobinwerte im Mittel im Verlauf der Monate in Relation zur Prävalenz der Infektion, n = 1060.

3.8.2.2 Anämie und Parasitendichte

Der Hämoglobin-Normbereich liegt bei drei Monate alten Kindern bei 9,5 bis 14 g/dl. Von 1060 Kindern mit Angabe eines Hämoglobinwertes hatten 252 Kinder eine Anämie mit einem Hämoglobinwert von unter 9,5 g/dl, darunter 63 mit positivem mikroskopischem Plasmodiennachweis.

Abbildung 21 zeigt, dass bei infizierten Kindern mit Anämie die mittlere Parasitendichte höher war als bei Infektionen, die nicht mit einem Abfall des Hämoglobinwerts einhergingen (im Mittel 3650 Parasiten/ μ l versus 1942 Parasiten/ μ l, nicht signifikant, $p = 0,051$). Der geometrische Mittelwert der Parasitendichte der infizierten Kinder betrug 1445,4 Parasiten/ μ l bei einem Hämoglobinwert $< 9,5$ g/dl ($n = 63$) und lag bei einem Hämoglobinwert von $\geq 9,5$ g/dl bei 580,1 Parasiten/ μ l ($n = 79$).

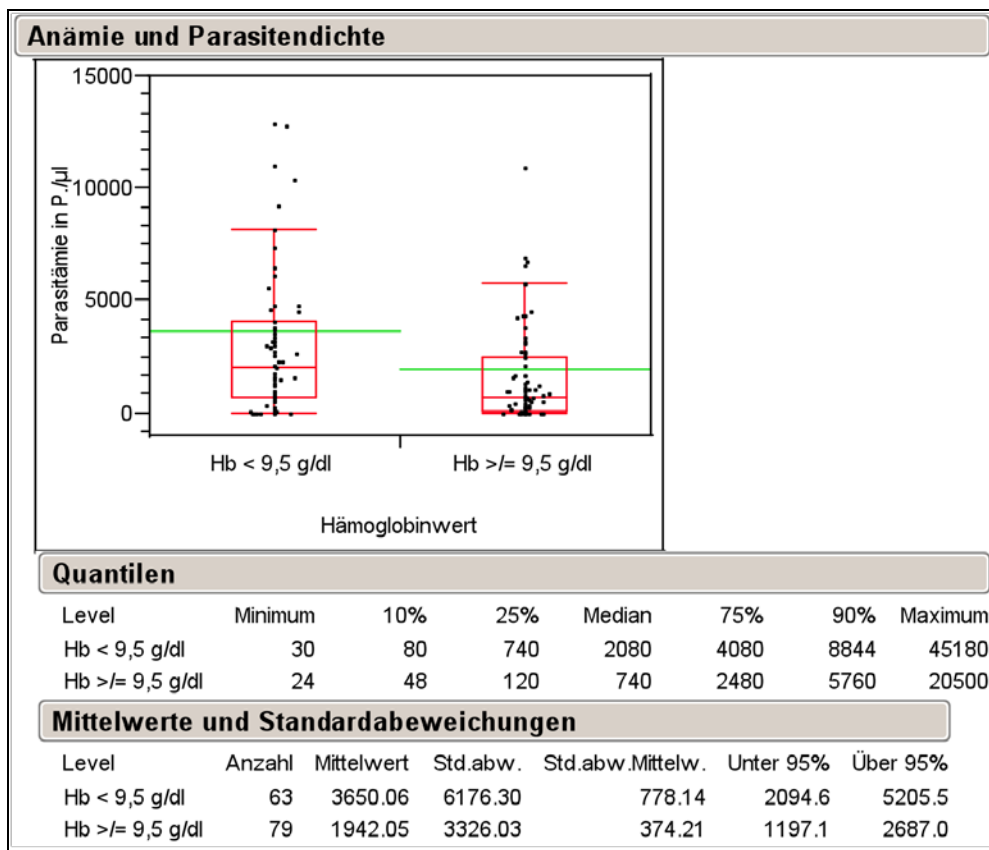


Abbildung 21: Parasitendichte 142 infizierter Kinder in Relation zu normwertigen bzw. erniedrigten Hämoglobinwerten.

Die Hämoglobinwerte der Kinder mit positiver PCR-Plasmodiendiagnostik waren im Mittel signifikant niedriger (9,6 g/dl) als die Hämoglobinwerte der nicht-infizierten Kinder (im Mittel 10,5

g/dl, $p < 0,0001$) (vgl. Abbildung 22). Nach mikroskopischer Diagnostik lag der Hämoglobinwert im Mittel ebenfalls bei 9,6 g/dl versus 10,5 g/dl ($p < 0,0001$) bei positivem bzw. negativem Dicken Tropfen. Der mittlere Hämoglobinwert submikroskopischer Infektionen lag bei 10,1 g/dl (vgl. Abbildung 23).

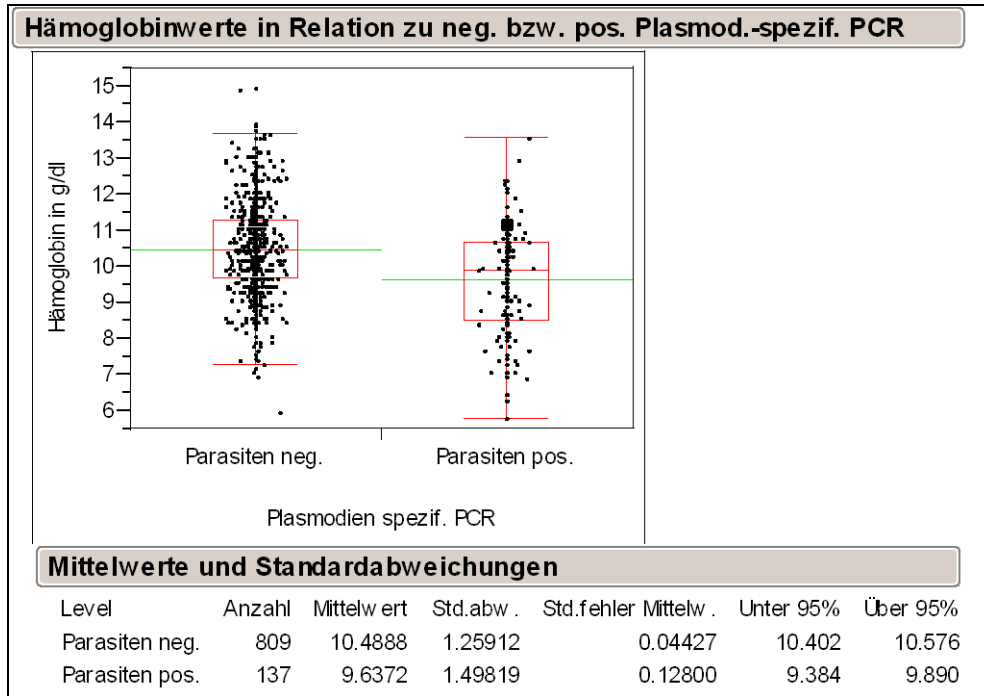


Abbildung 22: Hämoglobinwerte und positive bzw. negative Ergebnisse der Plasmodien - spezifischen PCR, n = 946 (958 Proben mit PCR-Ergebnis, jedoch 12 Proben ohne Hb-Angabe).

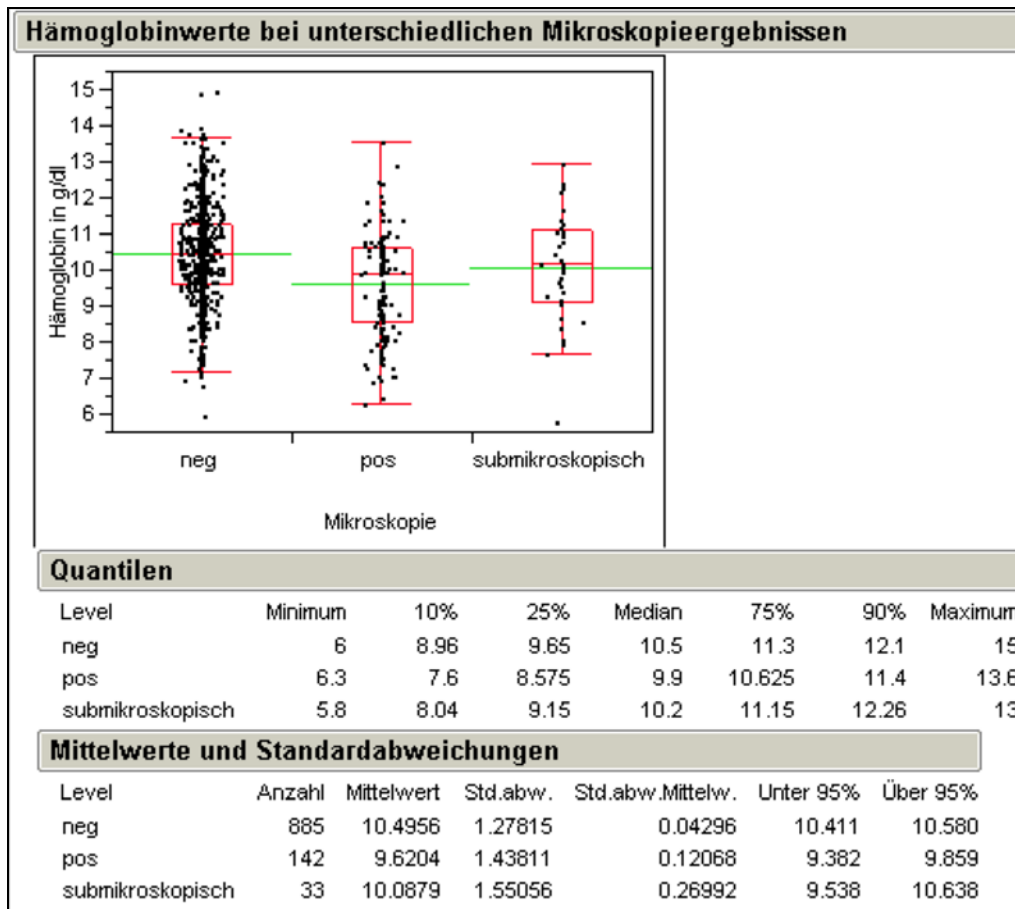


Abbildung 23: Hämoglobinwerte und positive und negative Mikroskopieergebnisse bzw. submikroskopische Infektionen.

3.8.2.3 Hämoglobinwert als Diagnoseparameter

Abbildung 24 prüft, ob sich der Hämoglobinwert allein als diagnostischer Test eignet, um auf das Vorhandensein einer Plasmodieninfektion zu schließen. Wird beispielsweise der Hämoglobinwert 8,5 g/dl als Grenzwert gewählt, schreibt der Test allen Kindern mit einem Hämoglobinwert von $\leq 8,5$ g/dl eine Plasmodieninfektion zu, den Kindern mit einem höheren Hämoglobinwert nicht. In diesem Fall erreichte der Test jedoch eine Sensitivität von nur 24,6% bei einer Spezifität von 93,7%, einen positiven prädiktiven Wert von 37,6% und einen negativen prädiktiven Wert von 88,9%. Der höchste prädiktive Wert (50%) wird bei einem Hämoglobin-Grenzwert von 7,5g/dl erreicht (vgl. Abbildung 24).

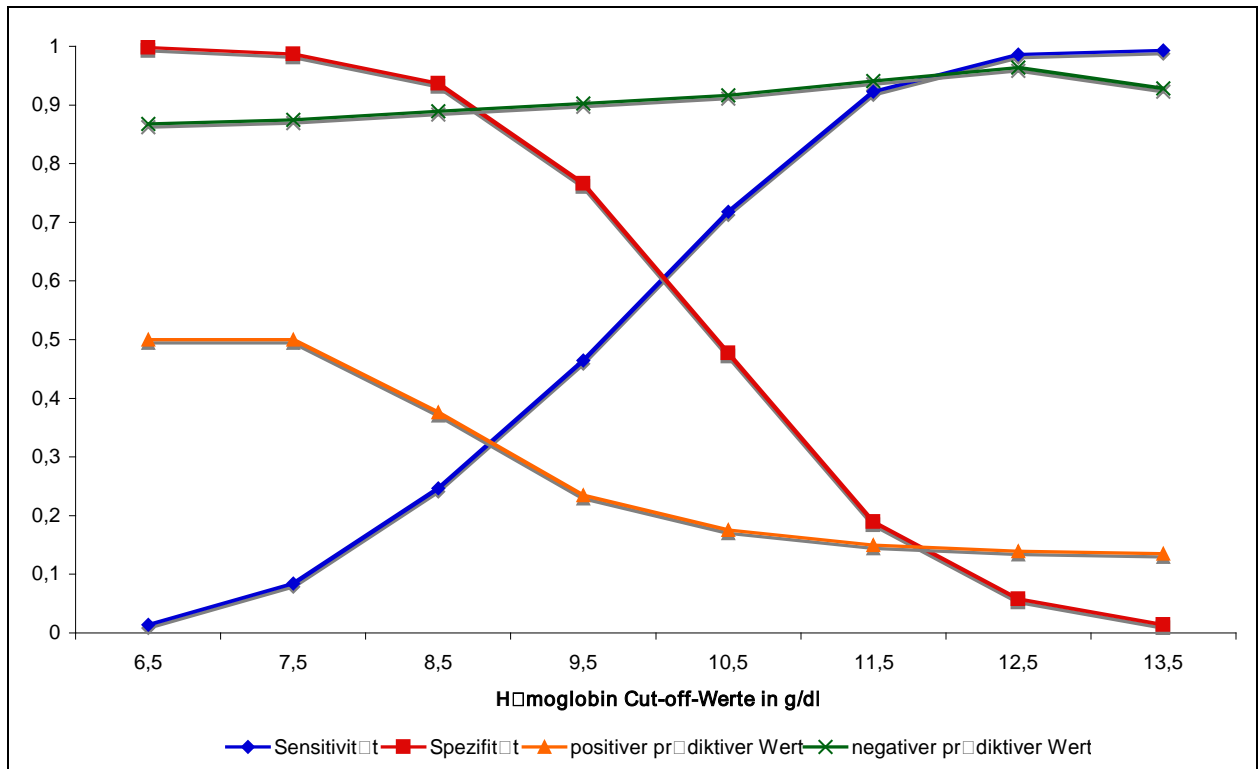


Abbildung 24: Hämoglobin-Grenzwerte als Diagnoseparameter für das Vorhandensein einer Plasmodieninfektion (n = 1060, darunter 142 positive Dicke Tropfen).

3.8.2.4 Hämoglobinwert und Klonanzahl

Die mittlere Klonanzahl der infizierten Kinder lag bei 3,9. Die Tabellen 7 und 8 zeigen, dass die Multiplizität der *P.-falciparum*-Infektion nicht mit dem Hämoglobinwert assoziiert war. Bei Infektionen mit 9 oder mehr Klonen lagen alle Hb-Werte bei <9 g/dl (jedoch nur n=3).

Tabelle 7: Multiplizität der *P.-falciparum*-Infektion stratifiziert nach Hämoglobinwerten.

Hb in g/dl	Anzahl n	mittlere Allelanzahl	Std.Abw.
< 7	4	3,5	1,73
≥7<8	14	3,6	1,79
≥8<9	31	3,8	3,81
≥9<10	29	4,2	4,24
≥10<11	50	3,8	2,13
≥11<12	19	3,6	2
≥12<13	5	4	1,87
≥13<14	2	4,5	0,71

Tabelle 8: Hämoglobinwerte stratifiziert nach Multiplizität der *P.-falciparum*-Infektion (Multiplizität = Anzahl der MSP-Allele pro Isolat).

Multiplizität	n	Hb Mittelwert (g/dl)	Std.Abw.
1	17	9,9	1,11
2	35	9,6	1,46
3	33	9,4	1,6
4	15	9,7	1,79
5	16	9,8	1,48
6	18	10	1,51
7	13	9,7	1,24
8	4	10	0,74
9	1	8,5	
14	2	8,7	0,85

4 Diskussion

4.1 DNA-Isolierung aus Filter-Papieren

Eine hohe Sensitivität der Plasmodien-PCR nach Filter-Papier-DNA-Extraktion wurde bereits mehrfach beschrieben (Bereczky et al. 2005, Chaisomchit et al. 2003; Cox-Singh et al. 1997; Singh B et al. 1996). Zwar liegen Hinweise auf die Beeinträchtigung der Sensitivität bei einer Umgebungstemperatur von 30°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% - wie in den Tropen typisch - vor (Farnert et al. 1999a), die Vorteile der Filter-Papiere gegenüber der DNA-Extraktion aus Kapillarblut in Form von einfacher, kostengünstiger Handhabung, unkomplizierten Lager- und Transportbedingungen und reduziertem Kontakt mit potentiell infektiösem flüssigem Blut liegen jedoch auf der Hand. Zudem ist eine Verbesserung der Qualität der Filter-Papiere mit zunehmender Lagerungsdauer zu beobachten, was sich durch einen Rückgang inhibitorischer PCR-Faktoren erklären könnte (Chaorattanakawee et al. 2003). Andernorts wurden auch zuverlässige PCR-Ergebnisse aus gefrorenen Blutseren in der Plasmodiendiagnostik beschrieben (Bharti et al. 2007). Bei unseren Austestungen funktionierte die Macherey-Nagel-Methode zur DNA-Isolierung aus Kapillarblut nicht zuverlässig. Jeweils 50 bis 200µl Blut standen zur Verfügung; optimal ist der Einsatz von 100µl Blut. Probleme könnten unter tropischen Bedingungen im ländlichen Afrika auch im Rahmen der Kühlkette der Blutproben aufgetreten sein. Die Macherey-Nagel-Methode ist an strikte Kühlbedingungen gebunden: Die Blutproben müssen bei 2 bis 8°C gelagert werden bzw. bei späterer Verwendung tiefgefroren werden.

4.2 Malariadiagnostik

4.2.1 Mikroskopie und PCR im Vergleich

Die Prävalenz der Plasmodieninfektion betrug nach mikroskopischer Diagnostik 13,5% (n=1070), nach molekulargenetischer Diagnostik 14,5% (n=958). 33 positive PCR-Ergebnisse müssen als falsch-positiv oder submikroskopisch gewertet werden.

Der Mikroskopie wird traditionell eine hohe Sensitivität bescheinigt, die die Identifizierung von Plasmodien ab einer Parasitendichte von 20 Plasmodien/µl erlaubt (Hommel 2002). In Malaria-endemischen Gebieten und im Rahmen von epidemiologischen Studien, bei denen viele Präparate in kurzer Zeit untersucht werden müssen, kann dieses Niveau jedoch meist nicht gehalten werden (Singh B et al. 1999). In epidemiologischen Feldstudien sollten weitestgehend standardisierte Protokolle verwendet werden (Trape 1985), um einheitliche und vergleichbare

Mikroskopieergebnisse zu erzielen. Dennoch attestieren einige Autoren der Mikroskopie *in realiter* eine geringe Sensitivität und bemängeln große Variabilitäten der postulierten Parasitendichte nach unterschiedlichen Lesungen (Bejon et al. 2006; O'Meara et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der Mikroskopie von der Parasitendichte abhängt (McKenzie et al. 2003).

Falsch positive Mikroskopieergebnisse können vorliegen, wenn Sporen, Pollen und Hefe Parasiten ähneln und als solche beschrieben werden. Blutplättchen oder nukleäre Residuen in den Erythrozyten, wie die Howell-Jolly-Körperchen bei Anämie, können als Parasiten fehlgedeutet werden. Die Präparate dieser Studie wurden zwei- bis dreifach durch unabhängige Untersucher beurteilt, weshalb die Zahl der falsch positiven Mikroskopieergebnisse reduziert wurde (vgl. Kapitel 3.1.2). Die MSP-PCR bestätigte in 18 der 27 Fälle mit positivem Dicken Tropfen und negativer Plasmodien-spezifischer PCR die Infektion (vgl. Kapitel 3.6.2).

Die mikroskopische Diagnostik führt zu einer Minimalvorstellung der Infektionsrate: Die 33 positiven Ergebnisse der Plasmodien-spezifischen PCR ohne mikroskopisches Korrelat können als submikroskopisch eingestuft werden; in 32 der 33 Fälle zeigte auch eine positive MSP-Genotypisierung, dass plasmoidale DNA vorlag (vgl. Kapitel 3.6.2).

Die Plasmodien-spezifische PCR erreichte im Vergleich mit der Mikroskopie als Referenz eine Sensitivität von 80% bei einer Spezifität von 96% (vgl. Kapitel 3.5.2). Ab einer Parasitämie von 100 Parasiten/ μ l erhöhte sich die Sensitivität auf 91% bei einer Spezifität von 95%. Eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 94% wurde erreicht, wenn eine Parasitämie einer Dichte von 600 Parasiten/ μ l erkannt werden sollte. Die mittlere Parasitendichte bei mikroskopischem und molekulargenetischem Plasmodiennachweis lag bei 3329 Parasiten/ μ l. Mikroskopisch gesicherte Infektionen, die sich in der PCR nicht bestätigten, hatten eine mittlere Parasitendichte von nur 387 Parasiten/ μ l (vgl. Abbildung 5).

Die Speziesdifferenzierung (vgl. Kapitel 3.5.3) zeigte, dass hauptsächlich *P.-falciparum*-Monoinfektionen vorlagen (78,3% mikroskopisch, 72,3% molekulargenetisch). Eine Mischinfektion mit *P. ovale* / *P. falciparum* bzw. *P. malariae* / *P. falciparum* wurde nur in jeweils 1% der Dicken Tropfen bzw. der PCR-Proben gefunden. Die Plasmodien-spezifische PCR identifizierte keine *P.-ovale*-Infektion. Sequenz-Variationen im 18sRNA-Gen, das für die *P.-ovale*-Diagnostik genutzt wird, wurden bereits beschrieben (Kawamoto et al. 1996; Miyake et al. 1997). Lokale Sequenz-Variationen in den untersuchten Proben aus der Ashanti-Region könnten eine falsch

niedrige *P.-ovale*-Prävalenz bedingen. Einige Autoren definieren aktuell zwei unterschiedliche *P.-ovale*-Spezies (*P. ovale curtisi* und *P. ovale wallikeri*), die u.a. in Ghana gemeinsam vorkommen, ohne dass eine genetische Rekombination auftrete (Sutherland et al. 2010).

Der PCR-Diagnostik wird eine höhere Sensitivität als der Mikroskopie bescheinigt: In einer Meta-Analyse von 72 Studien, die einen Vergleich zwischen mikroskopischer und molekulargenetischer Plasmodiendiagnostik zogen, lag die Prävalenz der mikroskopisch detektierten Infektionen im Mittel bei 50,8% der Prävalenz, die die PCR beschrieb (Okell et al. 2009). Insbesondere scheint die PCR zuverlässiger als die Mikroskopie gemischte Infektionen unterschiedlicher Plasmodienspezies aufzudecken: Bereits in den Anfangsjahren der PCR-Malariadiagnostik konnten beispielsweise in einer 196-köpfigen Gruppe thailändischer Patienten 106 Plasmodieninfektionen, darunter eine Mischinfektion, mikroskopisch gesichert werden, mittels PCR dagegen 129 Fälle, darunter 24 gemischte Infektionen (Snounou et al. 1993). In einer Feldstudie in Laos war die PCR zwei bis drei mal so sensitiv wie die Mikroskopie; 27 durch die PCR diagnostizierte Mischinfektionen standen zwei mikroskopisch beschriebenen Mischinfektionen gegenüber (Toma et al. 2001). Eine Studie im Iran mit 120 Patienten einer Malariaklinik machte ebenfalls die hohe Sensitivität der PCR deutlich: in 107 Fällen ließ sich mikroskopisch, in 116 Fällen mittels PCR eine Plasmodieninfektion sichern; wiederum fiel der hohe Anteil von Mischinfektionen nach PCR-Diagnostik auf (34 PCR-diagnostizierte versus drei mikroskopisch detektierte Mischinfektionen) (Zakeri et al. 2002).

Die Interpretation der Sensitivität ist abhängig von der jeweiligen Bezugsgröße. Eine Aussage über die Qualität der Mikroskopie fällt schwer, wenn diese, wie in unserem Fall, als Referenz gesetzt wird. In einer Pariser Studie wurden PCR-Ergebnisse als Bezugsgröße gewählt. Die Sensitivität der Mikroskopie verglichen mit den PCR-Ergebnissen war hier nur 72,3% (Ciceron et al. 1999). In unseren Untersuchungen detektierte die PCR unter 958 Kindern 139 Infektionen, die Mikroskopie in der selben Gruppe nur 133 Infektionen. Da die Schnittmenge jedoch nicht ausreichend groß ist und die Mikroskopie als Goldstandard gewählt wurde, hatte die PCR nur eine Sensitivität von 80% (vgl. Kapitel 3.5.2).

In der erwähnten thailändischen und iranischen Studie wurden Patienten untersucht, bei denen bereits klinisch ein Verdacht auf Malaria bestand (Snounou et al. 1993; Zakeri et al. 2002), so dass sich ein selektiertes Patientenkollektiv mit relativen hohen Parasitämien ergab. Die Studienkinder aus der Ashanti-Region wurden im Rahmen einer longitudinalen Studie gesehen und waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund oder zufällig erkrankt, teils asymptomatisch, so

dass hier niedrigere Parasitämien gesehen wurden. Die Qualität der PCR bei niedrigen Parasitämien ist unterschiedlich: In einer Kohorte asymptomatischer Sudaner wurden zuverlässig submikroskopische Parasitämien mittels PCR detektiert (Roper et al. 1996). Auch der uns als Matritze fungierende *nested-PCR-Assay* sollte zuverlässig Parasitämien ab einer Dichte von sechs bis 31 Parasiten/ μ l detektieren (Singh B et al. 1999). Bei einem Vergleich der Methoden Mikroskopie und *Nested-PCR* aus Filter-Papieren (n=695) in Thailand lag die Sensitivität der PCR ab einer Parasitendichte von 500 Parasiten/ μ l bei 96%, die Spezifität bei 98%. Im Bereich niedriger Parasitämien von < 100 Parasiten/ μ l gelang der PCR-Nachweis mikroskopisch gesicherter Infektionen jedoch nur in 20% (Coleman et al. 2006). Offensichtlich steht bei niedrigen Parasitämien nach DNA-Extraktion aus Filter-Papieren nicht genügend DNA-*Template* für die PCR zur Verfügung.

Zusammenfassend lag die Sensitivität unserer Methode insgesamt bei 80%; ab einer Parasitendichte von 600 Parasiten/ μ l konnte jedoch eine hohe Sensitivität von 97% erzielt werden.

Neuere Entwicklungen in der Molekulargenetik ermöglichen ein rascheres Bearbeiten der DNA-*Templates*: die Multiplex-PCR integriert gleichzeitig ablaufende PCRs mit mehreren Primerpaaren in einer Reaktion. Die Speziesdifferenzierung und auch die Identifikation von Mischinfektionen bleibt weiterhin möglich (Kho et al. 2003; Padley et al. 2003). Die mikroskopische Lesung bietet den Vorteil der Quantifizierbarkeit der Plasmodieninfektion. Eine Optimierung der PCR konnte durch die Entwicklung einer quantitativen PCR, der *real-time-PCR*, erzielt werden (Rougemont M et al. 2004) (vgl. Kapitel 1.4); auch eine simultane Identifizierung der verschiedenen Spezies ist mit der *real-time-PCR* möglich (de Monbrison et al. 2003). Die *real-time-PCR* wird als akurate, sensitive und schnelle Methode beschrieben, die an die Sensitivität der Mikroskopie heranreicht oder diese gar übertrifft (Mangold et al. 2005; Mens et al. 2006; Swan et al. 2005).

4.2.2 Malaria – klinisch diagnostiziert?

Während in den Jahren 1982 bis 1989 noch 18 % der Todesfälle unter westafrikanischen Kindern der Malaria zugeschrieben wurden, stieg der Anteil der Malaria bedingten Todesfälle in den Jahren 1990 bis 1998 auf 23 % (Korenromp et al. 2003). Neben bekannten makroökonomischen Zusammenhängen zwischen Armut und Malaria (Sachs und Malaney 2002), lassen sich auch mikroökonomische Abhängigkeiten darstellen: Der sozioökonomische Status einer Familie wie auch die Lage ihres Hauses im Dorf bzw. in seiner ökologischen Nische beeinflussen das Malariaris-

ko für das Familienmitglied (Kreuels et al. 2008; Somi et al. 2007). Im Norden Ghanas unterliegen Kinder in urbanisierten Gegenden einem geringeren Risiko, eine Parasitämie zu entwickeln als Kinder in ländlichen Gebieten (Koram et al. 2003). Größere Entfernungen bis zur nächsten Krankenstation sind assoziiert mit der Entwicklung einer schweren aus einer milden Malaria (Al Taiar et al. 2008); all zu oft bringen finanzielle Nöte und/oder lange Wege bis zur nächsten Krankenstation einen verzögerten Therapiebeginn mit sich. Ein erschwerter Zugang zu Krankenstationen führt zu einer erhöhten Prävalenz von Fieber, Anämie, Malaria (Grenfell et al. 2008). Insbesondere im ländlichen Afrika sind gut ausgerüstete Krankenhäuser selten, oft steht nicht einmal ein Mikroskop zur Verfügung. Diese Situation aufgreifend, formulierte die WHO im Rahmen des *Integrated Management of Childhood Illness* (IMCI) Leitlinien u.a. zur Diagnostik und Behandlung von fiebernden Kindern (WHO 1997). Bei mangelnden diagnostischen Möglichkeiten wird v.a. Symptom-orientiert behandelt, was bedeutet, dass bei Fieber in Malariaendemiegebieten eine Malaria-Behandlung empfohlen wird. Landesspezifische Leitlinien für *health worker* basieren vielerorts auf diesem WHO-Papier. Im Rahmen einer Untersuchung, in der die Umsetzung der Leitlinien geprüft wurde, zeigte sich, dass in Krankenstationen im ländlichen Tansania 89% der bis zu fünf Jahre alten Kinder mit Fieber ein Malaria-Medikament erhalten hatten (n=117), was den Leitlinien trotz deutlicher Defizite des Teams in der Anamneseerhebung und Beratung entsprach. 61% der mit Malaria-Medikamenten behandelten Kinder wiesen eine Parasitämie von ≥ 2000 Parasiten/ μ l auf (Eriksen et al. 2007). Nach Untersuchungen von zwei bis neun Jahre alten Kindern im Niger war schon 1991 beschrieben worden, dass in Zeiten einer hohen Transmissionsrate hohes Fieber sehr wahrscheinlich einer Malaria zuzuschreiben ist und eine Malaria-Behandlung indiziert ist, wenn keine andere Ursache offensichtlich ist (Rougemont A et al. 1991). Effiziente Algorithmen sollen mit einer Sensitivität von bis zu 89% und einer Spezifität von bis zu 61% eine Malariadiagnostik nach klinischen Gesichtspunkten ermöglichen (Olaleye et al. 1998). Die IMCI-Strategie führte in tansanischen Dörfern kostensparend zu einer Reduktion der Mortalitätsrate um 13% im Vergleich zu benachbarten Dörfern außerhalb des IMCI-Programms (Armstrong Jr. et al. 2004). Auch die aktuelle WHO-Strategie *Home-based Management of Malaria* (HMM) fordert die rasche Behandlung eines mutmaßlich an Malaria Erkrankten (WHO 2004). Die Einschätzung der klinischen Situation ohne weiteres diagnostisches Mittel und die Verteilung der Malariamedikation erfolgt hier durch nicht medizinisch ausgebildete Mitglieder der Gemeinde. Die Evidenz für dieses Vorgehen bleibt nach einer Metaanalyse jedoch gering: Lediglich eine Studie verzeichnete eine Reduktion der Mortalität der unter fünf Jahre alten Kinder (Hopkins et al. 2007). Eine Malariamedikation bei

Fieberepisoden ohne Erregernachweis ist jedoch oftmals nicht gerechtfertigt (A-Elgayoum et al. 2010). In ländlichen Krankenstationen in Burkina Faso zeigte sich, dass bei Kindern mit Fieber auch in der Regenzeit eine sorgfältigere Suche nach anderen Ursachen notwendig ist: Die klinische Diagnose Malaria wies dort im Vergleich zur mikroskopisch gesicherten Malaria eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von lediglich 41% auf (Pfeiffer et al. 2008). In Sub-Sahara-Afrika birgt die häufig praktizierte Malariabehandlung ohne mikroskopischen Nachweis der Infektion Risiken: Zwischen 2002 und 2005 wurden 23342 Kinder im Krankenhaus von Kampala, Uganda, gegen Malaria behandelt. Dabei war die Diagnose Malaria ohne mikroskopischen Erregernachweis mit einer höheren Mortalität verbunden als eine gesicherte Malaria (Opoka et al. 2008). Daneben kann eine Diagnostik-ferne Malariabehandlung im Rahmen von Überbehandlung zu einer Zunahme von Resistenzen führen (Weber et al. 1997). Malariaschnelltests (vgl. Kapitel 1.4) können ergänzend im Rahmen der oben genannten HMM-Strategie zum Einsatz kommen (Elmardi et al. 2009). Die Verteilung von Malariaschnelltests an *health worker* reduziert eine Fehl- und Überbehandlung mit Malariamedikamenten (Kyabayinze et al. 2010, Masanja et al. 2010). Gezielte Schulungen der *health worker* sind für eine fehlerfreie und effiziente Handhabung der Malariaschnelltests nötig (Chandler et al. 2010, Ly et al. 2010).

4.3 Prävalenz, saisonales Muster und Diversität der Infektion

Im Alter von drei Monaten waren im Jahr 2003 17,3% der Kinder in den Studiendörfern in der Ashanti-Region, Ghana, mit Plasmodien, meist *P. falciparum*, infiziert. Die mittlere Parasitendichte lag bei 2698 Parasiten/ μ l. Im selben Zeitraum und im selben Studiengebiet wurde mittels molekulargenetischer Diagnostik unter Erwachsenen eine Prävalenz der Plasmodieninfektion von 49% gefunden (Marks et al. 2005). Die Prävalenz in der Ashanti-Region lag nach einer epidemiologischen Studie mit 3842 Untersuchten aus verschiedenen Dörfern nach mikroskopischer Diagnostik ebenfalls bei ca. 50%, Erwachsene waren jedoch nur zu 20% infiziert (Browne et al. 2000). Die Prävalenz der Plasmodieninfektion und die mittlere Parasitendichte nimmt im Verlauf des ersten Lebensjahres unter Kindern in Gebieten intensiver, ganzjähriger Transmission stetig zu (Smith et al. 1999b, Wagner et al. 1998). Mit drei Monaten wiesen Plasmodien-infizierte Kinder in Tansania eine mittlere Parasitendichte von 2575 Plasmodien/ μ l auf, also ähnlich der mittleren Parasitendichte in unserer Studiengruppe. Elf Monate alte Kinder hatten dort im Mittel eine Parasitämie von 4935 Plasmodien/ μ l (Kitua et al. 1996). Die Prävalenz der Infektion bleibt auch nach dem ersten Lebensjahr im Kindesalter hoch, beispielsweise in Kenia unter ein- bis vierjährigen 83%, unter fünf- bis neunjährigen 75%, unter 10- bis 14-jährigen 60%; die mittlere Parasi-

tendichte fällt jedoch nach dem 12. Lebensmonat ab (Bloland et al. 1999). In älteren Kindern persistieren die Parasitämien länger, jedoch auf niedrigerem Niveau, einhergehend mit dem Aufbau der Immunität (Smith et al. 1999b) (vgl. Kapitel 4.4).

In der Ashanti-Region zeigte sich im Rahmen einer Untersuchung mit 3842 Kindern (> 2 Jahre) und Erwachsenen, dass jede und jeder vierte Infizierte eine Plasmodieninfektion mit verschiedenen Spezies aufwies (Browne et al. 2000). PCR-unterstützte Studien beschrieben, dass Mischinfektionen mehrerer Spezies häufiger sind als statistisch zu erwarten (May et al. 1999 b; Mayxay et al. 2004 b; Snounou et al. 1993). Mischinfektionen sind mit einem stärkeren Hämoglobin-Abfall assoziiert als Infektionen mit einer einzigen Spezies (May et al. 2000; Mayxay et al. 2001). Andererseits kann die Erkrankung *P.-falciparum*-Infizierter in Gebieten hoher Transmission bei Koinfektionen mit einer weniger virulenten Spezies abgemildert sein (Alifrangis et al. 1999; McKenzie und Bossert 1999; Smith et al. 2001). In semi-immunen Kindern mit Mischinfektionen traten hohe Parasitämien einzelner Spezies nur zeitversetzt auf, während sich die Parasitämie eines Kindes insgesamt in einem bestimmten Bereich einpendelte: Parasitendichte-abhängig scheinen über die Speziesgrenzen hinweg Regulationsmechanismen im Rahmen der Immunantwort zu greifen (Bruce und Day 2003). Einige Stimmen postulieren eine antitoxische nicht-spezifische Kreuz-Immunität (Maitland et al. 1997). Hierzu passend zeigten sich Mischinfektionen mit *P. falciparum* und *P. malariae* negativ assoziiert mit Fieber (Black J et al. 1994). Kinder mit Mischinfektionen von *P. falciparum* und *P. malariae* und/oder *P. ovale* boten jedoch auch höhere IgG-Antikörpertiter gegen ein *P.-falciparum*-spezifisches Protein (*rho*try-*associates protein-1*) als Kinder mit einer Monoinfektion (Alifrangis et al. 1999). Der Anteil von Mischinfektionen verschiedener Spezies lag in unserer Studiengruppe bei 1%. Angesichts der niedrigen Prävalenz der Infektion von 17,3% und dem kleinen Anteil von Mischinfektionen ist es wahrscheinlich, dass bei einem großen Teil der Kinder eine der ersten Infektionen mit *P. falciparum* vorlag. Die niedrige Prävalenz von Mischinfektionen in unserem Kollektiv drei Monate alter Kinder bietet auch alternative Erklärungen: 1. Mischinfektionen älterer Kinder und Erwachsener generieren sich aus mehreren aufeinander folgenden Infektionen. Nach einem infektionsfreien Zeitraum im Rahmen des Nestschutzes treten erst ab dem vierten Lebensmonat manifeste Plasmodieninfektionen auf. Vorausgehende und überlappende Infektionen bestehen in unserer Studiengruppe also nicht. 2. Der Aufbau der Immunität setzt zu diesem Zeitpunkt erst ein. *P. falciparum* könnte es in diesem Intervall gelingen, andere Spezies zu unterdrücken. Ob und welche Spezies das Wachstum der jeweiligen anderen Spezies hemmt, wird kontrovers dis-

kutiert; die relative Replikationsrate, die Konkurrenz um Erythrozyten und Nährstoffe und die Abwehrlage des Wirts könnten hier eine Rolle spielen (Mayxay et al. 2004 b).

Den Plasmodienpopulationen der infizierten Kinder lagen unterschiedliche Parasitenklone zugrunde. Die Polyklonalität mit im Mittel 3,9 Klonen in einem infizierten Individuum als auch die parasitäre Diversität mit 19,7% (MSP-1) bzw. 15,1% (MSP-2) beziffern deutlich höhere Werte als in entsprechenden Altergruppen vorherbeschrieben (Smith et al. 1999 a). Dies könnte teilweise durch die sensitive Methode der Genotypisierung erklärt werden: Die hier eingesetzte Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) erlaubt eine deutlichere Unterscheidung der Allele als herkömmliche Agarose-Gel-Elektrophoresen (Viriyakosol et al. 1995). Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide erzielen zudem sensitivere Ergebnisse als traditionell verwendete Ethidiumbromid-markierte DNA-Fragmente. Es wird davon ausgegangen, dass die nachgewiesene Allelanzahl die minimale Anzahl von Stämmen in einem Isolat anzeigt (Mayor et al. 2003). Zudem können zwar in longitudinalen Untersuchungen valide Aussagen zur altersabhängigen Komplexität der Infektion gemacht werden, die genaue Anzahl der Allele pro Isolat könnte jedoch in unterschiedlichen Laboren deutlich variieren. Vergleiche mit anderen Studien sind daher in ihrer Aussagekraft limitiert (Farnert et al. 2001).

In der Regenzeit lag die Prävalenz der Infektion bei 23,2%, in der Trockenzeit bei 8,5%. Die Parasitämien der infizierten Kinder variierten nicht signifikant im Verlauf der Jahreszeiten. Bezüglich der Polyklonalität zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Regen- und Trockenzeit. Die parasitäre Diversität erwies sich jedoch in der Regenzeit (MSP-1: 22%, MSP-2: 17,7%) signifikant niedriger als in der Trockenzeit (MSP-1: 44,1%, MSP-2: 30%). In der Trockenzeit setzten sich die Infektionen aus einem größeren prozentualen Anteil der unterschiedlichen Polymorphismen der MSP-1- bzw. -2-Allele zusammen als in der Regenzeit, auch wenn die Anzahl der Klone, die einer Infektion zugrunde lag, im saisonalen Verlauf stabil blieb.

Die Komplexität der Plasmodieninfektion ist altersabhängig; meist wird erst im Verlauf der ersten Lebensmonate und -jahre eine Zunahme der Polyklonalität beobachtet (Branch et al. 2001; Konate et al. 1999). Die Multiplexität der Infektion scheint dabei in holoendemischen Gebieten im ersten bis circa dritten Lebensjahr positiv mit der Parasitendichte zu korrelieren: Klonalität und Dichte nehmen stetig zu. Der Peak der Komplexität wird mit drei bis neun Jahren erreicht, bevor die Komplexität langsam, die Parasitendichte deutlich rascher abnehmen (Owusu-Agyei et al. 2002; Smith et al. 1999 b). Im Alter von drei Monaten zeigte sich bei den Studienkindern mit molekulargenetisch gesicherter Plasmodieninfektion ein signifikanter linearer Zusammenhang

zwischen dem Logarithmus der Parasitendichte und der Klonanzahl (vgl. Kapitel 3.6.2). Eine Korrelation zwischen Parasitendichte und Komplexität der Infektion liegt also nicht nur in longitudinalen Untersuchungen in den ersten Lebensjahren, sondern auch innerhalb eines gleichaltrigen Kollektivs im Alter von drei Monaten vor. Es wird postuliert, dass die Detektion von einer größeren Anzahl von Klonen bei einer zunehmenden Parasitendichte wahrscheinlicher wird (Mayor et al. 2003). Angesichts einer Parasitendichte-abhängigen PCR-Kinetik (Farnert et al. 2001) könnte die Komplexität der Infektion weniger epidemiologische Zusammenhänge denn methodische Abhängigkeiten widerspiegeln. Eine höhere Klonanzahl könnte jedoch auch Ausdruck einer insuffizienten Immunität bzw. des Aufbaus von Immunität sein (vgl. Kapitel 4.6). In den ersten Lebensmonaten scheint eine Zytokin-vermittelte Antwort auf Plasmodien eine rasche Klärung der Infektion zu bedingen; für Kleinkinder dann ist eine Parasitämie mit einer hohen Komplexität der Infektion typisch, die die Entwicklung von Kreuzimmunität fördern könnte (Smith et al. 1999 b). Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass bereits im Alter von drei Monaten hoch komplexe Infektionen vorliegen.

4.4 Erworbene Immunität und Symptomatik

Kinder in Sub-Sahara-Afrika sind in ihren ersten Lebenswochen vor der schweren Malaria geschützt; plasmoidale Infektionen sind von geringer Dichte und kurzer Dauer (Kitua et al. 1996; Snow et al. 1998). Der relative Schutz vor Malaria dauert zwischen drei und sechs Lebensmonate nach Geburt an. In hyperendemischen Regionen ist klinische Malaria bereits ab dem 3. Lebensmonat vermehrt zu beobachten. In Gebieten mit einer moderaten Transmission steigt die Erkrankungsrate ab dem 6. Lebensmonat (McGuinness et al. 1998; Snow et al. 1998). Dies ist teilweise auf eine geringere Exposition in Regionen mit moderater Transmission zurückzuführen. Andererseits gilt, dass Kinder in Gebieten mit geringerer Transmissionsrate ein höheres Risiko haben an schwerer Malaria zu erkranken als Kinder in hyperendemischen Regionen; letztere scheinen in einer frühen Phase klinische Immunität aufbauen zu können, in der noch andere protektive Mechanismen wirken (Snow et al. 1997; Snow et al. 1998). In der Schwangerschaft sollen in Malariaendemiegebieten maternale Antikörper einen gewissen Schutz für das ungeborene Kind bedingen (Fried et al. 1998). Es wurde postuliert, dass Neugeborene in ihren ersten Lebenswochen von maternalen Antikörpern profitieren könnten (McGregor 1964). Malaria in der Schwangerschaft wirkt sich jedoch negativ auf das Überleben und die Malaria-Morbidität in der Kindheit aus (Bardaji et al. 2011). Untersuchungen zeigen, dass erhöhte Malaria-spezifische IgG-Antikörper (Anti-Schizont-Antigen-Antikörper) bei Geburt nicht assoziiert mit Schutz vor

Malaria sind, sondern vielmehr mit einem erhöhten Risiko einer Infektion einhergehen, vermutlich bei erhöhter Exposition von Mutter und Kind (Riley et al. 2000; Wagner et al. 1998). MSP-1-Antikörper nehmen in diesem Kontext eine gesonderte Rolle ein. Spezifische Antikörper, gerichtet gegen das C-terminale 19kDa-Fragment von MSP-1 (MSP-1(19)), sind bedeutsam für den Aufbau von Immunität (O'Donnell et al. 2001). Bei einer mütterlichen Plasmodieninfektion kann perinatal eine T-Zell-Sensitivierung des Neugeborenen mit einer Zytokinantwort beobachtet werden. Diese geht einher mit einem Anstieg der kindlichen MSP-1-Ligand-Antikörpertiter bis etwa zum 24. Lebensmonat (Dent et al. 2006). Auch im Nabelschnurblut Neugeborener, die pränatal eine Plasmodieninfektion durchgemacht haben, lassen sich anti-MSP-1-IgM-Antikörper nachweisen (King et al. 2002); Immunglobuline vom Isotyp M (IgM) können die Plazentaschranke nicht überqueren und müssen deshalb fetalen Ursprungs sein. Erhöhte MSP-1(19kD)-Antikörper sind sowohl in Neugeborenen als auch in Kindern assoziiert mit klinischer Immunität gegen Malaria und mit einem Schutz vor hohen Parasitämien (Stanisic et al. 2009); MSP-1(19kD)-IgG-Antikörper-negative Kinder scheinen einem zehnfach erhöhtem Risiko zu unterliegen, eine plasmoidale Parasitämie zu entwickeln (al Yaman et al. 1996; Branch et al. 1998; Hogg et al. 1995). Insbesondere in ihrer Kombination sind IgG-Antikörper gegen die beiden häufigsten Allelfamilien K1 und Mad20 mit Schutz vor *P.falciparum*-Malaria assoziiert (Conway et al. 2000). Anti-MSP-2-IgG-Antikörper zeigen sich assoziiert mit Schutz vor klinischer Malaria, allerdings nur bei hohen Antikörper-Titern (Polley et al. 2006).

Seine Relevanz für den Aufbau der humoralen Immunität macht MSP interessant für die Impfstoffentwicklung (Fowkes et al. 2010, Singh S et al. 2006, Woehlbier et al. 2006). Der erste synthetische Impfstoff, SPf66, der von 1992 bis 1999 in zahlreichen Feldstudien in die klinische Testung gehen sollte, versprach einen Schutz des Menschen, insbesondere vor asexuellen Plasmodienstadien (Patarroyo et al. 1988). SPf66 beinhaltet insgesamt drei Peptide, darunter ein 83 kDa-Polypeptid, in seiner Aminosäure-Sequenz passend zu MSP-1. Für die beiden weiteren Peptide konnte keine Sequenz-Homologie im *P.falciparum*-Genom gefunden werden (Snounou und Renia 2007). In einer Metaanalyse konnte kein Schutz vor *P.falciparum* in Afrika nachgewiesen werden (Graves und Gelband 2006 b). Phase-I-Impfversuche mit einem 42kDa-MSP-1-Fragment (FMP1/AS02A-Impfstoff) weisen jedoch erste Erfolge auf (Ockenhouse et al. 2006; Stoute et al. 2007). Klinische Studien mit einem *multi-subunit*-Impfstoff basierend auf einer Dreierkombination aus MSP-1-, MSP-2- und RESA-(*ring infected erythrocyte surface antigen*-) Fragmenten (Combination B) scheinen zwar viel versprechend zu sein, sind jedoch in der Praxis noch nicht effektiv genug, u.a. da sie MSP-2-Allel-spezifisch sind und nur eine Reduktion der

Infektion mit dem MSP-2-Subtyp 3D7 bewirken (Genton et al. 2003; Lawrence et al. 2000). Den größten Erfolg verspricht derzeit der Impfstoffkandidat RTS,S, der sich aus Sequenzen des Circumsporozoiten Proteins und dem Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (HbsAg) zusammensetzt. RTS,S wurde in zahlreichen Phase II – Studien Sicherheit und ein signifikanter Schutz vor *P. falciparum*-Infektion und –Erkrankung attestiert (Abdulla et al. 2008, Alonso et al. 2004, Graves und Gelband 2006 a) und wird nun in einer multizentrischen Phase III - Studie in Afrika getestet.

Hohe Parasitämien und klinische Malaria sind selten bei Kindern bis etwa zum sechsten Lebensmonat (Wagner et al. 1998). Unklar bleibt, ob hierbei allein maternale Antikörper zum Beispiel gegen die 19kD-Einheit von MSP-1 eine Rolle spielen oder ob andere Faktoren im Vordergrund stehen (Riley et al. 2001). Eine geringere Exposition der Kleinkinder, ihr dickeres Unterhautfettgewebe oder ein geringer Gehalt der Muttermilch an p-Aminobenzoesäure, die elementar für das Wachstum der Plasmodien ist, könnten die geringe Prävalenz von Parasitämie und Erkrankung in den ersten Lebensmonaten bedingen. Das fetale Hämoglobin (HbF) erschwert zudem das Wachstum von *P. falciparum* in Erythrozyten (Pasvol et al. 1976). In den ersten Lebensmonaten entwickeln Kinder jedoch auch bei bestehender Parasitämie kaum Fieber und andere klinische Zeichen der Malaria. In Süd-Ghana wurde in dieser Altersgruppe eine Parasitämie von 100 bis 1000 Parasiten/ μ l selten klinisch relevant (McGuinness et al. 1998). Eine Abwehrreaktion durch eine fieberfördernde Cytokinantwort scheint gehemmt zu werden. Endotoxin-ähnliche parasitäre Moleküle werden primär durch IgM-Antikörper abgefangen. Maternale IgG-Antikörper dürften hierbei eine geringere Rolle spielen. Die anti-toxische Immunität in den ersten Lebensmonaten erklärt sich eventuell durch die Herunterregulierung einer febrilen Antwort durch anti-inflammatorische Mediatoren wie TGF-beta, das sich unter anderem vermehrt in Muttermilch nachweisen lässt (Rhee et al. 2001; Riley et al. 2001). Außerdem findet beim ersten Antigenkontakt ein T-Zell-Priming statt, das mit keiner oder einer geringen Symptomatik einher geht (Riley 1999). So haben Menschen vom Stamm der Fulani in West-Afrika mit einem angeborenen funktionellen Defekt der T-Zell-Regulator-Zellen ein geringeres Risiko für *P. falciparum*-Malaria (Torcia et al. 2008).

In der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres schließlich führen schon sehr geringe Parasitämien ab 100 Parasiten/ μ l zu Krankheitsmanifestationen, während nach dem ersten Lebensjahr erst eine Parasitendichte von 3500 Parasiten/ μ l Fieber generiert (McGuinness et al. 1998). Im Alter von vier bis 24 Monaten sind Kinder in Endemiegebieten dem höchsten Risiko ausgesetzt, an Malaria zu erkranken (Kitua et al. 1996; Smith et al. 1999 b, Abdullah et al. 2007). In einem keniani-

schen Krankenhaus erhielten im Jahr 2002 98% der Kinder unter fünf Jahren die klinische Aufnahmediagnose Malaria; unter diesen 1116 Kindern zeigte sich die höchste Prävalenz der Plasmodieninfektion mit 84,4% in der Altersgruppe zwischen sechs und elf Monaten. Während die Mortalität in diesem Krankenhauskollektiv insgesamt bei 7,5% lag, erhöhte sie sich bei den Kindern unter einem Jahr auf 46% bei einer signifikanten Assoziation mit Anämie - nicht jedoch *expressis verbis* mit Malaria-Anämie (Obonyo et al. 2007). Der postnatale Schutz vor zerebraler Malaria dagegen scheint deutlich länger anzudauern als der Schutz vor anderen Formen einer schweren Malariaerkrankung (Gupta et al. 1999 a), wobei auch spezifische pathophysiologische Mechanismen für das relativ späte Auftreten der Malaria verantwortlich sind.

Während die Prävalenz der Infektion mit Plasmodien in den Kindheitsjahren nach dem ersten Lebensjahr weiterhin hoch bleibt, fällt das Risiko der klinisch relevanten Malaria ab dem zweiten Lebensjahr stetig ab (Smith et al. 1999 b), wahrscheinlich weil sich eine anti-parasitäre Immunität entwickelt. Nach nur ein bis zwei effektiven Plasmodieninfektionen wird bereits eine erworbene Immunität vor schwerer, nicht-zerebraler Malaria beschrieben (Gupta et al. 1999 b). Der Aufbau klinischer Immunität könnte zum einen auf anti-parasitären Mechanismen, zum anderen auf einer Modulation der Zytokinantwort beruhen (Dodoo et al. 2002), beispielsweise auf der Herunterregulierung von Interferon-Gamma (Rhee et al. 2001). Eine ganzjährige Transmission in holoendemischen Gebieten wirkt sich dabei förderlich auf den Aufbau der Immunität aus. In Kenia wiesen Kinder im Grundschulalter im Hochland eine höhere Malaria-Morbidität auf als gleichaltrige Kinder in Regionen intensiver Plasmodien-Transmission (Clarke et al. 2004). Im Rahmen von Vektorkontrolle und der Verteilung von Bettnetzen wird aktuell eine verminderte Intensität der Transmission von Malaria in afrikanischen Ländern beobachtet, einhergehend mit einer Verschiebung der Altersgruppen erkrankter Kinder hin zu älteren Kindern (Okiro et al. 2009). Weiterhin sind jedoch sehr junge Kinder hinsichtlich Morbidität und Mortalität am schwersten betroffen (Carneiro et al. 2010, Roca-Feltrer et al. 2010).

Unter den drei Monate alten Kindern in unseren Studiendörfern in der Ashanti-Region, Ghana, ließ sich eine Prävalenz der Infektion von 17,3% verzeichnen. Bei 30,2% der Kinder mit positiver Plasmodien-spezifischer PCR wurde eine klinische Malaria diagnostiziert, und 26,4% der Kinder mit positivem Dicken Tropfen waren symptomatisch (vgl. Kapitel 3.8.1). Symptomatische infizierte Kinder wiesen im Mittel eine Parasitendichte von 4679 Parasiten/ μ l auf (Standardabweichung \pm 8103); die Parasitämie der asymptomatischen Plasmodien-infizierten Kinder lag im Mittel bei 1981 Parasiten/ μ l (Standardabweichung \pm 2572). Angesichts der großen Streu-

breite läßt sich erkennen, dass die Parasitendichte nicht auf die Klinik des Kindes schließen läßt. Offen bleibt, ob die Plasmodien-infizierten asymptomatischen Kinder zu einem anderen Zeitpunkt, möglicherweise einige Tage später, klinische Zeichen einer Malaria entwickelten oder bei schlechterer medizinischer Versorgung entwickelt hätten. Bei einem Anteil von immerhin fast einem Drittel symptomatischer Infektionen und gleichzeitig niedriger Prävalenz der Infektion, liegen folgende Rückschlüsse nahe: Im Alter von drei Monaten besteht aufgrund oben genannter protektiver Faktoren ein niedriges Risiko der Plasmodieninfektion. Bei einer Infektion ist jedoch auch die Entwicklung einer Malaria wahrscheinlich; insbesondere in einer longitudinalen Beobachtung der infizierten Kinder dürfte sich bei zunehmender Parasitendichte im Verlauf der Anteil der symptomatischen Kinder noch erhöhen. Angesichts der deutlich höheren Prävalenz der Infektion in älteren Altersgruppen scheint im Alter von drei Monaten ein Schutz vor Infektion zu bestehen, jedoch keine suffiziente angeborene oder erworbene Immunität bei manifester Parasitämie. Angeborene oder immunmodulatorische anti-parasitäre Effekte, die zu einer raschen Klärung der Infektion führen, sind bezeichnend für die ersten Lebensmonate (Franks et al. 2001). Zwischen dem dritten und neunten Lebensmonat setzt jedoch in Abhängigkeit von der jeweiligen Endemizität auch der Aufbau einer partiellen Immunität im Sinne einer anti-parasitären Abwehr ein. Sicherlich sind hier die Übergänge fließend. Die niedrige Prävalenz der Infektion unter unseren Studienkindern spricht dafür, dass noch unspezifische Abwehrmechanismen der ersten Lebenswochen greifen.

Es wird vermutet, dass asymptomatische Parasitämien die Immunitätsentwicklung fördern (Staalsoe und Hviid 1998). Bei gesunden Kindern ab dem Alter von fünf Monaten zeigte sich in Ghana häufig eine persistierende asymptomatische Parasitämie (Franks et al. 2001). Eine höhere Frequenz asymptomatischer Parasitämien von Kindern in Tansania ging mit einer niedrigeren Rate klinischer Malariaepisoden einher (Farnert et al. 1999 b). In longitudinalen Studien ließ sich jedoch zeigen, dass eine asymptomatische Parasitämie auch ein Risikofaktor für eine symptomatische Parasitämie sein kann. Unter ugandischen Kindern von sechs Monaten bis fünf Jahren kam es nur in 11% der beobachteten Parasitämien zu einer Klärung der Infektion im Verlauf ohne Therapie. Asymptomatische Parasitämien führten innerhalb des nächsten Monats in 50% der Fälle zur symptomatischen Malaria versus 9% der Fälle bei initial negativem Dicken Tropfen (Njama-Meya et al. 2004; Nsohya et al. 2004). Zeigte sich in Kindern in Sub-Sahara-Afrika bis zu 30 Tage nach unkomplizierter Malaria und entsprechender Behandlung eine asymptomatische Parasitämie, so kam es in 42% der Fälle erneut zu Fieber (Olliaro et al. 2008). Unter 200 Kindern aus Gabun ließen sich im Verlauf eines Jahres nur vier Fälle von asymptomatischer

Parasitämie konstatieren (Missinou et al. 2003). Diese Daten werfen die Frage auf, ob bereits asymptomatische Parasitämien eine Behandlungsindikation darstellen. Die Idee des *Intermittent Preventive Treatment* (IPT) kommt einem solchen Konzept der frühzeitigen Unterbindung relevanter Parasitämien nahe und könnte besonders in Gebieten mit hoher Transmissionsrate und einer entsprechend hohen Infektionsrate Sinn machen (Tagbor et al. 2010). In einer Auswertung von sechs doppel-blinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten IPT-Studien mit 7930 Kindern, darunter drei Studien in Ghana, zeigte sich, dass die intermittierende Behandlung mit Sulfadoxin-Pyrimethamin im ersten Lebensjahr einen protektive Wirksamkeit gegen Malaria von 30% bietet (Aponte et al. 2009).

4.5 Anämie

In den Entwicklungsländern dieser Erde haben 42% der Kinder unter fünf Jahren eine Anämie (United Nations 2000). Eisenmangel bei defizitärer Ernährung gilt in 50% der Fälle weltweit als Ursache einer Anämie (Stoltzfus 2003; Tolentino und Friedman 2007). Eine Eisenmangelanämie wird nicht selten durch eine Hakenwurminfektion, die zu chronischen intestinalen Blutverlusten führt, unterhalten. In Malariaendemiegebieten ist insbesondere bei kleinen Kindern eine Anämie Ausdruck einer Malaria. Vitamin-A- oder -B12-Mangel, eine ausgeprägte Trimenonreduktion oder eine HIV-Infektion fördern die Entwicklung einer Anämie (Brooker et al. 2007; Calis et al. 2008; Crompton 2000). Ein ernährungsbedingter Folsäure-Mangel wirkt sich insbesondere bei rekurrenten Plasmodieninfektionen mit Hämolyse und konsekutiv gesteigerter Erythropoese negativ auf den Hämoglobinwert aus (Menendez et al. 2000).

Eine schwere *P.-falciparum*-Malaria äußert sich insbesondere bei kleinen Kindern in Gebieten mit hoher Transmissionsrate in Form einer schweren Malariaanämie (Obonyo et al. 2007). Die Weltgesundheitsorganisation definierte im Jahr 2000 eine schwere Malariaanämie als einen Hämoglobinwert von unter 5 g/dl bei Nachweis von Plasmodien (WHO 2000). In einem kenianischen *District*-Krankenhaus wiesen 18% von 1067 Kindern unter fünf Jahren eine schwere Malariaanämie auf; die höchste Prävalenz einer schweren Anämie zeigte sich mit 26% bei Kindern im Alter von einem bis fünf Monaten. Über die Hälfte der Malaria-bedingten Todesfälle unter den unter fünf Jahre alten Kindern waren der schweren Malariaanämie zuzuschreiben (Obonyo et al. 2007). Die Mortalität bei schwerer Malariaanämie wird höher beziffert als die Mortalität bei schwerer Anämie anderer Genese (Brabin et al. 2001; Newton et al. 1997). Die Malariaanämie kann Folge einer akuten Krankheitsepisode oder rezidivierender asymptomatischer Infektionen sein (Koram et al. 2000; McElroy et al. 2000). In Zeiten des therapeutischen Einsatzes von

Chloroquin und einer weit verbreiteten Chloroquin-Resistenz wird nicht selten eine Besserung der klinischen Symptomatik nach Chloroquin-Behandlung beobachtet ohne vollständige Beseitigung der Infektion, was zu einer chronischen Anämie oder dem Wiederauftreten von klinischer Malaria führen kann (Trape 2001).

Die Ärmsten sind dem größten Risiko einer Malariaanämie ausgesetzt, insbesondere Kinder unter einem Jahr (Kahigwa et al. 2002). Einige Autoren erklären, dass Mangelernährung die Entwicklung einer Malariaanämie fördert (Verhoef et al. 2002 b) oder gar als wichtigster pathogenetischer Faktor der Anämie in West-Afrika zu werten ist: In Burkina Faso wurden 709 Kinder im Alter von sechs bis 31 Monaten über ein halbes Jahr während der Haupttransmissionszeit der Malaria beobachtet. Anämie war weder mit der Frequenz von Malariaepisoden noch mit deren Prävalenz assoziiert, aber signifikant mit Unterernährung (Muller et al. 2003). Untersuchungen von knapp 300 Kindern in der Ashanti-Region schrieben dagegen Anämien häufiger einer Plasmodieninfektion als Mangel- bzw. Unterernährung zu, allerdings im städtischen Bereich (Ronald et al. 2006). Gabe von Eisen wird teilweise als probates Mittel gesehen, um schwere Anämie zu verhindern ohne die Suszeptibilität für Malaria zu erhöhen (Menendez et al. 1997, Verhoef et al. 2002 a). Andere fürchten, dass nach Gabe von Eisen eine erhöhte Morbidität von klinischer Malaria auftritt (Oppenheimer 2001). In einer Kohorte kenianischer Kinder zwischen acht Monaten und acht Jahren wurde Eisendefizit mit Schutz vor milder Malaria assoziiert (Nyakeriga et al. 2004).

Die Pathophysiologie der Malariaanämie ist multifaktoriell: Intravaskuläre Hämolyse und extravaskuläre Phagozytose von Erythrozyten verlaufen parallel (Ekvall et al. 2001). Eine verminderte Flexibilität der Erythrozyten führt zum gesteigerten Abbau der Zellen in der Milz (Dondorp et al. 1999). Der Abbau von nicht-infizierten, eventuell immunologisch markierten Erythrozyten in der Milz scheint 90% des Erythrozytenverlustes auszumachen (Price et al. 2001). Die Zytokinregulierung ist nur in Ansätzen verstanden. TNF-alpha hat einen anti-parasitären Effekt, ist jedoch gleichzeitig mit Anämie assoziiert (Ekvall 2003). Interleukin-10 bedingt eine Herunterregulierung von TNF-alpha. Niedrige Interleukin-10-Spiegel bei kleinen Kindern könnten mit der hohen Prävalenz von Anämie im Kleinkindalter in Zusammenhang stehen (Nussenblatt et al. 2001).

Unter 1060 drei Monate alten Studienkindern in der Ashanti-Region, Ghana, hatten 252 Kinder laborchemisch eine Anämie (Hämoglobin < 9,5 g/dl), darunter 63 mit positivem mikroskopischem Plasmodiennachweis (vgl. Kapitel 3.8.2). Hämoglobinwerte unter 5 g/dl als diagnosti-

scher Parameter für eine schwere Malariaanämie wurden nicht aufgezeichnet. Die Prävalenz der Malariaanämie lag bei den Studienkindern bei 6%. Unklar bleibt, ob sich unter den 189 Kindern mit Anämie unklarer Genese einige finden, die im Vorfeld eine Parasitämie aufwiesen, die nicht erfasst wurde. Der mittlere Hämoglobinwert nicht-infizierter Kinder lag bei 10,5 g/dl. Plasmodien-infizierte Kinder wiesen im Mittel einen signifikant niedrigeren Hämoglobinwert von 9,6 g/dl auf (vgl. Kapitel 3.8.2). Die Anämie dieser Kinder ist also ursächlich der zugrunde liegenden Plasmodieninfektion zuzuschreiben.

Der Median der Parasitämien infizierter Kinder mit einem Hämoglobinwert $< 9,5$ g/dl lag bei 2080 Parasiten/ μ l. Der Median der Parasitämien infizierter, nicht anämischer Kinder betrug 740 Parasiten/ μ l (n.s., vgl. Kapitel 3.8.2). In West-Kenia wurde bei Kindern unter einem Jahr eine Korrelation zwischen höheren Parasitämien und niedrigeren Hämoglobin-Konzentrationen beschrieben (McElroy et al. 2000). Auch unsere Daten weisen auf ein mögliches erhöhtes Risiko für Anämie bei höherer Parasitendichte hin, bleiben jedoch ohne Signifikanz. Die mittleren Hämoglobinwerte der jeweils drei Monate alten Kinder schwankten im Verlauf der Monate (vgl. Kapitel 3.8.2). Peaks der Prävalenz der Infektion im Juli/August und Oktober/Dezember wurden zeitversetzt mit einem Abfall des mittleren Hämoglobinwerts beantwortet. Die höchste Prävalenz der Infektion lag mit 28% bzw. 30% im Juli und August in der Regenzeit. Am Ende der Regenzeit im Oktober fiel der mittlere Hämoglobinwert von >10 g/dl auf 9,5 g/dl ab. In Nord-Ghana war bei sechs bis 24 Monate alten Kindern gezeigt worden, dass die Prävalenz von Anämie am Ende der Regenzeit deutlich höher liegt als am Ende der Trockenzeit (22,1% versus 1,4%) (Koram et al. 2000). Unsere Daten zeigen in den ersten Lebenswochen und -monaten am Ende der Regenzeit einen Abfall der mittleren Hämoglobinwerte auf die untere Grenze des Normbereichs. Vorausgegangene symptomatische und asymptomatische Infektionen scheinen hierfür verantwortlich zu sein.

Effektive Maßnahmen der Malariakontrolle wie Bettnetze oder Anti-Malaria-Chemoprophylaxe führten in in einer großen Zahl von Studien zu einer Anhebung der mittleren Hämoglobinwerte von Kindern (Korenromp et al. 2004). Unter der Annahme, dass insbesondere kleine Kinder mit Plasmodieninfektion keine oder atypische Symptome zeigen, jedoch bereits einen Hämoglobinabfall verzeichnen (Afolabi et al. 2001), könnte über die Hämoglobinmessung als diagnostischer Parameter für das Vorhandensein einer Plasmodieninfektion nachgedacht werden. Aufgrund einer großen Streubreite der Hämoglobinwerte bei infizierten und nicht-infizierten Kindern in unserer Studiengruppe erlaubt der Hämoglobinwert allein jedoch keine valide Aussa-

ge über die Wahrscheinlichkeit einer Plasmodieninfektion: Ein Test, der einzig Hämoglobin-Grenzwerte als diagnostischen Parameter verwendet, erzielt in unserer Untersuchungsgruppe seinen maximalen positiven prädiktiven Wert von lediglich 50% bei einem Hämoglobin-Grenzwert von 7,5g/dl. Die Sensitivität liegt in diesem Fall bei 8,5%, die Spezifität bei 98,7%, der negative prädiktive Wert bei 87,5% (vgl. Kapitel 3.8.2). Bei höheren Hämoglobingrenzwerten (z.B. 11,5g/dl) wird eine bessere Sensitivität (92,3%) auf Kosten des positiven prädiktiven Werts (15%) und der Spezifität (19%) erreicht. Auch wenn Anämie sehr wohl als Parameter für Malariaprävalenz oder im Umkehrschluss für effektive Malariakontrolle zu werten ist (Korenromp et al. 2004, Mathanga et al. 2010), kann anhand eines Hämoglobinwerts nicht auf den Infektionsstatus eines einzelnen geschlossen werden, da sich kein Hämoglobin-Grenzwert mit einem ausreichend guten positiven prädiktiven Wert festlegen lässt (vgl. Kapitel 3.8.2).

4.6 Polyklonalität im Kontext des klinischen Bildes

Ein Teil der Komplexität von Plasmodieninfektionen kann mit Hilfe von MSP-Polymorphismen beschrieben werden. Umgekehrt können individuelle Parasitenstämme relativ gut anhand von MSP-Polymorphismen definiert werden. Nach einer medikamentösen Malariabehandlung kann so zwischen Reaktivierung und neuer Infektion unterschieden werden (Aubouy et al. 2003; Cattamanchi et al. 2003; Mugittu et al. 2006). In hyper-/holoendemischen Regionen in Gabun bzw. im Senegal wurden asymptomatische Kinder mit Parasitämie in longitudinalen Studien weiterverfolgt: Das Auftreten von Symptomen einer klassischen Malaria war assoziiert mit einem Anstieg der Parasitendichte und der Präsenz neuer parasitärer Genotypen (Contamin et al. 1996; Kun et al. 2002). Im mesoendemischen Uganda dagegen entwickelten Kinder aus einer persistierenden Infektion heraus in nur 50% der Fälle eine Symptomatik mit neuen Genotypen, verbunden mit einer höheren Dichte und Komplexität der Infektion (Nsobya et al. 2004). Kinder bleiben also auch bei einer initial asymptomatischen, persistierenden Plasmodieninfektion anfällig für eine Erkrankung. Eine Arbeit aus dem Sudan unterstützt diese These, untersuchte jedoch ein erwachsenes Kollektiv: Erregertypen, die schon Monate zuvor während der Trockenzeit in einem Wirt präsent waren, konnten viel später eine symptomatische Malaria induzieren (Babiker et al. 1998). Bekannt ist, dass *P. falciparum* regelmäßig die Expression variabler Oberflächenantigene wie z.B. PfEMP1 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*) verändert und so bestehenden Antikörper-abhängigen Immunreaktionen entgehen kann (Flick und Chen 2004; Pasternak und Dzikowski 2009). Es bleibt aber unklar, wie ein Parasitenstamm sich der Immun-

abwehr zeitversetzt entziehen und aus der immunologischen Balance heraus eine pathogene Dominanz entwickeln kann.

Die genannten Beobachtungen basieren auf einer angenommenen Stabilität der Erreger-Subpopulationen im Verlauf kurzer Zeiträume. Tägliche Genotypisierungen von asymptomatischen infizierten Kindern in Tansania wiesen jedoch auf eine schnelle Dynamik hin: Innerhalb von 24 Stunden wurde ein Wechsel der Subpopulationen sowie periodische Schwankungen der Komplexität verzeichnet (Farnert et al. 1997; Magesa et al. 2002). Einzelne Erregerfamilien könnten intermittierend im Gefäßbett sequestrieren und sich der Genotypisierung entziehen (Farnert et al. 1997).

Eine hohe Komplexität wird als Risikofaktor für klinische Malaria diskutiert. In Tansania wurde bei den unter Dreijährigen eine positive Assoziation zwischen Multiplizität, Parasitendichte und dem Risiko für eine klinische Malaria beschrieben (Felger et al. 1999; Henning et al. 2004). Die positive Korrelation zwischen Komplexität und Malaria wurde auch in anderen Altersgruppen gezeigt (Mayor et al. 2003; Ofosu-Okyere et al. 2001). Kenianische Kinder in den ersten drei Lebensjahren hatten mit einer niedrig-komplexen Plasmodieninfektion von nur einem Klon eine 12,5-fach höhere Chance, in den nächsten zwei Monaten keine fieberhafte Episode mit einer Parasitämie von mindestens 500 Parasiten/ μ l durchzumachen als Kinder mit einer komplexen Infektion von fünf oder mehr Klonen. Der Schutz bei Kindern mit niedrig-komplexer Infektionen erwies sich dabei nicht als Genotyp-spezifisch, so dass eine Genotypen-übergreifende Immunitätsentwicklung postuliert wurde (Branch et al. 2001).

Unter 314 asymptomatischen Kindern in Uganda im Alter von sechs Monaten bis fünf Jahren entwickelten diejenigen mit mikroskopisch gesicherter Parasitämie innerhalb des nächsten Jahres fünf Mal häufiger eine klinische Malaria als Parasiten-freie Kinder. Kinder mit positiver PCR, jedoch negativem dicken Tropfen, wiesen dabei keine erhöhte Morbidität auf. Das Infektionsmuster dieser Kinder zeigte sich niedrig-komplex mit im Mittel halb so vielen Klonen wie bei Kindern mit positivem Dicken Tropfen. Die Autoren stellen zur Diskussion, ob eine niedrig-komplexe asymptomatische Parasitämie, die lediglich mittels PCR detektiert wird, eine adäquate Immunantwort widerspiegelt. Höhere und komplexere Parasitämien dagegen, die mittels Mikroskopie erfasst werden, könnten eine wenig effiziente Immunitätslage reflektieren (Nsobya et al. 2004). Submikroskopische Infektionen in einer Studiengruppe in Tansania gingen mit erhöhten MSP-Antikörpern einher und könnten eine humorale Immunantwort auslösen oder Aufrecht erhalten (Shekalaghe et al. 2009).

Submikroskopische Infektionen in unserer Studiengruppe wiesen im Mittel 3,2 Klone (+/-1,7) auf. Eine hohe Parasitendichte ab 1001 Parasiten/ μ l ging mit einer höheren Komplexität von im Mittel 4,9 Klonen (+/-2,5) einher. Die Klonanzahl und der Logarithmus der Parasitendichte korrelierte signifikant (vgl. Kapitel 3.6.2.2). Es gilt zu hinterfragen, ob die Methodik des Parasitennachweises letztlich die Hauptursache für diese Ergebnisse ist.

Höhergradig komplexe Infektionen werden jedoch nicht immer als Risikofaktor (s.o.) gewertet. Bei älteren Kindern ist eine chronische asymptomatische Parasitämie mit einer hohen Multiziplität typisch. Eine partiell Genotypen-spezifische Immunantwort, die etwas länger andauert als die Infektion selbst, könnte zu einer Kreuzimmunität gegenüber neuen Erregertypen führen (Smith et al. 1999 b). Nigerianische Kinder (n=400) mit einer MSP-2-FC27-Monoinfektion wurde ein höheres Risiko für eine schwere Malaria bescheinigt als Kindern mit komplexen Infektionen (Amodu et al. 2008 b). Die Plasmodieninfektionen von asymptomatischen Kindern in Tansania wiesen ein komplexeres Muster mit einer höheren Klonanzahl auf als die Infektionen symptomatischer Kinder (Beck et al. 1997; Magesa et al. 2002). In einer Follow-up-Studie in Tansania über vier Jahre von allerdings nur 21 Kindern zeigte sich bei komplexen Infektionen ein Trend hin zu selteneren Malariaepisoden. Die Autoren warnen deshalb vor Interventionen, die darauf abzielen, die Prävalenz und Komplexität von Plasmodieninfektionen in Gebieten mit hoher Transmissionsrate zu reduzieren (Farnert et al. 1999 b; Snow et al. 1997). Unter 2227 Kindern in Ghana, die an *Intermittent Preventive Treatment* (IPT) – Studien teilnahmen, wurde Kindern mit multiklonalen Infektionen ein geringeres Malariarisiko zugeschrieben, allerdings nur wenn sie zu den im Rahmen der Studien unbehandelten Kindern gehörten. In Gebieten mit hoher Transmissionsrate könnte die Aufrechterhaltung der klonalen Diversität eine Rolle für den Erhalt der Immunität spielen (Liljander et al. 2010). Andere Autoren stellten jedoch keinen Einfluß von *Intermittent Preventive Treatment* auf die Komplexität der Infektionen fest (Buchholz et al. 2010).

Im holoendemischen Süd-West-Nigeria wurde unter ein bis elf Jahre alten asymptomatischen Kindern mit Plasmodieninfektion ein gradueller Anstieg der Prävalenz von Anämie bei Zunahme der Komplexität sowie der Parasitendichte gezeigt (May et al. 2000). Bei hochkomplexen Infektionen mit neun oder mehr Klonen deutete sich in unserer Studiengruppe eine Tendenz zu anämischen Werten an. Die Fallzahl war für eine statistisch verwertbare Aussage aber zu klein (vgl. Kapitel 3.8.2).

Eine Analyse der Korrelation zwischen Symptomatik und Erregertypen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben über die klinische Bedeutung einzelner Subtypen. Subpopulationen konkurrieren miteinander und können zur Selektion einzelner Varianten führen (Read und Taylor 2001). Vergleiche zwischen unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen sind dabei schwierig: In Papua Neu Guinea und in Ghana wurde dem MSP-2-Genotyp FC27 eine hohe Virulenz attestiert, während in Nigeria insbesondere asymptomatisch Infizierte Träger des FC27-Subtyps waren und diejenigen ohne Präsenz der FC27-Population einem fünffach erhöhtes Risiko für eine unkomplizierte Malaria unterlagen (al Yaman et al. 1997; Amodu et al. 2008 b; Ofosu-Okyere et al. 2001). In einer Kohorte von Kindern mit schwerer und milder Malaria in Gabun wurde eine Assoziation von K1-Subtypen mit schwerer Anämie gezeigt (Kun et al. 1998). In einer kenianischen Studie fand sich ein Vorteil für MSP-1-Ro33-infizierte Kinder (Branch et al. 2001).

Eine Untergruppe der Plasmodien-infizierten Kinder in unserer Studienkohorte bildeten 27 Kinder mit positivem Dicken Tropfen und negativer Plasmodien-spezifischer PCR. Diese zeichneten sich durch eine im Mittel sehr niedrige Parasitämie im Vergleich zu den Kindern mit positivem Dicken Tropfen und gleichzeitig positiver PCR aus (vgl. Kapitel 3.5.1). In den meisten Fällen gelang eine MSP-Genotypisierung, die damit auch eine Infektion bestätigte. Diese Proben wiesen bei einer mittleren Parasitendichte von 366 Parasiten/ μ l eine sehr niedrige Komplexität auf von durchschnittlich 1,8 Klonen/Probe (vgl. Kapitel 3.6.2.2) sowie eine geringe Diversität. Die niedrige Diversität bei niedriger Parasitämie und Komplexität könnte sich als PCR-bedingt erweisen, zum Beispiel aufgrund einer niedrigen DNA-Konzentration.

Die geringe Diversität des Ro33-Allels (vgl. Kapitel 3.6.2) im Gegensatz zu K1 und Mad20 erklärt sich durch den unterschiedlichen Aufbau der drei Allelfamilien im MSP-1-Block 2: Verschiedene Subtypen von K1 und Mad20 generieren sich aus Längenpolymorphismen in der Mitte des Blocks, die von non-repetitiven, hoch-konservierten Sequenzen umgeben werden. Ro33 dagegen kodiert für 46 Aminosäuren ohne *Repeats* mit entsprechend geringer Subtypen-Varianz.

Wenn bei niedrig-komplexen Infektionen mit niedriger Parasitämie der Ro33-Klon vorherrscht, ergeben sich zwei Erklärungsansätze: 1. Das Ro33-Allel bezeichnet den Beginn der Infektion oder 2. bei Präsenz des Ro33-Klons bleibt die Infektion niedrig-komplex und die Parasitendichte auf niedrigem Niveau. Fehlende repetitive Sequenzen im Ro33-Allel könnten eine effektive Immunantwort erleichtern. Die Präsenz von Ro33 könnte sich als vorteilhaft für Infizierte erweisen

(Branch et al. 2001). Bei jedoch insgesamt hoher Prävalenz von Ro33 bleibt diese Einschätzung spekulativ.

5 Zusammenfassung

In Ghana erkrankten jährlich circa eine Million Kinder unter fünf Jahren an Malaria. Im Wechselspiel zwischen Erkrankung und Aufbau von Immunität in den ersten Lebensmonaten der Kinder spielt die Diversität der Plasmodieninfektion eine zentrale Rolle. Variable Oberflächenantigene des Erregers erschweren den Aufbau von Immunität. Um ein genaueres Bild von Prävalenz, Saisonalität, Komplexität und klinischer Relevanz der Infektion zeichnen zu lernen, wurden in der hyper-/holoendemischen Ashanti-Region in Ghana für diese Arbeit 1070 drei Monate alte Kinder im Verlauf des Jahres 2003 untersucht. Die Kinder wurden im Rahmen einer *Intermittent Preventive Treatment* - Studie unabhängig von ihrem Gesundheitszustand in die Studiengruppe eingeschlossen und bildeten so einen altersspezifischen repräsentativen Querschnitt in den Studiendörfern der Ashanti-Region.

Die klinische Untersuchung, Hämoglobinmessung und mikroskopische Erregerdiagnostik der Kinder erfolgte in Ghana. Molekulargenetische Untersuchungen folgten im Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg. Eine Genus- und Spezies-spezifische PCR wurde hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität mit der mikroskopischen Plasmodiendiagnostik als Referenz verglichen. Beide Methoden ermöglichten Aussagen über die Prävalenz der Infektion, Saisonalität sowie Spezies-Differenzierungen. Eine Genotypisierung polymorpher Genbereiche des Plasmodiums, die für das *P.-falciparum*-Oberflächenprotein MSP-1 und -2 kodieren, beschrieb die Multiplizität der Infektionen anhand von MSP-Klonen. Die Laborergebnisse wurden mit klinischen Parametern und den Hämoglobinwerten der Kinder in Korrelation gesetzt.

Die Prävalenz der Plasmodieninfektion lag nach mikroskopischer Diagnostik bei 13,5%, nach PCR-Diagnostik bei 14,5%. Fast ausschließlich fand sich *Plasmodium falciparum*. 23,7% aller PCR-positiven Proben erwiesen sich als submikroskopische Infektionen. Im Vergleich mit dem Goldstandard Mikroskopie lieferte die PCR eine Sensitivität von 79,9% bei einer Spezifität von 96%. Ab einer Parasitämie von 600 Parasiten/ μ l erreichte die PCR-Diagnostik eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 94%. Die mittlere Klonanzahl von 3,9 Klonen/Isolat spiegelte eine hohe Komplexität der Infektionen wider. Zwischen der Klonanzahl und dem Logarithmus der Parasitendichte bestand eine lineare Korrelation. Im Jahresverlauf blieb die Anzahl der Klone

stabil. Die Prävalenz der Infektion betrug in der Regenzeit 23%, in der Trockenzeit 8,5%. Die parasitäre Diversität war in der Regenzeit signifikant niedriger als in der Trockenzeit. Plasmodien-infizierte Kinder wiesen im Mittel einen signifikant niedrigeren Hämoglobinwert auf (9,6g/dl) als nicht-infizierte Kinder (10,5g/dl). 30% der Kinder mit Parasitämie boten eine Malaria-spezifische Symptomatik. Symptomatische Kinder hatten dabei im Mittel eine höhere Parasitämie als asymptomatische Kinder (n.s.). Innerhalb dieser Querschnittsuntersuchung ließ sich keine Verschiebung der Komplexität in Abhängigkeit von der Symptomatik eines Kindes darstellen. Angesichts der niedrigen Prävalenz der Infektion scheint im Alter von drei Monaten noch ein Schutz vor Infektion zu bestehen. Findet sich jedoch eine Parasitämie, ist diese nicht selten klinisch relevant.

6 Literaturverzeichnis

Abdullah S, Adazu K, Masanja H, Diallo D, Hodgson A, Iboudo-Sanogo E, Nhalo A, Owusu-Agyei S, Thompson R, Smith T et al. (2007): Patterns of age-specific mortality in children in endemic areas of sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 77: 99 - 105

Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, Membi C, Omari S, Urassa A, Mshinda H, Jumanne A et al. (2008): Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med* 359(24): 2533 - 44

A-Elgayoum SM, El-Rayah EA, Giha HA (2010): In areas of low transmission, is the presumptive treatment of febrile but bloodsmear-negative patients for malaria validated by the results of PCR-based testing? *Ann Trop Med Parasitol* 104 (7): 573 - 81

Afolabi BM, Salako LA, Mafe AG, Ovwigho UB, Rabiou KA, Sanyaolu NO, Ibrahim MM (2001): Malaria in the first 6 months of life in urban African infants with anemia. *Am J Trop Med Hyg* 65: 822 - 827

Alifrangis M, Lemnge MM, Moon R, Theisen M, Bygbjerg I, Ridley RG, Jakobsen PH (1999): IgG reactivities against recombinant Rhoptry-Associated Protein-1 (rRAP-1) are associated with mixed Plasmodium infections and protection against disease in Tanzanian children. *Parasitology* 119: 337 - 342

Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, Mandomando I, Spiessens B, Guinovart C, Espasa M et al. (2004): Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364: 1411 - 20

Al Taiar A, Jaffar S, Assabri A, Al Habori M, Azazy A, Al Gabri A, Al Ganadi M, Attal B, Whitty CJ (2008): Who develops severe malaria? Impact of access to healthcare, socio-economic and environmental factors on children in Yemen: a case-control study. *Trop Med Int Health* 13(6): 762 - 70

al Yaman F, Genton B, Kramer KJ, Chang SP, Hui GS, Baisor M, Alpers MP (1996): Assessment of the role of naturally acquired antibody levels to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in protecting Papua New Guinean children from malaria morbidity. *Am J Trop Med Hyg* 54: 443 - 448

al Yaman F, Genton B, Reeder JC, Mokela D, Anders RF, Alpers MP (1997): Humoral response to defined Plasmodium falciparum antigens in cerebral and uncomplicated malaria and their relationship to parasite genotype. *Am J Trop Med Hyg* 56: 430 - 435

Amodu OK, Hartl DL, Roy SW (2008a): Patterns of polymorphism in genomic regions flanking three highly polymorphic surface antigens in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 159: 1 - 6

Amodu OK, Oyediji SI, Ntoumi F, Orimadegun AE, Gbadegesin RA, Olumese PE, Omotade OO (2008b): Complexity of the *msp2* locus and the severity of childhood malaria, in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 95 - 102

Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, Breckenridge A, Carneiro I, Crichley J, Danquah I, Dodoo A, Kobbe R, Lell B et al. (2009): Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* 374: 1533 - 1542

Armstrong S, Jr., Adam T, Mshinda H, Masanja H, Kabadi G, Mukasa O, John T, Charles S, Nathan R, Wilczynska K et al. (2004): Effectiveness and cost of facility-based Integrated Management of Childhood Illness (IMCI) in Tanzania. *Lancet* 364: 1583 - 1594

Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron P (2003): Polymorphism in two merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon. *Malar J* 2: 12

Babiker HA, Abdel-Muhsin AM, Ranford-Cartwright LC, Satti G, Walliker D (1998): Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *Am J Trop Med Hyg* 59: 582 - 590

Bardaji A, Sgauque B, Sanz S, Maixenchs M, Ordi J, Aponte JJ, Mabunda S, Alonso PL, Mendez C (2011): Impact of malaria at the end of pregnancy on infant mortality and morbidity. *J Infect Dis* (Epub ahead of print)

Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, Alonso P, Tanner M (1997): Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis* 175: 921 - 926

Bejon P, Andrews L, Hunt-Cooke A, Sanderson F, Gilbert SC, Hill AV (2006): Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malar J* 5: 104

Berezky S, Martensson A, Gil JP, Färnert A (2005): Short report: rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 72 (3): 249-251

Berkley J, Mwarumba S, Bramham K, Lowe B, Marsh K (1999): Bacteraemia complicating severe malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 283 - 286

Bharti AR, Patra KP, Chuquiyaauri R, Kosek M, Gilman RH, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM (2007): Polymerase chain reaction detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA from stored serum samples: implications for retrospective diagnosis of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 77: 444 - 446

Black J, Hommel M, Snounou G, Pinder M (1994): Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* and fever in malaria. *Lancet* 343: 1095

Black RE, Morris SS, Bryce J (2003): Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet* 361: 2226 - 2234

Bloland PB, Boriga DA, Ruebush TK, McCormick JB, Roberts JM, Oloo AJ, Hawley W, Lal A, Nahlen B, Campbell CC (1999): Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission II. Descriptive epidemiology of malaria infection and disease among children. *Am J Trop Med Hyg* 60: 641 - 648

Brabin BJ, Premji Z, Verhoeff F (2001): An analysis of anemia and child mortality. *J Nutr* 131: 636S - 645S

Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Bloland PB, Kaslow DC, Lal AA (1998): A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg* 58: 211 - 219

Branch OH, Takala S, Kariuki S, Nahlen BL, Kolczak M, Hawley W, Lal AA (2001): *Plasmodium falciparum* genotypes, low complexity of infection, and resistance to subsequent malaria in participants in the Asembo Bay Cohort Project. *Infect Immun* 69: 7783 - 7792

Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ (1990): Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet* 336: 1039 - 1043

Brooker S, Akhwale W, Pullan R, Estambale B, Clarke SE, Snow RW, Hotez PJ (2007): Epidemiology of plasmodium-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *Am J Trop Med Hyg* 77: 88 - 98

Brown H, Rogerson S, Taylor T, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Turner G (2001): Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg* 64: 207 - 213

Browne EN, Frimpong E, Sievertsen J, Hagen J, Hamelmann C, Dietz K, Horstmann RD, Burchard GD (2000): Malarionometric update for the rainforest and savanna of Ashanti region, Ghana. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 15 - 22

Bruce MC and Day KP (2003): Cross-species regulation of *Plasmodium* parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends Parasitol* 19: 271 - 277

Bruce MC, Donnelly CA, Packer M, Lagog M, Gibson N, Narara A, Walliker D, Alpers MP, Day KP (2000): Age- and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology* 121: 247 - 256

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE (2005): WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365: 1147 - 1152

Buchholz U, Kobbe R, Danquah I, Zanger P, Reither K, Abruquah HH, Grobusch MP, Ziniel P, May J, Mockenhaupt FP (2010): Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection following intermittent preventive treatment in infants. *Malar J* 9:244

Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K (1998): Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 4: 358 - 360

Calis JC, Phiri KS, Faragher EB, Brabin BJ, Bates I, Cuevas LE, de Haan RJ, Phiri AI, Malange P, Khoka M et al. (2008): Severe anemia in Malawian children. *N Engl J Med* 358: 888 - 899

Carneiro I, Roca-Feltre A, Griffin JT, Smith L, Tanner M, Schellenberg JA, Greenwood B, Schellenberg D (2010): Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in sub-Saharan Africa: a systematic review and pooled analysis. *PloS One* 5 (2): e8988

Carter JA, Mung'ala-Odera V, Neville BG, Murira G, Mturi N, Musumba C, Newton CR (2005): Persistent neurocognitive impairments associated with severe *falciparum* malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 476 - 481

Cattamanchi A, Kyabayinze D, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G (2003): Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of *msp-1*, *msp-2*, and *glurp*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 133 - 139

Chaisomchit S, Wichajarn R, Chowpreecha S, Chareonsiriwatana W (2003): A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 641 - 645

Chandler CI, Whitty CJ, Ansah EK (2010): How can malaria rapid diagnostic tests achieve their potential? A qualitative study of a trial at health facilities in Ghana. *Malar J* 9: 95

Chaorattanakawee S, Natalang O, Hananantachai H, Nacher M, Brockman A, Krudsood S, Looareesuwan S, Patarapotikul J (2003): Storage duration and polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper. *Am J Trop Med Hyg* 69: 42 - 44

Chiodini PL, Bowers K, Jorgensen P, Barnwell JW, Grady KK, Luchavez J, Moody AH, Cenizal A, Bell D (2007): The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101 (4): 331 - 7

Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH (1996): The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med* 184: 1531 - 1536

Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M (1999): Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol* 37: 35 - 38

Clarke SE, Brooker S, Njagi JK, Njau E, Estambale B, Muchiri E, Magnussen P (2004): Malaria morbidity among school children living in two areas of contrasting transmission in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 71: 732 - 738

Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, Rachapaew N, Zollner G, Miller RS, Vaughan JA et al. (2006): Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J* 5: 121

Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Bonnefoy S, Konate L, Trape JF, Mercereau-Puijalon O (1996): Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg* 54: 632 - 643

Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE et al. (2000): A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* 6: 689 - 692

Cox-Singh J, Mahayet S, Abdullah MS, Singh B (1997): Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using simple sampling and DNA extraction. *Int J Parasitol* 27: 1575 - 1577

Crompton DW (2000): The public health importance of hookworm disease. *Parasitology* 121 Suppl: S39 - S50

Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Holloway P, Hien TT, White NJ (2000): The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit Care Med* 28: 1833 - 1840

de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S (2003): Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 387 - 390

Dent A, Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Crabb BS, Kazura JW, King CL (2006): Prenatal Malaria Immune Experience Affects Acquisition of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 Invasion Inhibitory Antibodies during Infancy. *J Immunol* 177: 7139 - 7145

Dodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM (2002): Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 185: 971 - 979

Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, Silamut K, Ruangveerayuth R, Hardeman MR, Kager PA, Vreeken J, White NJ (1999): Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 60: 733 - 737

Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ (2000): Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* 16: 228 - 232

Ekvall H (2003): Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol* 10: 108 - 114

- Ekvall H, Arese P, Turrini F, Ayi K, Mannu F, Premji Z, Bjorkman A (2001): Acute haemolysis in childhood falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 611 - 617
- Elmardi KA, Malik EM, Abdelgadir T, Ali SH, Elsyed AH, Mudather MA, Elhassan AH, Adam I (2009): Feasibility and acceptability of home-based management of malaria strategy adapted to Sudan's conditions using artemisin-based combination therapy and rapid diagnostic test. *Malar J* 8: 39
- English M, Waruiru C, Amukoye E, Murphy S, Crawley J, Mwangi I, Peshu N, Marsh K (1996): Deep breathing in children with severe malaria: indicator of metabolic acidosis and poor outcome. *Am J Trop Med Hyg* 55: 521 - 524
- Eriksen J, Tomson G, Mujinja P, Warsame MY, Jahn A, Gustafsson LL (2007): Assessing health worker performance in malaria case management of underfives at health facilities in a rural Tanzanian district. *Trop Med Int Health* 12: 52 - 61
- Farnert A, Snounou G, Rooth I, Bjorkman A (1997): Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg* 56: 538 - 547
- Farnert A, Arez AP, Correia AT, Bjorkman A, Snounou G, do R, V (1999a): Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 50 - 53
- Farnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Bjorkman A (1999b): Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis* 179: 989 - 995
- Farnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Bjorkman A, Bruce MC, Conway DJ, Day KP, Henning L et al. (2001): Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 225 - 232
- Felger I, Smith T, Edoh D, Kitua A, Alonso P, Tanner M, Beck HP (1999): Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 29 - 34
- Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR, Marsh K, Newbold CI (1997): A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet* 6: 1357 - 1360
- Flick K, Chen Q (2004): var genes, PfEMP1 and the human host. *Mol Biochem Parasitol* 134(1): 3-9
- Fogg C, Twesigye R, Batwala V, Piola P, Nabasumba C, Kiguli J, Mutebi F, Hook C, Guillerm M, Moody A et al. (2008): Assessment of three new parasite lactate dehydrogenase (pan-pLDH) tests for diagnosis of uncomplicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 25 - 31

- Fowkes JF, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG (2010): The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PloS Med* 7 (1): e10000218
- Franks S, Koram KA, Wagner GE, Tetteh K, McGuinness D, Wheeler JG, Nkrumah F, Ranford-Cartwright L, Riley EM (2001): Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis* 183: 796 - 804
- Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE (1998): Maternal antibodies block malaria. *Nature* 395: 851 - 852
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S et al. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498-511
- Genton B, Anders RF, Alpers MP, Reeder JC (2003): The malaria vaccine development program in Papua New Guinea. *Trends Parasitol* 19: 264 - 270
- Graves P and Gelband H (2006a): Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic). *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD006198
- Graves P and Gelband H (2006b): Vaccines for preventing malaria (SPf66). *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD005966
- Grenfell P, Fanello CI, Magris M, Goncalves J, Metzger WG, Vivas-Martinez S, Curtis C, Vivas L (2008): Anaemia and malaria in Yanomami communities with differing access to healthcare. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102 (7): 645 - 52
- Gupta S, Snow RW, Donnelly C, Newbold C (1999a): Acquired immunity and postnatal clinical protection in childhood cerebral malaria. *Proc Biol Sci* 266: 33 - 38
- Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C (1999b): Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 5: 340 - 343
- Gurarie D, Zimmerman PA, King CH (2006): Dynamic regulation of single- and mixed-species malaria infection: insights to specific and non-specific mechanisms of control. *J Theor Biol* 240: 185 - 199
- Henning L, Schellenberg D, Smith T, Henning D, Alonso P, Tanner M, Mshinda H, Beck HP, Felger I (2004): A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 687 - 694
- Hogh B, Marbiah NT, Burghaus PA, Andersen PK (1995): Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect Immun* 63: 4034 - 4038

- Holding PA, Stevenson J, Peshu N, Marsh K (1999): Cognitive sequelae of severe malaria with impaired consciousness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 529 - 534
- Hommel M: Diagnostic methods in malaria; in: *Essential Malariology, Fourth Edition*; hrsg. v. Warrell DA, Gilles HM; Arnold, London 2002, 35 - 58
- Hopkins H, Talisuna A, Whitty CJ, Staedke SG (2007): Impact of home-based management of malaria on health outcomes in Africa: a systematic review of the evidence. *Malar J* 6: 134
- Hughes AL (1992): Positive selection and interallelic recombination at the merozoite surface antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 9: 381 - 393
- Kahigwa E, Schellenberg D, Sanz S, Aponte JJ, Wigayi J, Mshinda H, Alonso P, Menendez C (2002): Risk factors for presentation to hospital with severe anaemia in Tanzanian children: a case-control study. *Trop Med Int Health* 7: 823 - 830
- Kawamoto F, Miyake H, Kaneko O, Kimura M, Nguyen TD, Nguyen TD, Liu Q, Zhou M, Le DD, Kawai S et al. (1996): Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J Clin Microbiol* 34: 2287 - 2289
- Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim MY, Kim DW, Jongwutiwes S, Tanabe K (2003): A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitol Int* 52: 229 - 236
- Kihara M, Carter JA, Newton CR (2006): The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. *Trop Med Int Health* 11: 386 - 397
- King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Wahab SA, Koech D, Zimmerman P, Ouma J, Kazura JW (2002): Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol* 168: 356 - 364
- Kitua AY, Smith T, Alonso PL, Masanja H, Urassa H, Menendez C, Kimario J, Tanner M (1996): *Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health* 1: 475 - 484
- Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D (1999): A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 22: 145 - 150
- Kobbe R, Kreuzberg C, Adjei S, Thompson B, Langefeld I, Thompson PA, Abruquah HH, Kreuels B, Ayim M, Busch W et al. (2007): A randomized controlled trial of extended intermittent preventive antimalarial treatment in infants. *Clin Infect Dis* 45: 16 - 25
- Konate L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, Spiegel A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O (1999): Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 21 - 28

Koram KA, Owusu-Agyei S, Utz G, Binka FN, Baird JK, Hoffman SL, Nkrumah FK (2000): Severe anemia in young children after high and low malaria transmission seasons in the Kas-sena-Nankana district of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 62: 670 - 674

Koram KA, Owusu-Agyei S, Fryauff DJ, Anto F, Atuguba F, Hodgson A, Hoffman SL, Nkrumah FK (2003): Seasonal profiles of malaria infection, anaemia, and bednet use among age groups and communities in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 8: 793 - 802

Korenromp EL, Williams BG, Gouws E, Dye C, Snow RW (2003): Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *Lancet Infect Dis* 3: 349 - 358

Korenromp EL, Armstrong-Schellenberg JR, Williams BG, Nahlen BL, Snow RW (2004): Impact of malaria control on childhood anaemia in Africa -- a quantitative review. *Trop Med Int Health* 9: 1050 - 1065

Kreuels B, Kobbe R, Adjei S, Kreuzberg C, von Reden C, Bater K, Klug S, Busch W, Adjei O, May J (2008): Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogeneous area with high endemicity. *J Infect Dis* 197: 85 - 93

Kyabayinze DJ, Asiimwe C, Nakanjako D, Nabakooza J, Counihan H, Tibenderana JK (2010): Use of RDTs to improve malaria diagnosis and fever case management at primary health care facilities in Uganda. *Malar J* 9: 200

Kun JF, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Lell B, Luckner D, Greve B, Matousek P, Kremsner PG (1998): Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 110 - 114

Kun JF, Missinou MA, Lell B, Sovric M, Knoop H, Bojowald B, Dangelmaier O, Kremsner PG (2002): New emerging *Plasmodium falciparum* genotypes in children during the transition phase from asymptomatic parasitemia to malaria. *Am J Trop Med Hyg* 66: 653 - 658

Lawrence G, Cheng QQ, Reed C, Taylor D, Stowers A, Cloonan N, Rzepczyk C, Smillie A, Anderson K, Pombo D et al. (2000): Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of *Plasmodium falciparum* in non-immune volunteers. *Vaccine* 18: 1925 - 1931

Liljander A, Chandramohan D, Kweku M, Olsson D, Montgomery S, Greenwood B, Färnert A (2010): Influences of intermittent preventive treatment and persistent multiclonal *Plasmodium falciparum* infections on clinical malaria risk. *Plos one* 5: e13469

Ly AB, Tall A, Perry R, Baril L, Badiane A, Faye J, Rogier C, Toure A, Sokhna C, Trape JF et al. (2010): Use of HRP-2 based rapid diagnostic test for *Plasmodium falciparum* malaria: assessing accuracy and cost-effectiveness in the villages of Dielmo and Ndiop, Senegal. *Malar J* 9: 153

Magesa SM, Mdira KY, Babiker HA, Alifrangis M, Farnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, Walliker D, Jakobsen PH (2002): Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania. *Acta Trop* 84: 83 - 92

- Maitland K, Williams TN, Newbold CI (1997): *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: Biological interactions and the possibility of cross-species immunity. *Parasitol Today* 13: 227 - 231
- Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB, Jr., Peterson LR, Kaul KL (2005): Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol* 43: 2435 - 2440
- Marks F, Evans J, Meyer CG, Browne EN, Flessner C, von K, V, Eggelte TA, Horstmann RD, May J (2005): High prevalence of markers for sulfadoxine and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in the absence of drug pressure in the Ashanti region of Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1101 - 1105
- Masanja MI, McMorro M, Kahigwa E, Kachur SP, McElroy PD (2010): Health workers' use of malaria rapid diagnostic tests (RDTs) to guide clinical decision making in rural dispensaries, Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 83 (6): 1238 - 41
- Mathanga DP, Campbell CH Jr, Vanden Eng J, Wolkon A, Bronzan RN, Malenga GJ, Ali D, Desai M (2010): Comparison of anaemia and parasitaemia as indicators of malaria control in household and EPI-health facility surveys in Malawi. *Malar J* 9: 107
- May J, Meyer CG, Kun JF, Lell B, Luckner D, Dippmann AK, Bienzle U, Kremsner PG (1999a): HLA class II factors associated with *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen allele families. *J Infect Dis* 179: 1042 - 1045
- May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U, Meyer CG (1999b): High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 61: 339 - 343
- May J, Falusi AG, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Olumese PE, Bienzle U, Meyer CG (2000): Impact of subpatent multi-species and multi-clonal plasmodial infections on anaemia in children from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 399 - 403
- May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, Thye T, Agbenyega T, Horstmann RD (2007): Hemoglobin variants and disease manifestations in severe *falciparum* malaria. *JAMA* 297: 2220 - 2226
- Mayor A, Saute F, Aponte JJ, Almeda J, Gomez-Olive FX, Dgedge M, Alonso PL (2003): *Plasmodium falciparum* multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity. *Trop Med Int Health* 8: 3 - 11
- Mayxay M, Pukritrayakamee S, Chotivanich K, Imwong M, Looareesuwan S, White NJ (2001): Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with *vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65: 588 - 592
- Mayxay M, Newton PN, Yeung S, Pongvongsa T, Phompida S, Phetsouvanh R, White NJ (2004a): Short communication: An assessment of the use of malaria rapid tests by village health volunteers in rural Laos. *Trop Med Int Health* 9: 325 - 329

Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ (2004b): Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 20: 233 - 240

McElroy PD, ter Kuile FO, Lal AA, Bloland PB, Hawley WA, Oloo AJ, Monto AS, Meshnick SR, Nahlen BL (2000): Effect of *Plasmodium falciparum* parasitemia density on hemoglobin concentrations among full-term, normal birth weight children in western Kenya, IV. The Asembo Bay Cohort Project. *Am J Trop Med Hyg* 62: 504 - 512

McGregor IA (1964): The passive Transfer of human malaria immunity. *Am J Trop Med Hyg* 13: Suppl - 9

McGuinness D, Koram K, Bennett S, Wagner G, Nkrumah F, Riley E (1998): Clinical case definitions for malaria: clinical malaria associated with very low parasite densities in African infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 527 - 531

McKenzie FE and Bossert WH (1999): Multispecies *Plasmodium* infections of humans. *J Parasitol* 85: 12 - 18

McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA Jr, Wongsrichanalai C (2003): Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. *Am J Trop Med Hyg* 69: 372 - 376

Menendez C, Kahigwa E, Hirt R, Vounatsou P, Aponte JJ, Font F, Acosta CJ, Schellenberg DM, Galindo CM, Kimario J et al. (1997): Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet* 350: 844 - 850

Menendez C, Fleming AF, Alonso PL (2000): Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 16: 469 - 476

Mens PF, Schoone GJ, Kager PA, Schallig HD (2006): Detection and identification of human *Plasmodium* species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Malar J* 5: 80

Meremikwu MM, Asindi AA, Ezedinachi E (1997): The pattern of neurological sequelae of childhood cerebral malaria among survivors in Calabar, Nigeria. *Cent Afr J Med* 43: 231 - 234

Metzger WG, Vivas-Martinez S, Rodriguez I, Goncalves J, Bongard E, Fanello CI, Vivas L, Magris M (2007): Malaria diagnosis under field conditions in the Venezuelan Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102 (1): 20-4

Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF (1993): Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 59: 1 - 14

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002): The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673 - 679

- Missinou MA, Lell B, Kremsner PG (2003): Uncommon asymptomatic Plasmodium falciparum infections in Gabonese children. *Clin Infect Dis* 36: 1198 - 1202
- Miyake H, Suwa S, Kimura M, Wataya Y (1997): A variant of Plasmodium ovale; analysis of its 18S ribosomal RNA gene sequence. *Nucleic Acids Symp Ser* 37: 293 - 294
- Mugittu K, Adjuik M, Snounou G, Ntoumi F, Taylor W, Mshinda H, Olliaro P, Beck HP (2006): Molecular genotyping to distinguish between recrudescents and new infections in treatment trials of Plasmodium falciparum malaria conducted in Sub-Saharan Africa: adjustment of parasitological outcomes and assessment of genotyping effectiveness. *Trop Med Int Health* 11: 1350 - 1359
- Mulholland EK and Adegbola RA (2005): Bacterial infections--a major cause of death among children in Africa. *N Engl J Med* 352: 75 - 77
- Muller O, Traore C, Jahn A, Becher H (2003): Severe anaemia in west African children: malaria or malnutrition? *Lancet* 361: 86 - 87
- Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C (2003): Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health* 8: 876 - 883
- Newton CR, Warn PA, Winstanley PA, Peshu N, Snow RW, Pasvol G, Marsh K (1997): Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya. *Trop Med Int Health* 2: 165 - 178
- Njama-Meya D, Kanya MR, Dorsey G (2004): Asymptomatic parasitaemia as a risk factor for symptomatic malaria in a cohort of Ugandan children. *Trop Med Int Health* 9: 862 - 868
- Noedl H, Yingyuen K, Laoboonchai A, Fukuda M, Sirichaisinthop J, Miller RS (2006): Sensitivity and specificity of an antigen detection elisa for malaria diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1205 - 1208
- Nsoby SL, Parikh S, Kironde F, Lubega G, Kanya MR, Rosenthal PJ, Dorsey G (2004): Molecular evaluation of the natural history of asymptomatic parasitemia in Ugandan children. *J Infect Dis* 189: 2220 - 2226
- Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garrett E, Semba RD (2001): Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1164 - 1170
- Nyakeriga AM, Troye-Blomberg M, Dorfman JR, Alexander ND, Back R, Kortok M, Chemtai AK, Marsh K, Williams TN (2004): Iron deficiency and malaria among children living on the coast of Kenya. *J Infect Dis* 190: 439 - 447
- O'Donnell RA, Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, Crabb BS (2001): Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med* 193: 1403 - 1412

- O'Meara WP, McKenzie FE, Magill AJ, Forney JR, Permpnich B, Lucas C, Gasser RA, Jr., Wongsrichanalai C (2005): Sources of variability in determining malaria parasite density by microscopy. *Am J Trop Med Hyg* 73: 593 - 598
- Obonyo CO, Vulule J, Akhwale WS, Grobbee DE (2007): In-hospital morbidity and mortality due to severe malarial anemia in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 77: 23 - 28
- Ockenhouse CF, Angov E, Kester KE, Diggs C, Soisson L, Cummings JF, Stewart AV, Palmer DR, Mahajan B, Krzych U et al. (2006): Phase I safety and immunogenicity trial of FMP1/AS02A, a *Plasmodium falciparum* MSP-1 asexual blood stage vaccine. *Vaccine* 24: 3009 - 3017
- Ofofu-Okyere A, Mackinnon MJ, Sowa MP, Koram KA, Nkrumah F, Osei YD, Hill WG, Wilson MD, Arnot DE (2001): Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transition into the high transmission season. *Parasitology* 123: 113 - 123
- Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ (2009): Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 200: 1509-17
- Okiro EA, Al-Taiar A, Reyburn H, Idro R, Berkley JA, Snow RW (2009): Age patterns of severe paediatric malaria and their relationship to *Plasmodium falciparum* transmission intensity. *Malar J* 8: 4
- Olaleye BO, Williams LA, D'Alessandro U, Weber MM, Mulholland K, Okorie C, Langerock P, Bennett S, Greenwood BM (1998): Clinical predictors of malaria in Gambian children with fever or a history of fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 300 - 304
- Olliaro P, Pinoges L, Checchi F, Vaillant M, Guthmann JP (2008): Risk associated with asymptomatic parasitaemia occurring post-antimalarial treatment. *Trop Med Int Health* 13: 83 - 90
- Opoka RO, Xia Z, Bangirana P, John CC (2008): Inpatient Mortality in Children With Clinically Diagnosed Malaria As Compared With Microscopically Confirmed Malaria. *Pediatr Infect Dis J* 27: 319 - 324
- Oppenheimer SJ (2001): Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr* 131: 616S - 633S
- Owusu-Agyei S, Smith T, Beck HP, Amenga-Etego L, Felger I (2002): Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic inhabitants of a holoendemic malarious area in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 7: 421 - 428
- Padley D, Moody AH, Chiodini PL, Saldanha J (2003): Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 131 - 137

Pasternak ND, Dzikowski R (2009): PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol* 41(7): 1463 - 6

Pasvol G (2007): Eroding the resistance of Duffy negativity to invasion by *Plasmodium vivax*? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 953 - 954

Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, Gilles HM (1976): Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet* 1976,1: 1269 - 1272

Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, Tascon R, Franco A, Murillo LA, Ponton G et al. (1988): A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332: 158 - 161

Pfeiffer K, Some F, Muller O, Sie A, Kouyate B, Haefeli WE, Zoungrana A, Gustafsson LL, Tomson G, Sauerborn R (2008): Clinical diagnosis of malaria and the risk of chloroquine self-medication in rural health centres in Burkina Faso. *Trop Med Int Health* 13: 418 - 426

Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, Williams TN, Mwangi TW, Marsh K (2006): High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine* 24: 4233 - 4246

Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, Chongsuphajaisidhi T, White NJ (2001): Factors contributing to anemia after uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65: 614 - 622

Pullan RL, Bukirwa H, Snow RW, Brooker S (2010): Heritability of *Plasmodium* parasite density in a rural Ugandan community. *Am J Trop Med Hyg* 83 (5): 990 - 5

Read AF and Taylor LH (2001): The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292: 1099 - 1102

Rennie W, Phetsouvanh R, Lupisan S, Vanisaveth V, Hongvanthong B, Phompida S, Alday P, Fulache M, Lumagui R, Jorgensen P et al. (2007): Minimising human error in malaria rapid diagnosis: clarity of written instructions and health worker performance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 9 - 18

Rhee MS, Akanmori BD, Waterfall M, Riley EM (2001): Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol* 126: 503 - 510

Riley EM (1999): Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol Today* 20: 228 - 233

Riley EM, Wagner GE, Ofori MF, Wheeler JG, Akanmori BD, Tetteh K, McGuinness D, Bennett S, Nkrumah FK, Anders RF et al. (2000): Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. *Infect Immun* 68: 5856 - 5863

- Riley EM, Wagner GE, Akanmori BD, Koram KA (2001): Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? *Parasite Immunol* 23: 51 - 59
- Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, Sarthou JL, Mercereau-Puijalon O (1996): Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 704 - 711
- Roca A, Quinto L, Saute F, Thompson R, Aponte JJ, Alonso PL (2006): Community incidences of respiratory infections in an actively followed cohort of children <1 year of age in Manhica, a rural area of southern Mozambique. *Trop Med Int Health* 11: 373 - 380
- Roca-Feltre A, Carneiro I, Armstrong S, Jr. (2008): Estimates of the burden of malaria morbidity in Africa in children under the age of 5 years. *Trop Med Int Health* 13 (6): 771 - 83
- Roca-Feltre A, Carneiro I, Smith L, Schellenberg JR, Greenwood B, Schellenberg D (2010): The age patterns of severe malaria syndromes in sub-Saharan Africa across a range of transmission intensities and seasonality settings. *Malar J* 9: 282
- Ronald LA, Kenny SL, Klinkenberg E, Akoto AO, Boakye I, Barnish G, Donnelly MJ (2006): Malaria and anaemia among children in two communities of Kumasi, Ghana: a cross-sectional survey. *Malar J* 5: 105
- Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, Satti GM, Theander TG, Arnot DE (1996): Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 54: 325 - 331
- Ross R: The prevention of malaria. John Murray, London 1910
- Rougemont A, Breslow N, Brenner E, Moret AL, Dumbo O, Dolo A, Soula G, Perrin L (1991): Epidemiological basis for clinical diagnosis of childhood malaria in endemic zone in West Africa. *Lancet* 338: 1292 - 1295
- Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatun K (2004): Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 42: 5636 - 5643
- Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW et al. (2006): Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75: 575 - 581
- Sachs J and Malaney P (2002): The economic and social burden of malaria. *Nature* 415: 680-685
- Sasi P, Burns SP, Waruiru C, English M, Hobson CL, King CG, Mosobo M, Beech JS, Iles RA, Boucher BJ et al. (2007): Metabolic acidosis and other determinants of hemoglobin-oxygen dissociation in severe childhood *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 77: 256 - 260

Sergent E and Parrot L (1935): L'immunité, la prémuniton et la résistance innée. Archives de l'Institut Pasteur d'Algerie, 13, 279-319

Shekalaghe S, Alifrangis M, Mwanziva C, Enevold A, Mwakalinga S, Mkali H, Kavishe R, Manjurano A, Sauerwein R, Drakeley C et al. (2009): Low density parasitaemia, red blood cell polymorphisms and Plasmodium falciparum specific immune responses in a low endemic area in northern Tanzania. *BMV Infect Dis* 9: 69

Shelby JP, White J, Ganesan K, Rathod PK, Chiu DT (2003): A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14618 - 14622

Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP (1997): Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem* 249: 228 - 238

Singh B, Cox-Singh J, Miller AO, Abdullah MS, Snounou G, Rahman HA (1996): Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 519 - 521

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA (1999): A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 60: 687 - 692

Singh S, Miura K, Zhou H, Muratova O, Keegan B, Miles A, Martin LB, Saul AJ, Miller LH, Long CA (2006): Immunity to recombinant plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP1): protection in Aotus nancymai monkeys strongly correlates with anti-MSP1 antibody titer and in vitro parasite-inhibitory activity. *Infect Immun* 74: 4573 - 4580

Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, Irion A, Alonso P, Teuscher T, Tanner M (1999a): Age dependence of the multiplicity of Plasmodium falciparum infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 15 - 20

Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP (1999b): Premunition in Plasmodium falciparum infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 59 - 64

Smith T, Genton B, Baea K, Gibson N, Narara A, Alpers MP (2001): Prospective risk of morbidity in relation to malaria infection in an area of high endemicity of multiple species of Plasmodium. *Am J Trop Med Hyg* 64: 262 - 267

Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, Anders RF (1990): Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 39: 227 - 234

Snounou G and Renia L (2007): The vaccine is dead--long live the vaccine. *Trends Parasitol* 23: 129 - 132

- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN (1993): Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 58: 283 - 292
- Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero JO, Palmer A, Weber MW, Pinder M, Nahlen B, Obonyo C et al. (1997): Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet* 349: 1650 - 1654
- Snow RW, Nahlen B, Palmer A, Donnelly CA, Gupta S, Marsh K (1998): Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis* 177: 819 - 822
- Somi MF, Butler JR, Vahid F, Njau J, Kachur SP, Abdulla S (2007): Is there evidence for dual causation between malaria and socioeconomic status? Findings from rural Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 77: 1020 - 1027
- Staalsoe T and Hviid L (1998): The Role of Variant-specific Immunity in Asymptomatic Malaria Infections: Maintaining a Fine Balance. *Parasitol Today* 14: 177 - 178
- Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, Gilson PR, Murphy VJ, Anders RF, Mueller Beeson JG (2009): Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun* 77 (3): 1165-74
- Stoltzfus RJ (2003): Iron deficiency: global prevalence and consequences. *Food Nutr Bull* 24: S99 - 103
- Stoltzfus RJ, Kvalsvig JD, Chwaya HM, Montresor A, Albonico M, Tielsch JM, Savioli L, Pollitt E (2001): Effects of iron supplementation and anthelmintic treatment on motor and language development of preschool children in Zanzibar: double blind, placebo controlled study. *BMJ* 323: 1389 - 1393
- Stoute JA, Gombe J, Withers MR, Siangla J, McKinney D, Onyango M, Cummings JF, Milman J, Tucker K, Soisson L et al. (2007): Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine* 25: 176 - 184
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT (2006): Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313: 1287-90
- Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, Dolecek C, Hien TT, do Rosário VE, Arez AP et al (2010): Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis* 201: 1544 - 1550
- Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalitshe-winkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, Wilairatana P, Looareesuwan S, Rosenblatt J (2005): Evaluation of a real-time polymerase chain

reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 73: 850 - 854

Tagbor H, Caims M, Nakwa E, Browne E, Sarkodie B, Counihan H, Meek S, Chandramohan D (2010): The clinical impact of combining intermittent preventive treatment with home management of malaria in children aged below 5 years: cluster randomised trial. *Trop Med Int Health* doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02699.x (Epub ahead of print)

Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG (1987): Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 195: 273 - 287

Tanner M, Beck H.-P., Felger I, Smith T (1999): The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. General introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 1-2

Taylor TE, Borgstein A, Molyneux ME (1993): Acid-base status in paediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Q J Med* 86: 99 - 109

Taylor-Robinson A (2004): In-vitro model offers insight into the pathophysiology of severe malaria. *Lancet* 363: 1661 - 1663

Tolentino K and Friedman JF (2007): An update on anemia in less developed countries. *Am J Trop Med Hyg* 77: 44 - 51

Toma H, Kobayashi J, Vannachone B, Arakawa T, Sato Y, Nambanya S, Manivong K, Inthakone S (2001): A field study on malaria prevalence in southeastern Laos by polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg* 64: 257 - 261

Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, Clemente A, Maggi L, Mangano VD, Verra F, Bancone G, Nebie I, Sirima BS et al. (2008): Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 646 - 651

Trape JF (1985): Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 181 - 184

Trape JF (2001): The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 64: 12 - 17

United Nations, Fourth Report on the World Nutrition Situation, Administrative Committee on Nutrition, New York 2000

van Hensbroek MB, Palmer A, Jaffar S, Schneider G, Kwiatkowski D (1997): Residual neurologic sequelae after childhood cerebral malaria. *J Pediatr* 131: 125 - 129

Verhoef H, West CE, Nzyuko SM, de Vogel S, van d, V, Wanga MA, Kuijsten A, Veenemans J, Kok FJ (2002a): Intermittent administration of iron and sulfadoxine-pyrimethamine to control anaemia in Kenyan children: a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 908 - 914

Verhoef H, West CE, Veenemans J, Beguin Y, Kok FJ (2002b): Stunting may determine the severity of malaria-associated anemia in African children. *Pediatrics* 110: e48

Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapirat P, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, Snounou G (1995): Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ* 73: 85 - 95

Wagner G, Koram K, McGuinness D, Bennett S, Nkrumah F, Riley E (1998): High incidence of asymptomatic malaria infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 59: 115 - 123

Weber MW, Mulholland EK, Jaffar S, Troedsson H, Gove S, Greenwood BM (1997): Evaluation of an algorithm for the integrated management of childhood illness in an area with seasonal malaria in the Gambia. *Bull World Health Organ* 75 Suppl 1: 25 - 32

WHO 1997: Improving child health IMCI: the integrated approach:
http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_CHD_97.12_Rev.2.pdf

WHO 2000: <http://rbm.who.int/docs/hbsm.pdf>

WHO 2004: Scaling up home-based management of malaria:
http://wholibdoc.who.int/hq/2004/WHO_HTM_MAL_2004.1096.pdf

WHO 2005: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>

Wiese L, Bruun B, Baek L, Friis-Moller A, Gahrn-Hansen B, Hansen J, Heltberg O, Hojbjerg T, Kathrine HM, Kvinesdal B et al. (2006): Bedside diagnosis of imported malaria using the Binax Now malaria antigen detection test. *Scand J Infect Dis* 38: 1063 - 1068

Woehlbier U, Epp C, Kauth CW, Lutz R, Long CA, Coulibaly B, Kouyate B, Arevalo-Herrera M, Herrera S, Bujard H (2006): Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 74: 1313 - 1322

Wongsrichanalai C and Miller RS (2002): Malaria rapid tests: a public health perspective. *Lancet* 359: 1781

World Malaria Report 2009:
<http://rbm.int/malaria/publications/atoz/9789241563901/en/index.html>

Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND (2002): Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malar J* 1:2

Zimmermann O, de Ciman R, Gross U (2005): Bacteremia among Kenyan Children. *N Engl J Med* 352: 1379 - 1381

Danksagung

Diese Arbeit konnte nur gelingen dank der Unterstützung und Anleitung durch meinen Betreuer, Prof. Dr. Jürgen May vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, und Dr. Robin Kobbe. Vielen, vielen Dank! Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Groß, Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen. Ich danke Ayse und Dr. Robin Kobbe für die gute Zeit in Kumasi und Hamburg. Herzlichen Dank meinem Freund Sebastian Overlack, meinen Eltern Barbara und Dr. Volker Neuhoff und meinen Brüdern Dr. Karsten Neuhoff und Markus Neuhoff für Ihre Hilfe, Aufmunterungen und Korrekturen.