

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik  
und Poliklinik Tübingen  
Abteilung VII, Tropenmedizin  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. P. G. Kremsner**

**Bewertung der Leuchtdioden-Fluoreszenz-  
Mikroskopie im Vergleich zu konventioneller  
Fluoreszenz-Mikroskopie, Lichtmikroskopie und  
Polymerase-Kettenreaktion zur Diagnose von  
*Plasmodium falciparum*-Infektionen in Gabun**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Dominic Andreas Lenz  
aus Lörrach**

**2014**

**Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner**

**2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl**

*„Bedürfnis nach Erkennen!  
Suche zu ergründen alles, was um dich herum ist,  
gehe bis an die äußersten Grenzen des menschlichen Wissens,  
und immer stößt du zuletzt auf etwas Unergründliches -  
und dies Unergründliche heißt: Leben!“  
Albert Schweitzer*

*Meinen Eltern  
Mechtild und Ingolf Lenz*

---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1    Historie.....	6
1.2    Epidemiologie .....	7
1.3    Klassifizierung und Übertragung der Malaria .....	8
1.4    Entwicklungszyklus der Parasiten.....	9
1.5    Klinik der Malaria.....	11
1.6    Diagnostik .....	12
1.7    Goldstandard und sein Konzept.....	13
1.8    Labortechnische Verfahren zur Diagnosestellung.....	14
1.8.1    Mikroskopie nach Giemsa.....	14
1.8.2    Mikroskopie auf Malariapigment .....	15
1.8.3    Schnelltests mittels Immunchromatographie .....	16
1.8.4    Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	17
1.8.5    Fluoreszenz-Mikroskopie .....	18
1.9    Studienziele .....	19
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1    Studienzeit und Studienort.....	22
2.1.1    Malaria-Transmission in Lambaréné, Gabun .....	25
2.2    Studiendesign und Studienpopulation.....	26
2.3    Diagnostische Materialien und Methoden .....	26
2.3.1    Mikroskopische Präparate .....	27
2.3.2    Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ....	31
2.4    Statistische Auswertung.....	42
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1    Studienpopulation .....	45
3.2    Laborwerte, Symptome und Diagnose.....	46

---

3.3	Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte .....	48
3.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	49
3.5	Übereinstimmung der Methoden .....	50
3.5.1	Übereinstimmung hinsichtlich der Parasitämie .....	51
3.6	Präzision und Wiederholbarkeit .....	54
3.7	Zeitmessungen .....	57
3.7.1	Präparations-, Lese- und Gesamtzeit .....	57
3.7.2	Parasiten-Detektionszeit .....	58
3.8	Drittlesungen .....	59
3.9	Kostenaufstellung.....	59
3.10	Fragebogen.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte .....	62
4.2	Übereinstimmung der Methoden .....	65
4.3	Präzision und Wiederholbarkeit .....	66
4.4	Zeitmessung .....	66
4.5	Drittlesungen .....	67
4.6	Fragebogen.....	68
4.7	Studienpopulation .....	68
4.8	Evaluierung und Schlussfolgerung.....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichung.....</b>	<b>88</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>91</b>
	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>94</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>95</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Es wurden Standardabkürzungen und international gebräuchliche SI-Einheiten verwendet.

AO	Acridinorange
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> (erworbenes Immundefizienz-Syndrom)
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Grenzwert-Zyklus)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
evtl.	eventuell
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GS	Goldstandard
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
K	Kelvin
LED	Licht emittierende Diode
ledFM	LED Fluoreszenz-Mikroskopie
LM	Lichtmikroskopie
Lsg.	Lösung
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
Mrd.	Milliarden
MRU	Medical Research Unit am Albert-Schweitzer Spital, Lambaréné/Gabun
NFQ	<i>Non fluorescent quencher</i> (nicht fluoreszierender Löscher)
NPV	Negativer Vorhersagewert

---

OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PhHV	Phocine Herpes Virus
PPV	positiver Vorhersagewert
QBC	quantitative <i>buffy coat</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
®	eingetragenes Warenzeichen
Spp.	Arten
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
µl	Mikroliter
ü. NN	über Neutral-Null
U. S. \$	United States Dollar
uvFM	konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie
v. Chr.	vor Christus
WHO	Weltgesundheitsorganisation

---

# 1 Einleitung

---

Die Malaria ist eine von Vektoren übertragene Infektionskrankheit, die durch Parasiten der Gattung *Plasmodium*, einem Protozoon, verursacht wird. Sie wird durch den Stich einer infizierten weiblichen Mücke der Gattung *Anopheles* übertragen [1]. Ende des 19. Jahrhunderts wurde der verantwortliche Parasit identifiziert und der Übertragungsweg erstmalig beschrieben [2, 3]. Der Ausdruck Malaria leitet sich vom italienischen Begriff „mal’aria“ – auf Deutsch: „schlechte Luft“ – ab, da die Krankheit mit schlechter Luft in sumpfigen Gebieten assoziiert wurde [4]. Auch heute ist sie trotz über 100 Jahre langer Forschung und Jahrzehnte langer globaler Investitionen bezüglich ihrer Bekämpfung nach wie vor neben Tuberkulose und HIV/AIDS eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme weltweit.

In über 100 Ländern sind 2,2 Milliarden Menschen gegenüber der Malaria exponiert, es gibt jährlich weltweit etwa 300 – 500 Millionen registrierte Infektionsfälle und etwa 1 Millionen Tote durch die Infektion mit *Plasmodien*. Hierbei werden 90% der Krankheitslast von afrikanischen Ländern südlich der Sahara getragen [5-7]. Hierbei handelt sich zumeist um Kinder unter fünf Jahren. Schätzungen zufolge kann die Malaria für bis zu 25% der Mortalität bei Kindern vor dem 5. Lebensjahr in Afrika verantwortlich gemacht werden [8].

Es fehlt häufig ein akkurates verlässliches schnelles diagnostisches Instrument, das insbesondere für die Risikogruppe der Kleinkinder mit schwerer Malaria notwendig wäre [7]. Somit werden Patienten immer wieder aufgrund unpräziser klinischer Diagnosen behandelt. Dies führt zu Überbehandlung [9, 10], höheren Kosten und gegenüber üblichen Malaria-Medikamenten steigenden Resistenzen [11-13]. Seit 1904 ist die Mikroskopie von mit Giemsa-Lösung gefärbten Präparaten [14, 15] das verbreitetste diagnostische Verfahren und der Goldstandard. Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwendig, erfordert gut ausgebildete und sehr erfahrene Untersucher und eine sorgfältige Herstellung der Lösung, die mehrmals täglich erneuert werden muss. Aus diesen Gründen suchen Wissenschaftler nach neuen diagnostischen Instrumenten. In der dieser

---

Arbeit zugrunde liegenden Studie wurde die Leuchtdioden (LED) basierten Fluoreszenz-Mikroskopie als mögliches Instrument für die Malaria-Diagnostik untersucht.

## 1.1 Historie

Bereits der griechische Arzt Hippokrates von Kos (460 v. Chr. – 370 v. Chr.) soll das periodische Fieber beschrieben haben. Es vergingen jedoch über zwei Jahrtausende bis der französische Arzt Charles Louis Alphonse Laveran [2, 3] 1880 während eines Kriegseinsatzes in Algerien die Parasiten erstmals im menschlichen Blut nachweisen konnte. Sechs Jahre später gelang es dem Italiener Camillo diese Parasiten in Zusammenhang mit dem periodischen Malariafieber zu setzen. Weitere zehn Jahre vergingen, bis Ronald Ross 1897 im Dienst für den *Indian Medical Service* Plasmodien in den Mägen der Mücke der Gattung *Anopheles* nachwies [16] und damit Amico Bignami den Weg bereitete, der 1899 an der königlichen Universität zu Rom den kompletten Infektionsweg nachvollzog [17]. Für ihre Forschung auf dem Gebiet der Malaria erhielten Ronald Ross und Charles Laveran 1902 bzw. 1907 den Nobelpreis [18].

Zu diesem Zeitpunkt bestand das Wechselfieber, wie die Erkrankung im Deutschen genannt wurde, als globales Problem, das bis zum Ende des zweiten Weltkrieges auch in Europa vorherrschte. Erst in der Zeit danach konnte die Malaria durch das Trockenlegen der Sümpfe, den flächendeckenden Einsatz von Insektiziden sowie durch die Entdeckung des Anti-Malaria-Medikaments Chloroquin [19] aus Europa verbannt werden.

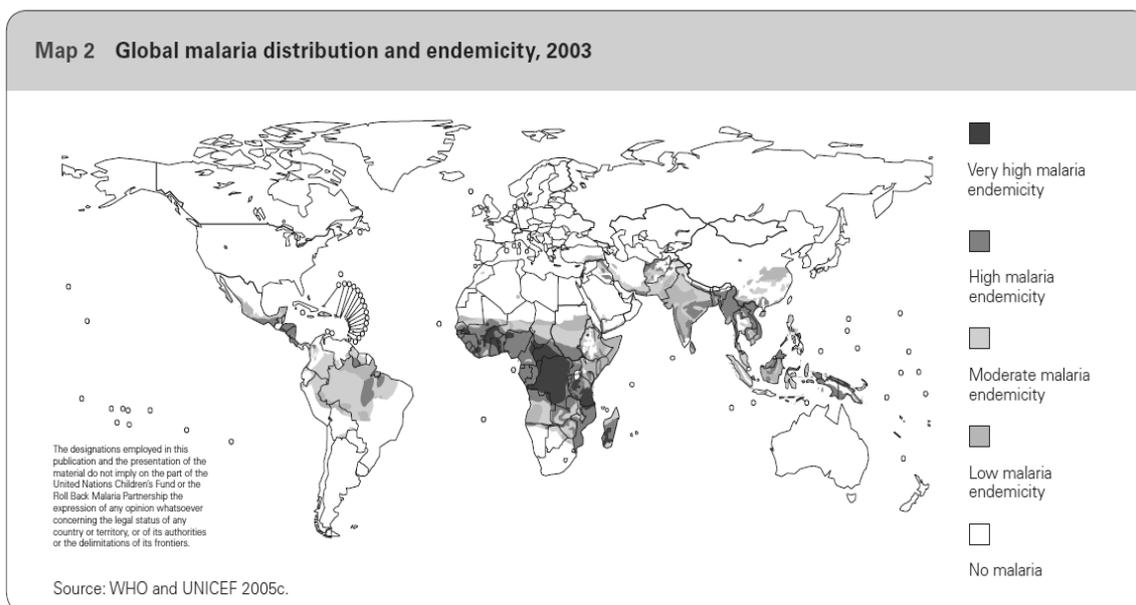
Im Zuge dessen rief die WHO in den 1950er Jahren den Plan aus, die Infektionskrankheit auch global auslöschen zu wollen [20]. Jedoch ließen erste Resistenzen von Mücken gegen das Insektizid Dichlorphenyltrichlorethan sowie das Auftreten einer Chloroquin-Resistenz der Parasiten [21] 1956 diesen Plan scheitern. Seither war bis 2010 eine Zunahme der Morbidität und Mortalität der Malaria zu verzeichnen, die zusätzlich durch die Faktoren der Resistenzentwicklung gegenüber neuen Medikamenten, des globalen Klimawandels, der Migration und der mangelhaften Gesundheitsversorgung im

ländlichen Raum von Entwicklungsländern negativ beeinflusst werden [22]. Mit einer immensen sozioökonomischen Last von jährlich geschätzten 2 Mrd. US\$ [23], muss die Malaria jedoch nicht als regionales sondern als globales Problem verstanden werden.

## 1.2 Epidemiologie

Vierzig Prozent der Weltbevölkerung in 90 Ländern leben in Risikogebieten für Malaria-Transmission. Laut „World Malaria Report 2011“ [24] der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab es im Jahr 2010 etwa 216 Mio. Fälle und geschätzte 655 000 Todesfälle durch Malaria. Durch bessere medizinische Versorgung fielen die Mortalitätsraten seit dem Jahr 2000 um mehr als 25%, in Afrika sogar um 33%. Die meisten Todesfälle ließen sich allerdings nach wie vor bei Kindern unter fünf Jahren feststellen [25]. Verantwortlich für den größten Teil der Infektionen und für die gefährlichsten Verläufe ist der Parasit *Plasmodium falciparum*. Neben diesem kommen die humanpathogenen Arten *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi* vor. Insbesondere betroffen sind subtropisch und tropisch Gebiete (Abb. 1-1) in Afrika, Asien und Lateinamerika; dabei erstreckt sich die endemische Zone von südlich der Sahara bis zum 28. Breitengrad. An den nördlichen wie südlichen Randgebieten dieses Gürtels kommt die Malaria hingegen saisonal vor [26, 27]. Dort spielen die Arten *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* eine größere Rolle, die im Gegensatz zur *Malaria tropica*, die durch *Plasmodium falciparum* ausgelöst wird, in der Regel ohne weitreichende Komplikationen verlaufen. In Europa wurde die Malaria wie bereits erwähnt im Laufe des 20. Jahrhunderts weitgehend eradiziert [28]. Andererseits lassen sich durch zunehmende Fernreisen erneut steigende Zahlen von Malaria-Infektionen in Europa feststellen. So schätzte man in Europa im Jahr 2006 die Zahl der Fälle auf etwa 3775, wovon 97.6% durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wurden [29]. In Deutschland wurden im Zeitraum von 1993 – 2007 dem Robert-Koch-Institut 11 605 Fälle von Malaria gemeldet, auch in diesen Fällen mehrheitlich

hervorgerufen durch den Erreger *Plasmodium falciparum* [30]. Die Probleme gestalten sich in den nördlichen Ländern anders als in den endemischen Gebieten: hier sind Zugang zu Diagnostik und Therapie keine Schwierigkeit, sondern die mangelnde Kenntnis und Aufklärung im Gesundheitswesen führen zum Übersehen der möglichen Differentialdiagnose [31] und somit zur Verzögerung des Therapiebeginns. Hierdurch kommt es immer wieder zu gefährlichen Komplikationen durch die Erkrankung [32]. Zudem ist es 2011 erstmals seit 60 Jahren wieder zu autochthon übertragener Malaria in Griechenland gekommen, so dass die Umweltbedingungen für die Plasmodien in Europa wieder günstig erscheinen und mit weiteren Übertragungen in Südeuropa zu rechnen ist [33, 34].



### Abbildung 1-1 Globale Malaria-Verteilung

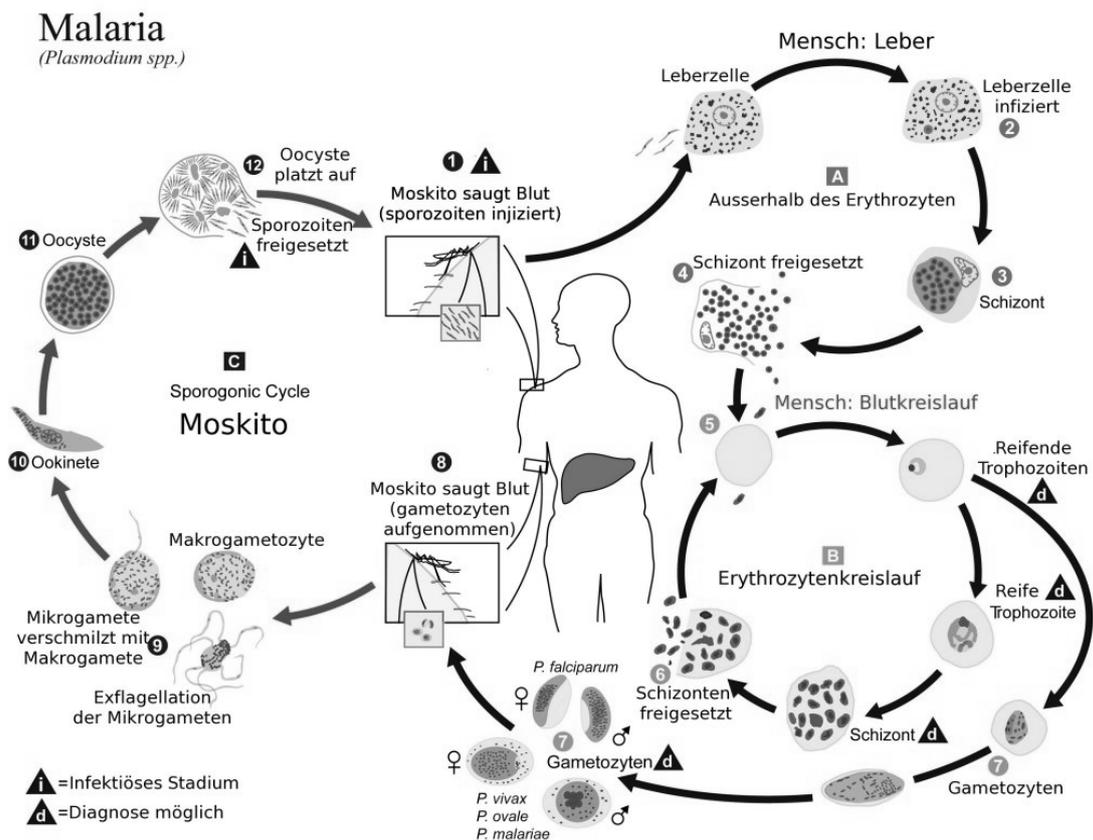
UNICEF 2007 Report: Malaria & Children: Progress in Intervention Coverage  
Verwendung genehmigt am 10.01.2013 durch UNICEF

## 1.3 Klassifizierung und Übertragung der Malaria

Der für Malaria-Infektionen verantwortliche Parasit *Plasmodium* gehört zu den Protozoen, zum Stamm der Apicomplexa, zur Klasse der Sporozoa, zur Ordnung der Eucoccidiida. Es sind weltweit etwa 100 Arten bekannt, von denen aber nur die fünf im oberen Abschnitt genannten Plasmodien humanpathogen sind. Auf den Menschen übertragen wird die Infektion durch den Stich einer

*Anopheles*-Mücke. Hiervon gibt es etwa 400 Spezies weltweit, wovon 60 Arten als Vektoren die Malaria übertragen können, jedoch davon nur etwa die Hälfte für die Malaria-Übertragung auf den Menschen eine Rolle spielen. In Afrika sind dies insbesondere die *Anopheles gambiae* und die *Anopheles funestus* [35]. Neben der *Anopheles*-Mücke als Hauptwirt dient der Mensch als Nebenwirt. Nach einer Blutmahlzeit beim infizierten Menschen und einem Entwicklungsprozess von 8-16 Tagen innerhalb der Mücke ist ein Stich infektiös. Die Mücken sind vor allem in der Dämmerung und in den frühen Abendstunden aktiv. Die Sporogonie findet hierbei nur unterhalb von etwa 2000 m ü. NN Höhe statt und benötigt Temperaturen zwischen 16 – 33°C bei hoher Luftfeuchtigkeit [36].

### 1.4 Entwicklungszyklus der Parasiten



**Abbildung 1-2 Entwicklungszyklus von Plasmodium spp.**  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Malaria> (released to the public domain), besucht am 23.09.2012

Abbildung 1-2 zeigt den im Folgenden beschriebenen Entwicklungszyklus des *Plasmodium*: Durch den Stich von einer mit Plasmodien infizierten Mücke werden mit ihrem Speichel Sporozoiten aus der Speicheldrüse in den menschlichen Blutkreislauf übertragen (1). Diese Sporozoiten befallen Hepatozyten in der Leber (2), wo sie sich innerhalb von etwa 6 Tagen asexuell reproduzieren und zu hepatischen Schizonten heranreifen (3). Die Schizonten zerstören die Leberzelle und setzen bis zu 30 000 Merozoiten in die Blutbahn frei (4), in der sie durch Eigenbewegung und Oberflächeninteraktion mit der Erythrozytenoberfläche in diese eindringen. Nach dem Befall der Erythrozyten entwickeln sie sich zu Ringformen und wachsen zu Trophozoiten heran, die wiederum durch asexuelle Replikation zu Blutschizonten werden, bevor die Erythrozyten platzen und die Schizonten freisetzen (6). Innerhalb von 48 Stunden - im Falle der *Malaria tropica* - wiederholt sich dieser Kreislauf, was zu den typischen periodischen Fieberschüben führen kann. Im Gegensatz hierzu können *Plasmodium vivax* und *ovale* monatelang im Leberstadium verweilen und somit erneut Monate nach Infektion zum Ausbruch klinischer Symptome führen.

Parallel zum Blutkreislauf entwickeln sich aus den Trophozoiten die sexuellen Formen der Gametozyten (7). Kommen diese über einen erneuten Stich einer *Anopheles*-Mücke in den Verdauungstrakt der Mücke, setzt der Temperaturabfall von 2 - 5°C sowie die pH-Änderung und das Vorhandensein von Xanthurensäure im Magen der Mücke die Gametogenese in Gang (9). Es entwickeln sich männliche Mikrogameten und weibliche Makrogameten, die zusammen zur Zygote (10) fusionieren. Die daraus entstehenden Ookineten binden an die Darmwand und penetrieren diese, wonach sie innerhalb von 1 - 15 Tagen zwischen dem Darmwandepithel und der Basallamina zu Oozysten reifen, aus denen Sporoblasten durch Zellteilung hervorgehen (11). Diese reifen und lysieren, wodurch sie wiederum Sporozoiten freisetzen (12), die in Richtung Speicheldrüse wandern, diese penetrieren, um sich schließlich apikal in dieser als Bündel zu sammeln. Von dort aus treten sie mit dem gerinnungshemmenden Speichel wieder beim Stichvorgang in das menschliche Blut über (1) [37].

## 1.5 Klinik der Malaria

Das klinische Bild der Malaria ist unspezifisch. Es ist Folge der oben beschriebenen asexuellen Fortpflanzung der humanpathogenen Plasmodien in der asexuellen Erythrozyten-Phase. Zu Beginn der Erkrankung stellen sich häufig Unwohlsein, Appetitverlust, Kopfschmerzen und Fieber ein [38]. Der weitere Verlauf hängt maßgeblich von der Art der Plasmodien sowie der Abwehrlage des Infizierten ab. In schwerwiegenderen Fällen kann es neben dem Leitsymptom des Fiebers zu Schüttelfrost, Schweißausbrüchen, Erschöpfung, Arthralgien, Übelkeit und gastrointestinalen Symptomen kommen. Weitere mögliche Symptome bei schwerer Infektion sind Lungenödeme, Hämoglobinurie (Schwarzwasserfieber) und Anämie. Vor allem bei der *Malaria tropica* -ausgelöst durch *Plasmodium falciparum* - kann die Infektion bei immunologisch naiven und nicht prophylaktisch behandelten Personen einen fulminanten Verlauf mit letalem Ausgang nehmen. Typische laborchemische Befunde sind Anämie, Hyperlaktatämie [39] und Hypoglykämie. Bisweilen kommt es in besonders schweren Fällen zu Koma durch zerebrale Kapillarenequstration, akuten Nierenschäden durch Tubulusnekrose [40] sowie Netzhaut-, Knochenmark- oder Herzmuskelschäden.

Im Fall der im vorangehenden Kapitel beschriebenen exponentiellen zyklushaften Vermehrung in der Erythrozyten-Phase, kommt es zur schubweisen Zerstörung der roten Blutkörperchen unter Freisetzung der zellulären Bestandteile sowie der erythrozytären Schizonten, die eine schwere Immunreaktion bis hin zum Schock auslösen können. Es kann eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen, vor allem TNF- $\alpha$  [41] und pro-inflammatorische Interleukine, wie IL-1 $\beta$  und IL-6 [42], sowie von Stickstoffmonoxid und freien Sauerstoffradikalen gemessen werden, die Parallelen zu einem septischen Syndrom mit überschießender Immunreaktion aufweisen [43].

Die besondere Pathogenität der *Malaria tropica* kann teilweise auf die Oberflächeneigenschaften von mit Parasiten befallenen Erythrozyten zurückgeführt werden. Diese ermöglichen eine Anheftung von infizierten Erythrozyten an das Endothel postkapillärer Venolen – die Sequestration; dies führt zu einer Störung der Mikrozirkulation [44] und zu einer beschleunigten

Vermehrung, da weniger Parasiten die Milz passieren, dort erkannt und phagozytiert werden. In diesem Zusammenhang kommt der zerebralen Malaria als eine der gefährlichsten Komplikation der *Plasmodium falciparum*-Infektion eine besondere Bedeutung zu [45]: Die Sequestration in zerebralen Gefäßen stört die Blut-Zirkulation in zentralem Nervensystem. Es treten Defekte der Blut-Hirn-Schranke, Ödeme, Infarkte und Hämorrhagien auf, die zu Konvulsionen, Bewusstseinsintrübung und komatösen Zuständen führen können.

Insbesondere ab einer Parasitämie von über 500 000 Parasiten /  $\mu\text{l}$  droht eine Hämolyse mit gefährlichen Konsequenzen. Gerade in diesen Fällen ist eine schnelle Diagnose und die sofortige Behandlung unabdingbar [46].

## 1.6 Diagnostik

Epidemiologie, Krankheitslast sowie Resistenzentwicklungen zeigen, wie wichtig eine akkurate und schnelle Diagnostik der Malaria ist. Eine eindeutige Diagnose auf dem klinischen Wege ist aufgrund der verhältnismäßig unspezifischen Krankheitssymptome unmöglich [47].

Unter den Infektionskrankheiten nimmt die Malaria zudem eine besondere Stellung ein, da bei Ihrer Diagnostik die Quantifizierung der Erreger eine entscheidende Rolle spielt. Hierbei sind insbesondere die asexuellen Blutstadien von Bedeutung.

Erstmals konnte Laveran den Erreger der Malaria im Jahr 1880 mikroskopisch nachweisen und beschreiben. Er konnte die Exflagellation eines männlichen Gametozyten unter Verwendung von Methylenblau sehen. Romanowski fügte dem Methylenblau noch Eosin Y hinzu, was aber nicht die gewünschten Resultate lieferte. Somit blieb die akkurate Diagnose der Malaria eine der größten Herausforderungen zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Bernhard Nocht entwickelte daher die so genannte „Rote Form“ des Methylenblaus. Er arbeitete zusammen mit Gustav Giemsa, der die Giemsa-Färbung entwickelte, die bis heute in Laboren weltweit Verwendung findet: Sie färbt im Parasiten zytoplasmatisches Chromatin blau und nukleäres rot an und macht sie leicht erkennbar [15]. Seither wurden weitere Versuche unternommen, neue und

---

bessere Methoden zu entwickeln, jedoch ist die Lichtmikroskopie nach Giemsa – als dicker Tropfen oder Blutausstrich – nach wie vor Goldstandard der Malaria-Diagnostik. Im Folgenden werden die Definition des Goldstandards und die unterschiedlichen aktuell etablierten Methoden der Malaria-Diagnostik im Einzelnen beschrieben.

## 1.7 Goldstandard und sein Konzept

Der Begriff des Goldstandards ist ein in der Medizin geläufiges Schlagwort. Per Definition handelt es sich dabei um einen Begriff, der sowohl zur Bezeichnung von Verfahren verwendet wird, die bislang unübertroffen sind, als auch solcher, die nach Meinung der Protagonisten zum Standard werden sollten. Meist beschreibt der Begriff also entweder Verfahren, die bereits seit längerer Zeit an vielen Orten angewandt werden, oder solche, die Einzug als Standard erhalten sollen [48]. Geschichtlich betrachtet kommt der Begriff des Goldstandards aus dem Bankenwesen: Vor dem ersten Weltkrieg gab es eine von England ausgehende feste Bindung der Währung an einen Goldwert - den Goldstandard. Diese Bindung wurde während des Weltkrieges ausgesetzt. In den Vereinigten Staaten wurde hingegen erst in den 1970er Jahren die Währung schlussendlich vom Goldstandard abgekoppelt.

In der Medizin findet sich die erste Erwähnung des Begriffs 1979 bei Rudd [49] zur Beschreibung einer einfachen, objektiven und praktischen Technik. Im Sinne der Diagnostik wurde der Begriff für die beste verfügbare Nachweismethode verwendet. In den darauf folgenden Jahrzehnten wurde kontrovers diskutiert, ob ein solcher Begriff in einem sich fortlaufend weiterentwickelnden Feld der Medizin als sinnvoll erachtet werden kann [50, 51]. Denn ist ein solcher Standard erst einmal etabliert, ist seine Autorität oft so überwältigend, dass es einiger Anstrengung bedarf, um ihn zu erschüttern [52]

Heute wird der Begriff für Methoden verwendet, die nach den oben genannten Kriterien unter den Bedingungen des üblichen Einsatzes sinnvoll sind. Dabei geht es nicht immer um höchste Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte, sondern zugleich um die klinische Relevanz, Durchführbarkeit und Kosten.

---

Im Falle der hier beschriebenen Studie ist die Lichtmikroskopie seit Anbeginn der Malaria-Diagnostik der Goldstandard. Es soll beleuchtet werden, in wie fern diese Methode als Goldstandard überdacht werden sollte.

## 1.8 Labortechnische Verfahren zur Diagnosestellung

### 1.8.1 Mikroskopie nach Giemsa

Die nach dem Hamburger Chemiker Gustav Giemsa (1867-1948) benannte, am Hamburger Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten entwickelte Färbung ist eine häufige histopathologische Untersuchungsmethode. Sie nimmt in der Malaria-Diagnostik einen wichtigen Stellenwert ein. Ihre Bestandteile sind Azur-A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin. Durch diese Färbung wird die Zellkern-Desoxyribonukleinsäure (DNA) leuchtend rot, das Zytoplasma bläulich gefärbt. Für die Diagnosestellung der Malaria werden entweder ein Dicker Tropfen oder ein Blut-Ausstrich durchgeführt. Da im Dicken Tropfen quantitativ mehr Blut untersucht werden kann und somit die Sensitivität steigt, wird diese Methode insbesondere für die Erstdiagnose eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der Parasiten wird mit den in den Blickfeldern erfassten weißen Blutkörperchen verrechnet. Daher muss für die genaue Parasitenlast-Bestimmung zusätzlich eine hämatologische Analyse erfolgen. Eine Alternative stellt die Lambaréné-Methode nach Planche dar: hierbei wird eine genau bekannte Menge Blut auf eine definierte Fläche des Objektträgers aufgebracht; dies macht eine zusätzliche hämatologische Bestimmung überflüssig [53]. Der Ausstrich (Abb. 1-3) eignet sich hingegen aufgrund von weniger Artefakten besser zur Differenzierung der Arten oder zur Parasitämie-Bestimmung im Falle hoher Parasitenlasten. Es ist eine einfache und preiswerte wenn auch zeitaufwendige Methode, die zudem sehr von der Qualität der Färbung und der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist. Ein weiterer Nachteil der mikroskopischen Untersuchung von peripherem Blut besteht darin, dass die so bestimmte Parasitenlast bei stattgehabter Sequestration, wie sie bei der *Malaria tropica*

vorkommen kann, nicht der tatsächlichen, für die Prognose relevanten, Parasitenlast entspricht [54, 55].

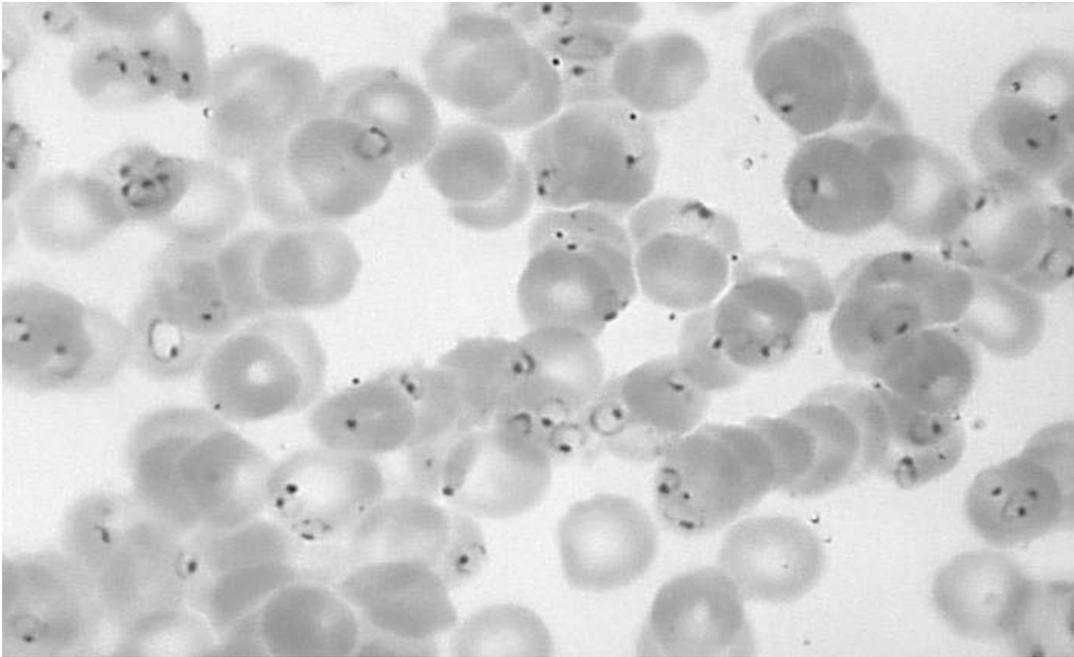


Abbildung 1-3 Dicker Tropfen mit *Plasmodium falciparum*-Befall

[http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031017/51d3c31bec3d4db7bac825db2b2a2b58/4885\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031017/51d3c31bec3d4db7bac825db2b2a2b58/4885_lores.jpg), Public Domain, besucht am 28.12.2012

### 1.8.2 Mikroskopie auf Malariapigment

Eine alternative mikroskopische Diagnostik ist die Dunkelfeldmikroskopie zum Nachweis von Malariapigment [56]. Dies ist aus dem Stoffwechsel der Parasiten anfallendes Hämозoin, das von Leukozyten aufgenommen wird. Malariapigment in Leukozyten ist ein bereits etablierter prognostischer Marker [57, 58] und spezifisch für Plasmodien. Allerdings spricht ein positiver Nachweis nicht immer für eine akute Infektion, da es noch eine Woche nach Ausheilen einer Infektion detektierbar ist [59]. Weitere Nachteile entstehen durch die Abhängigkeit der Sensitivität dieser Methode von der absoluten Parasitämie. Für den direkten Nachweis von *Plasmodium falciparum* ist die Methode nur begrenzt geeignet, da nur frühe Formen, die kein oder nur sehr wenig Hämозoin enthalten, im peripheren Blut zirkulieren [60]. Außerdem ist die Verbreitung von Dunkelfeldmikroskopen im ländlichen Raum in Malaria-Endemie-Gebieten sehr gering [61].

### 1.8.3 Schnelltests mittels Immunchromatographie

Aufgrund des zeitlichen Aufwands für die Mikroskopie sowie das notwendige Untersucher-Training wurde in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend an durch Laien verwendbaren Alternativen geforscht. Hierbei eröffneten vor allem die immunologische Methoden neue Möglichkeiten. Eine dieser Methoden ist die Immunchromatographie, bei der synthetisch hergestellte Antikörper spezifisch an Antigene binden. Durch Fluoreszenz- oder Farbmarkierungen können die so gebundenen Antikörper detektiert werden. Dieses Verfahren machen sich Schnelltestsysteme (Abb. 1-4) zu Nutze, bei denen Teststreifen

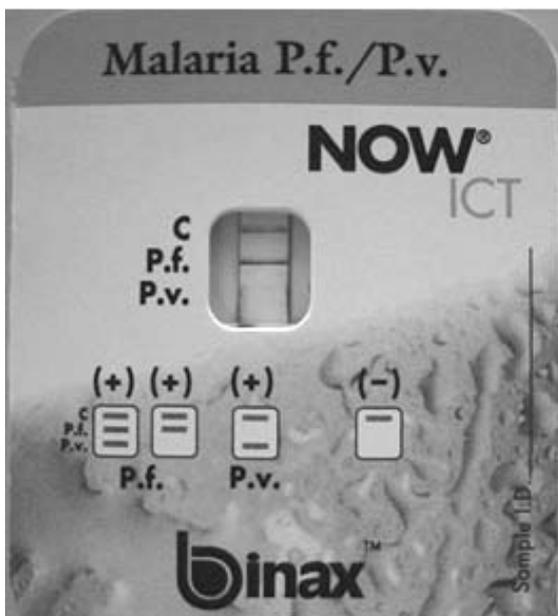


Abbildung 1-4 Schnelltest auf ELISA-Basis  
 fotografiert am 12.11.2009

mit Antikörpern an einen oder mehrere *Plasmodium*-Typen binden. Diese werden - in Patienten-Blut vermengt - mit einer Reagenzlösung aufgebracht. Häufig verwandt wird das *Plasmodium*-spezifische Antigen HRP-2 (*Histidin Rich Protein 2*). Es wird von fast allen *Plasmodium falciparum*-Stämmen produziert und spielt unter anderem im Stoffwechsel des Abbaus toxischer Produkte im Parasiten eine Rolle. Es wird in vielen Tests zum Nachweis von *Plasmodium*

*falciparum* eingesetzt [62]. Ein weiteres Antigen ist die *Plasmodium*-Aldolase, ein Enzym der Glykolyse, aus welcher die Parasiten fast ausschließlich ihre Energie gewinnen [63]. Es weist eine hohe Ähnlichkeit zur humanen Aldolase auf, ist allerdings hochkonserviert und besitzt ausreichend unterschiedliche Merkmale, was eine falsch-positive Detektion aufgrund von Antigenvariationen sehr unwahrscheinlich macht [64]. Als weiterer Marker aller humanpathogener Plasmodienarten wird die für Plasmodien spezifische Laktatdehydrogenase verwendet. Bezüglich der diagnostischen Wertigkeit lässt sich feststellen, dass der Nachweis für die häufigste Art, *Plasmodium falciparum*, zufrieden stellend gelingt, jedoch die Diagnosestellung für *Plasmodium malariae* und *ovale* bisher

---

keine ausreichende Qualität zeigt [65]. Sensitivität und Spezifität differieren je nach Studienlage, sind aber mit denen der Mikroskopie im afrikanischen Routineumfeld vergleichbar [66]. Allerdings lassen diese Schnelltests nur qualitative Aussagen zu, weisen bei hohen wie niedrigen Parasitämien fragliche Ergebnisse auf [67] und ihre Ergebnisse sind nach langen Lagerzeiten (*shelf life*) nicht mehr verlässlich. Weitere Nachteile sind Kreuzreaktionen mit Rheumafaktoren [68, 69] und Persistenz der Proteine nach Ausheilung einer Infektion [13, 70] und somit falsch-positive Ergebnisse. Aus dem letztgenannten Grunde sollten sie in holoendemischen Gebieten bei ganzjähriger Transmission nur in abgelegenen Gebieten ohne anderer diagnostische Möglichkeiten bzw. bei Reisenden ohne vorangegangene Infektionen eingesetzt werden. Im Vergleich zur mikroskopischen Standarddiagnostik sind sie teuer [13] und können nur über kurze Zeit gelagert werden, was eine Infrastruktur für regelmäßigen Nachschub notwendig macht.

#### **1.8.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die PCR wurde erstmals in den 80er Jahren zum Nachweis und Sicherung von Infektionen mit Plasmodien unter Zuhilfenahme spezifischer Primer und Sonden beschrieben [71-73]. Mit dieser hochsensitiven und spezifischen Methode konnte nachgewiesen werden, dass selbst subklinische Infektionen, die ursprünglich in Bezug auf Lichtmikroskopie falsch positiv eingestuft wurden, durch extensive Mikroskopie als richtig positiv zu werten waren [74]. Allerdings benötigt die PCR eine kostspielige Ausstattung, hohe Labor-Standards und eine intensive labortechnische Ausbildung der Untersucher. Zudem entstehen Probleme durch häufige Kontaminationen sowie damit verbundene notwendige Kontrollen. Hauptargument gegen einen Routine-Einsatz bleibt jedoch die lange Diagnosezeit. Daher wird diese Methode heute nur eingeschränkt zur Sicherung von unklaren Verdachtsdiagnosen, Diagnosen subklinischer Infektionen [75] oder im Rahmen wissenschaftlicher Projekte eingesetzt [76]. Allerdings eignet sich die PCR besonders zur Diversitätsbestimmung der Arten [77] und zum Testen von Medikamentenresistenzen.

### 1.8.5 Fluoreszenz-Mikroskopie

Im Laufe der Entwicklung weiterer mikroskopischer Verfahren trat die Fluoreszenzmikroskopie als mögliches sinnvolles diagnostisches Instrument ins Blickfeld. Bei dieser Methode macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass von Parasiten befallene Erythrozyten - im Gegensatz zu normalen Erythrozyten - DNA der Plasmodien enthalten. Daher kann mit einfachen Nukleinsäure interkalierenden Fluoreszenzfärbung die befallenen Blutkörperchen sichtbar gemacht werden. Eine hierfür häufige verwendete Färbung ist Acridinorange (AO) [78]. Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Malaria-Diagnose sind vergleichbar mit denen der Lichtmikroskopie. Von Vorteil ist hierbei die sehr kurze Färbezeit und die Einfachheit der Methode, die kaum zusätzliches Training der Untersucher notwendig macht [76, 79]; nachteilig ist hingegen die Untersucherabhängigkeit der Ergebnisse und die spezielle und teure technische Ausstattung [80] wie eine Dunkelkammer und ein Quecksilber-Dampflampen-Mikroskop mit Ersatzteilen und gesicherter Stromversorgung. Um diesen zweiten Nachteil zu beheben entwickelte Kawamoto eine Interferenz-Filter-Methode, mit der man mit normalen Lichtmikroskopen durch die Verwendung von Filter-Einsätzen eine Fluoreszenz-Mikroskopie mit Acridinorange möglich macht [81]. Allerdings erschwert das durch eingesetzte Interferenzfilter abgeschwächte Licht eine akkurate Diagnose [79, 82-85].

#### 1.8.5.1 Fluoreszenzmikroskopie nach Zentrifugation – QBC<sup>®</sup>

Eine weitere Fluoreszenz-Technik bezüglich der Malaria-Diagnostik wurde erstmals von Levine beschrieben [86]: nach der QBC<sup>®</sup>-Methode wird die Blutprobe nach Anfärbung mit Acridinorange in speziellen Kapillaren zentrifugiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Durch die Zentrifugation konzentrieren sich die Blutkörperchen und es gelingt ein schneller Nachweis auch von geringeren Parasitämien bei hoher Sensitivität [87]. Des Weiteren können Hämatokrit und der Anteil weißer Blutkörperchen direkt mitbestimmt werden. Nachteilig sind hohe Kosten der technischen

---

Ausstattung, eine komplizierte Methode, die keine sichere Identifikation der Arten erlaubt sowie das Fehlen einer möglichen Archivierung [82].

#### **1.8.5.2 LED- Fluoreszenz- Mikroskopie**

Eine erst kürzlich entwickelte Fluoreszenz-Technik ist die Fluoreszenz-Mikroskopie auf Basis von Leuchtdioden einer bestimmten Wellenlänge unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Sie wurde bereits als Methode in der Tuberkulose-Diagnostik unter Verwendung von Auramin-Rhodamin etabliert [88, 89]. Da die Leuchtdioden sehr hell sind, kann hierbei auf teure und anfällige Quecksilber-Dampflampen sowie auf eine Dunkelkammer verzichtet werden [80]. Unter Einsatz von Acridin-Orange als Farbstoff könnte diese Methode die Nachteile der konventionellen und der von Kawamoto entwickelten Methode [81, 84, 90] aufwiegen und somit auch für die Malaria-Diagnostik als schnelles und akkurates Verfahren als nützliches Instrument in der täglichen Routine-Diagnostik eingesetzt werden. Diese Methode wurde in der hier beschriebenen Studie untersucht und evaluiert.

### **1.9 Studienziele**

Die durchgeführte Studie untersucht die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie als mögliches Malaria-Diagnostik-Verfahren auf Akkuratheit mittels Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewerten und Übereinstimmung sowie auf die Anwendbarkeit der Technik unter einfachen Bedingungen.

Goldstandard ist der in Giemsa-Lösung gefärbte Dicke Tropfen, der unter Lichtmikroskopen untersucht wird. Allerdings ist dies eine zeitintensive Methode, benötigt erfahrene Untersucher und eine zwei- bis dreimal tägliche sorgfältige Zubereitung der Färbe-Lösung, um gute Ergebnisse zu erzielen. In der Praxis werden diese Bedingungen selten erfüllt, was zu ungenauen Ergebnissen und damit oft zu unsicheren Diagnosen und somit zur Überbehandlung führt. In Zeiten von abnehmender Malaria-Inzidenzen und -Prävalenz wie auch abnehmenden Parasitenlasten, aber schnellen Resistenz-Entwicklungen und teureren Medikamenten ist eine schnelle, leichte und

zuverlässige Diagnostik für die Malaria unabdingbar. Unter einfachen Bedingungen sind kostenintensive Methoden wie die oben beschriebene Polymerase-Kettenreaktion keine sinnvolle Alternative, da in den ländlichen Regionen Afrikas, wo der größte Teil der Malariafälle auftreten, diese Technik aus Kostengründen wie infrastrukturellen Problemen nicht flächendeckend zur Verfügung steht. Des Weiteren ist die PCR eine zeitintensive Methode, deren Ergebnis für eine akute Therapieentscheidung zu spät erhalten wird. Als alternative laborchemische Methode gelten die beschriebenen Schnelltests mittels Immunchromatographie. Diese liefern schnelle und akkurate Ergebnisse und sind bei Tropen-Reisenden sehr beliebt, da sie kein spezielles Training in der Anwendung erfordern. Jedoch sind diese aufgrund ihrer begrenzten Lagerzeiten, des hohen Preises und falsch positiven Ergebnissen noch Wochen nach Ausheilen einer Infektion in endemischen Gebieten bei einer einheimischen Bevölkerung mit vielen Malaria-Kontakten nicht sinnvoll einsetzbar [13, 70].

Als weitere sensitive Methode rückte die Fluoreszenz-Mikroskopie in den Fokus, die durch Adhoc-Färbungen eine Verkürzung der Diagnosezeit ermöglicht [76, 79]. Nachteilig waren auch hier die hohen Kosten in Anschaffung und Unterhalt. Kawamoto entwickelte daher Filteraufsätze für normale Lichtmikroskope, um diese im ländlichen Raum für die Fluoreszenz-Mikroskopie einzusetzen. Aufgrund ihrer geringen Helligkeit waren diese in der Routine jedoch nicht sinnvoll einsetzbar [79, 81-85]. Dieser Nachteil kann durch den Einsatz von hellen LED-Auflicht-Modulen in normalen Lichtmikroskopen aufgewogen werden. Diese Art der Mikroskope wurden erst kürzlich für die Diagnostik der Tuberkulose etabliert [89]. Es ist ein sehr nützliches Instrument für den Einsatz in Gebieten unter einfachen Bedingungen, da Leuchtdioden Strom sparend sind, sehr lange Lebensdauern besitzen und heller leuchten als herkömmliches Fluoreszenz-Auflicht. Dies erspart die kostspielige Installation einer Dunkelkammer, einen bisher bedeutenden Nachteil der Fluoreszenz-Mikroskopie. Zudem ermöglicht die LED-Fluoreszenz-Technik den Einsatz bei Batterie-Nutzung während Stromausfällen oder in Gebieten ohne Stromversorgung. Bereits vorangegangene Studien haben den Nutzen von

Acridinorange in der Malaria-Diagnostik unter Zuhilfenahme konventioneller Fluoreszenzmikroskope gezeigt [79, 81, 84], die allerdings aufgrund der geringen Helligkeit und der hohen Kosten in Anschaffung und Unterhalt als nicht brauchbar für die tägliche Routine-Diagnostik eingestuft worden sind.

Ziel dieser Arbeit war festzustellen, in wieweit die LED-Fluoreszenz-Technik unter Verwendung von Acridinorange eine akkurate Methode für die tägliche Routine-Diagnostik der Malaria unter einfachen Bedingungen darstellt. Hierfür wurde diese Methode hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewerte, Übereinstimmung der Methoden, Präzision und Wiederholbarkeit untersucht. Des Weiteren wurden Werte zur Untersuchungsdauer erhoben und die Kosten der Diagnose geschätzt. Als Vergleichsmethode wurde neben der Lichtmikroskopie als Goldstandard, die herkömmliche Fluoreszenz-Mikroskopie herangezogen. Für die Klärung von in den Methoden diskrepanter Ergebnisse stand die PCR als sensitivste Methode zur Verfügung.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Studienzeit und Studienort

Die Studie wurde in den Monaten September bis Dezember 2009 am medizinischen Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Spitals in Lambaréné in Gabun durchgeführt. Die gabunische Republik liegt am Äquator in Zentralafrika zwischen dem zweiten nördlichen und zweiten südlichen Breitengrad und wird im Norden von den Ländern Kamerun und Äquatorialguinea, im Osten und Süden von der der Republik Kongo und im Westen vom Atlantischen Ozean durch den Golf von Guinea begrenzt. Offizielle Landessprache ist Französisch. Das Land umfasst eine Fläche von 267 667 km<sup>2</sup> bei einer Einwohnerzahl von 1,33 Millionen, wovon 84% in städtischer Umgebung leben [91, 92]. Die Bevölkerung gruppiert sich in über 40 Ethnien, von denen die Fang, Punu und Nzebi über 60% repräsentieren [93]. Etwa 75% der Landesfläche sind von tropischem Regenwald bedeckt, in den östlicheren Gebieten sowie in der südöstlichen Hochebene des Landes mischt sich partielle Feuchtsavanne hinzu. Die Durchschnittstemperatur beträgt 27°C im Jahresmittel bei einer Luftfeuchtigkeit von 80 - 90% und einer Jahresniederschlagshöhe zwischen 1600 mm und 3000 mm, der sich insbesondere auf die große Regenzeit von Januar bis Mai und die kleine Regenzeit von Oktober bis Dezember konzentriert. Während der Monate Juni bis September reduziert sich der Niederschlag auf 35 mm/Monat [35].

Lambaréné ist die Hauptstadt der Provinz «Moyen Ogooué» und viertgrößte Stadt des Landes. Sie liegt 50 km südlich des Äquators und 180 km süd-östlich der Landeshauptstadt Libreville im Inneren des Landes am Ogowe, dem größten Fluss Gabuns. Mit seinen 15 000 Einwohnern stellt es das Zentrum der Region mit seinen 55 000 Einwohnern dar.

Etwa 2 km nördlich des Stadtzentrums liegt das Albert-Schweitzer-Spital, welches sein Namensgeber im Jahre 1913 gründete. An dieser Stelle existiert es seit 1927, 1981 wurde es renoviert [94]. Heute umfasst das Krankenhaus die Abteilungen der Inneren Medizin, der Chirurgie, der Gynäkologie und

---

Geburtshilfe wie der Pädiatrie mit insgesamt 130 Betten in stationärer Versorgung sowie einen ambulanten Bereich. Das an das Spital angegliederte medizinische Forschungslabor (Medical Research Unit; MRU) wurde am 4. April 1981 ins Leben gerufen und unterstand bis 1986 Professor A. Dietrich vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropen- und Schiffskrankheiten in Hamburg als wissenschaftlichem Direktor, bevor diese Funktion 1989 von Professor P. G. Kremsner übernommen wurde. Er steht dem internationalen Labor-Team als wissenschaftlicher Direktor zusammen mit zwei weiteren Ko-Direktoren (Dr. B. Lell und Dr. A. A. Adegnika) bis heute vor: Ärzte, Biologen, medizinisch-technische Assistenten, Studenten und Doktoranden aus unterschiedlichen Ländern arbeiten gemeinsam in Lambaréné; die Mehrheit der Mitarbeiter stammen jedoch aus Gabun und umliegenden afrikanischen Ländern. Forschungsschwerpunkte des Labors sind Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, HIV, Bilharziose aber vor allem die Pathophysiologie, Immunologie, Diagnostik und Therapie der Malaria [94]. Zwischen MRU und dem Albert-Schweitzer-Spital besteht eine intensive Kooperation - insbesondere mit den Abteilungen Pädiatrie und Innere Medizin. Seit 1996 erschienen über 300 Publikationen in medizinischen Fachzeitschriften.



**Abbildung 2-1 Topographische Landkarte von Gabun**  
[http://www.lib.utexas.edu/maps/africa/gabon\\_rel\\_2002.jpg](http://www.lib.utexas.edu/maps/africa/gabon_rel_2002.jpg),

Public Domain, besucht am 28.12.2012

### 2.1.1 Malaria-Transmission in Lambaréné, Gabun

In Gabun stellt die Malaria einen großen Teil der Belastung für das Gesundheitssystem dar. 187 710 Fälle wurden bei einer Gesamtbevölkerung von 1,33 Mio. im Jahre 2008 offiziell registriert. Nach der WHO ist die Malaria mit 29% der Fälle die Haupttodesursache von Kindern zwischen 2 Monaten bis 5 Jahren in Gabun. Auf die Gesamtpopulation bezogen stellt sie nach HIV/AIDS mit 28% die zweithäufigste Todesursache dar. Bezogen auf die disability adjusted life years (DALY) der WHO steht die Malaria auch hier mit 8,2% anteilig an der gesamten Krankheitslast an zweiter Stelle nach HIV/AIDS [8, 95]. Epidemiologische Daten für das Land Gabun aus dem Jahr 1992 zeigen hierbei, dass das Land zu einer Region mit hoher ganzjähriger Transmission zählt. Die Prävalenz wurde im Rahmen einer Studie im Südosten des Landes, in der Region um Franceville, im Jahr 1999 festgestellt. Es wurden Werte von 39,8% bzw. 43,3% bestimmt [96]. Dieselbe Studie weist die Region um Lambaréné als hyperendemisches Gebiet aus. Die Transmissionsrate ist in der kleinen Regenzeit von Oktober bis Dezember besonders hoch, betroffen ist vor allem die Bevölkerung im Alter von 5 bis 14 Jahren [35, 97]. Folgende weitere Daten wurden im Rahmen der Studie von 1992 bezüglich der Prävalenzen der Plasmodien-Arten erhoben. Demnach sind die Malaria-Infektionen prozentual wie folgt auf die Erreger zurückzuführen:

1. *Plasmodium falciparum*: 88,7%
2. *Plasmodium malariae*: 8,0%
3. *Plasmodium ovale*: 0,6%
4. Mischinfektionen: 2,7%
5. *Plasmodium vivax*: nicht untersucht<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Ein Vorkommen wird in der Region nicht erwartet, da die Bevölkerung weitgehend negativ für das Duffy-Antigen bzgl. ihrer Blutgruppenmerkmale ist und somit ein entscheidende Rezeptor für die Entwicklung einer Infektion mit *Plasmodium vivax* fehlt.

Die Hauptvektoren stellen die *Anopheles gambiae* und *Anopheles funestus* dar. Die entomologische Inokulationsrate von Personen ohne Moskitonetz liegt bei circa 50 infektiösen Stichen pro Jahr [35, 97]. Dies entspricht dem gabunischen Mittelwert.

## 2.2 Studiendesign und Studienpopulation

Das Studienprotokoll wurde vom zuständigen regionalen unabhängigen Ethik-Komitee von Lambaréné (CERIL – Comité d'Éthique Régional Indépendent de Lambaréné) positiv beurteilt und die Studie in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki [98], der Richtlinien der „Guten klinischen Praxis“ (Good Clinical Practice, GCP) [99] wie der OECD-Grundsätzen der guten Laborpraxis [100] durchgeführt. Zwischen September 2009 und Dezember 2009 wurden 210 Patienten rekrutiert, die sich im Albert-Schweitzer-Spital vorstellten und angaben, in den letzten 24 Stunden unter Fieber gelitten zu haben. Es wurden Patienten jeden Alters und jeder Herkunft eingeschlossen, weitere Einschluss- oder Ausschluss-Kriterien lagen nicht vor. Die Auswahl der Proben wurde von einer unabhängigen Person vorgenommen, um auf das angestrebte Verhältnis gleichmäßiger Verteilung zwischen positiven und negativen Proben zu gelangen; hierfür lagen nicht in die Studie einbezogene Laborergebnisse aus dem Albert-Schweitzer-Spital vor. Persönliche und anamnestische Daten sowie die von den behandelnden Ärzten gestellten Diagnosen der in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden erhoben.

## 2.3 Diagnostische Materialien und Methoden

Von jedem Studienteilnehmer wurden ca. 3 ml Blut in mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzten Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und ein Blutbild erstellt (ABX Micros 60 OT, ABX Diagnostics, France). Daraufhin wurde das Blut in das medizinische Forschungslabor transportiert, um direkt anschließend die verschiedenen Studienpräparate anzufertigen:

## 2.3.1 Mikroskopische Präparate

### 2.3.1.1 Anfertigung der Präparate

Zweihundertfünfzig Mikroliter des EDTA-Blutes wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um dieses nach Abschluss der Mikroskopie-Experimente für die Quantitative Polymerase Kettenreaktion zu verwenden. Anschließend wurden die Studienpräparate wie im Folgenden beschrieben für die Mikroskopie angefertigt.

#### 2.3.1.1.1 Giemsa-Präparate

Die Dicken Tropfen in Giemsa-Färbung [14] wurden nach den Richtlinien der WHO angefertigt und ausgewertet [101]:

Etwa 5  $\mu\text{l}$  des EDTA-Blutes wurden auf einen Objektträger in Tropfenform gleichmäßig mit einer Mikropipette (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) aufgetragen, die Objektträger im Inkubator ( $40^{\circ}\text{C}$  Melag, typ 405;  $55^{\circ}\text{C}$ ) getrocknet und anschließend in einer 20% Giemsa-Lösung (Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie, Merck KGaA, Darmstadt), die zwei bis dreimal täglich neu mit Pufferlösung nach Weise (pH 7,20, ( $\text{H}_2\text{O}$  dest), Merck KGaA, Darmstadt) angesetzt wurde, 30 Minuten lang gefärbt und wiederum getrocknet. Daraufhin wurden die Objektträger mit Hilfe von Immersionsöl auf einem Standard-Durchlicht-Mikroskop (LM) (Olympus CH 30) bei einer 1000-fachen Vergrößerung ausgewertet.

#### 2.3.1.1.2 Acridinorange-Präparate

Acridinorange [AO] ist ein Farbstoff, der verwendet wird, um Nukleinsäuren anzufärben. AO interagiert mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) durch Interkalierung und elektrostatische Interaktion. Mit AO interkalierte DNA fluoresziert grün (525 nm), während mit AO

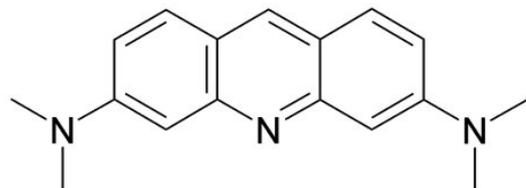


Abbildung 2-2 Strukturformel von Acridinorange

interkalierte RNA rot (>630 nm) fluoresziert [102-104]. In Blutpräparaten können Nukleinsäure beinhaltende Zellen wie Leukozyten, Retikulozyten oder mit Parasiten infizierte Erythrozyten klar dargestellt werden.

Für die vorliegende Studie wurde wöchentlich eine Acridinorange-Stammlösung in der Konzentration 1 mg/ml in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) angesetzt, steril unter einer Abzugshaube gefiltert (Millex GS Syringe driven Filter Unit 0,22 µm MF Millipore MCE Membrane, Carrighwohill, Co. Cork, Irland) und an einem dunklen Ort aufbewahrt. Als Grundsubstanz diente Acridinorange in Pulverform (Acridinorange für die Mikroskopie, C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>CL<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Zn, MERCK, Darmstadt).

Für die Anfertigung der Präparate für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden 8 µl des EDTA-Blutes mit 2 µl der Acridinorange Lösung in einem Reagenzgefäß (0,5 ml, PP, Sarstedt, Nümbrecht) während drei Minuten inkubiert, im Anschluss auf einen Objektträger mit einer Mikropipette (LabMate 2 - 20 µl, ABIMED, Langenfeld) aufgetragen, mit einem Deckblättchen (22 mm x 22 mm) abgedeckt, dieses mit Schnelleinschlussmittel (Eukitt Schnelleinschlussmittel für die Mikroskopie, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verschlossen und direkt unter dem Mikroskop untersucht. An Mikroskopen wurden ein konventionelles Quecksilber-Dampflampen-Fluoreszenz-Mikroskop in der Dunkelkammer (uvFM) (Nikon Optiphot-2, Filter: B2A, 470 nm) bei 1 000-facher Vergrößerung und ein Leuchtdioden (LED)-Fluoreszenz-Mikroskop (ledFM) (Zeiss PrimoStar iLED, blaue Leuchtdiode 455 nm) bei normalem Tageslicht bei 400-facher und 1000-facher Vergrößerung eingesetzt. Unabhängig von der Methode wurde bei 1000-facher Vergrößerung vor der Betrachtung Immersionsöl auf den Objektträger aufgetragen.

### **2.3.1.2 Bestimmung der Parasitämie**

In allen drei mikroskopischen Methoden wurde die Parasitämie bestimmt, indem in direkt aufeinander folgenden Gesichtsfeldern 200 Leukozyten sowie die in diesen Feldern vorkommenden Parasiten gezählt wurden. Waren bis zu diesem Zeitpunkt bereits mehr als 10 Parasiten detektiert, wurde die Parasitämie wie unten stehend berechnet. Andernfalls mussten weitere Gesichtsfelder

ausgewertet werden, bis eine Gesamtzahl von 500 Leukozyten erreicht war. Waren nach dem Zählen von 500 Leukozyten keine Plasmodien entdeckt worden, wurde der Objektträger als parasitenfrei gewertet. Im anderen Fall wurde die parasitäre Blutbelastung pro Mikroliter mit der folgenden Formel errechnet [105]:

$$\text{Parasitämie / } \mu\text{l} = \frac{\text{(gezählte Parasiten / gezählte Leukozyten)}}{\text{* Leukozytenzahl / } \mu\text{l im Blut}}$$

Alle Präparate wurden von zwei unabhängigen verblindeten Untersuchern gelesen. Dies bedeutet, dass den Untersuchern keine Informationen über die klinischen Symptome des dem vorliegenden Präparat zuzuordnenden Patienten oder der Ergebnisse der Untersuchungen aus dem Albert-Schweitzer-Spital und des jeweils anderen Untersuchers vorlagen. Aus den Ergebnissen der Auszählung der beiden Untersucher wurde das arithmetische Mittel als endgültige Parasitämie in der jeweiligen Methode gebildet; im Falle geringer Übereinstimmung (mehr als 50% Abweichung vom höheren Ergebnis, oder unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich Positivität), wurde eine Lesung eines erfahrenen unabhängigen dritten Lesers durchgeführt. Die zwei übereinstimmenderen Resultate wurden für die Bildung des arithmetischen Mittels und somit des Endergebnisses herangezogen.

### 2.3.1.3 Zeitmessungen

Alle Zeiten wurden mit Stoppuhren, die die Zeiten auf Hundertstel-Sekunden genau angeben, gemessen. Per Definition betrug die Lesezeit eines Objektträgers den gemessenen Zeitraum von Beginn der Lesung nach Einspannen des Objektträgers an bis hin zur Kalkulation der definitiven Parasitämie nach oben erwähnter Formel. Die Gesamtzeit umfasst den Zeitraum von Beginn der Präparation des Objektträgers bis hin zur Kalkulation der definitiven Parasitämie; hierbei wurde zu der gemessenen Zeit der Präparation der Mittelwert der Lesezeit der zwei unabhängigen Leser hinzuaddiert. Die Parasitendetektionszeit umfasst den Zeitraum, der vom

Beginn der Lesung bis zu dem Moment verging, in dem der erste Parasit auf Objektträger eindeutig identifiziert wurde. Auch hier wurde das arithmetische Mittel aus den beiden Lesungen gebildet.

#### **2.3.1.4 Präzisionsbestimmung**

Um die Präzision der ledFM im Vergleich zur LM zu bestimmen, wurden zwei Serien von Präparaten mit je einer hohen, mittleren und niedrigen Parasitämie nach oben beschriebenen Methoden erstellt. Die Präparate einer Serie wurden mit AO gefärbt, die der Zweiten mittels Giemsa-Färbung. Je zehn Labormitarbeiter lasen die Giemsa-Serie nach der oben dargestellten Methode in der Lichtmikroskopie. Des Weiteren lasen zehn Labormitarbeiter die AO-Serie im ledFM (1000x) nach einer kurzen Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie mit der Dauer von 30 Minuten. Dabei hatten nur drei der Teilnehmer vorher je mit einem Fluoreszenzmikroskop gearbeitet. Für die Bestimmung der Wiederholbarkeit lasen fünf dieser zehn Untersucher ein weiteres Mal am Folgetag drei neu angefertigte Präparate Blutproben aus derselben Serie unter dem ledFM (1000x) ohne zu wissen, dass es sich dabei um dieselben Proben handelte. Hierbei wurde das Blut in EDTA-Röhrchen bis zum Folgetag kühl (4°C) aufbewahrt.

#### **2.3.1.5 Fragebogen**

Nach Abschluss der Studie wurde den zwei ständigen Lesern der Studienpräparate ein Fragebogen (siehe Anhang) vorgelegt, um die Methoden der LM, uvFM und ledFM miteinander subjektiv zu vergleichen. Dabei wurde neben der Erfahrung in der Mikroskopie in Jahren folgende Größen auf einer Skala von 1 bis 10 erfragt:

- Geschätzte Fähigkeit in der Mikroskopie (generell)
- Fähigkeit in der jeweiligen Methode
- Schnelligkeit der Methode (generell)
  - Bzgl. der Parasiten-Detektion
- Erlernbarkeit der Technik

- Sinnvoller Einsatz in der täglichen Routine-Arbeit
- Ermüdung (0 = sehr ermüdend)
- Klares Bild (generell im Gesichtsfeld)
- Klarer Aspekt der Parasiten
- Sicherheit in der Diagnostik
- Differenzierung der verschiedenen Plasmodien-Arten

### **2.3.2 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

Eine weitere in dieser Studie angewandte Methode zur Parasiten-Bestimmung war die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). In unserem Experiment war diese Auswertungsmethode Fällen von nicht übereinstimmenden mikroskopischen Ergebnissen vorbehalten. Zur Zeit der Versuche befand sich zudem die qRT-PCR in der Etablierungsphase, weshalb wir sie als experimentelle Methode nutzten und damit nur die Positivität bzw. Negativität der Blutproben als relevante Ergebnisse berücksichtigten, ohne Rückschlüsse auf die tatsächliche Parasitämie zu ziehen. Die Durchführung fand wie im Folgenden dargestellt statt:

#### **2.3.2.1 Prinzip der qRT-PCR**

Die qRT-PCR basiert auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von DNA unter Zuhilfenahme des Enzym der DNA-Polymerase, die 1985 zum ersten Mal als DNA-Syntheseverfahren beschrieben worden ist [106, 107]. Kary Mullis und seine Arbeitsgruppe wurden hierfür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

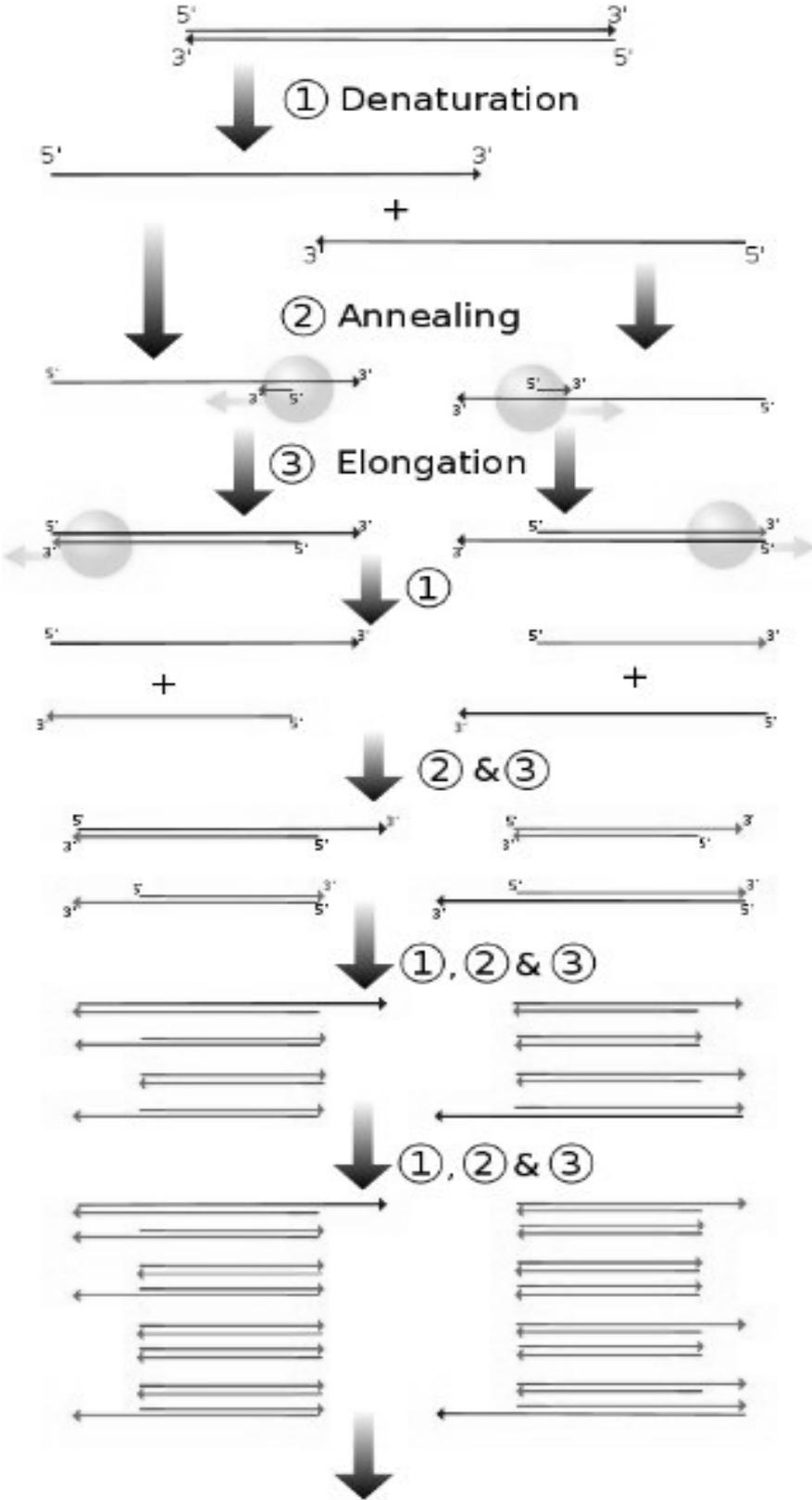
Das Enzym der DNA-Polymerase komplettiert hierbei einen DNA-Einzelstrang nach Denaturierung der Doppelhelix und Anlage eines kurzen komplementären (18 - 30 Basenpaare [bp]) Basenfolge, des so genannten Primers, doppelsträngig, sofern genügend Deoxynukleosidtriphosphate (dNTP) und der essentielle Kofaktor  $MgCl_2$  vorhanden sind. Der Primer enthält an seinem 3'-Ende eine Hydroxygruppe, welches als Startpunkt der DNA-Polymerase für die

---

erste Verknüpfungsreaktion dient. Neben dem Enzym der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq Polymerase) braucht man Primer, die sich an das gewünschte DNA-Segment anlegen, dNTPs als Substrat für die Polymerase, eine Pufferlösung und Wasser. Eine solche einmalige parallel ablaufende Vervielfältigung nennt sich Zyklus; da jeder folgende Zyklus die Produkte des vorangegangenen zur Basis hat, ist es eine Kettenreaktion. Mithilfe dieser Methode kann jede beliebige Sequenz amplifiziert werden sofern die Abfolge der Basenpaare bekannt ist.

Jeder Zyklus der Vervielfältigung besteht aus drei Phasen (siehe Abb. 2-3): Während der Denaturierungsphase wird das Gemisch auf 95°C erhitzt, um die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen zu brechen; es entstehen Einzelstränge. Manche Polymerasen benötigen zur Aktivierung eine verlängerte Erhitzungsphase von etwa zehn Minuten. Im weiteren Verlauf wird das Gemisch auf 55 - 65°C, die optimale Temperatur zur Anlagerung der Primer-Sequenzen, abgekühlt. Diese Temperatur ist durch die Länge und Eigenschaft der Primer bestimmt. Bei zu heißen Temperaturen können die Primer aufgrund ihrer thermischen Bewegung sich nicht ordnungsgemäß anlegen, bei zu kühlen Temperaturen hingegen wird die Anlagerung weniger spezifisch vollzogen. Im nächsten Schritt folgt die Elongation durch die DNA-Polymerase bei 70°C vom 3'-Ende des Primers aus. Diese Zyklen werden so oft wiederholt, bis eine detektierbare Menge von PCR vorhanden ist. Dabei entstehen während jedes Zyklus exponentiell mehr Produkte. Bei Endpunkt-PCRs wird das Amplikon in der Regel mithilfe einer Matrix (z.B. Agarose oder Polyacrylamid) in einem elektrischen Feld aufgetrennt und mittels Fluoreszenz oder Radioaktivität dargestellt.

Um Verunreinigungen zu vermeiden muss die DNA vor der PCR üblicherweise extrahiert und aufgereinigt. Dies geschieht durch Lyse der Zellen, die DNA enthalten sowie durch den Einsatz diverser Auswaschpuffer.



Exponential growth of short product

Abbildung 2-3 Polymerase Kettenreaktion  
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:PCR.svg>, Public Domain, besucht am 28.12.2012

Während die herkömmliche PCR nur qualitative Aussagen erlaubt, wurde mit der qRT-PCR ein Verfahren entwickelt, mit dem sich Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der DNA schließen lassen. Sie ist für die quantitative Nukleinsäure-Analysen fest etabliert [108]. Erstmals wurde sie 1992 von Higuchi [109] beschrieben, wobei die Technik der DNA-Detektion durch Fluoreszenzfarbstoff-Markierung bereits in den Achtziger Jahren bekannt geworden war [73, 110].

Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass während der Vervielfältigung zeitgleich eine Messung der Fluoreszenz stattfindet; daher auch der Name der Echtzeit-PCR. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge der vervielfältigten DNA-Sequenz an; erstmalig als positiv gilt das Signal, sobald es den zehnfachen Wert des Grundrauschens übersteigt. Durch das Erstellen einer Standardkurve mit bekannter Konzentration der Ziel-DNA kann die ursprüngliche DNA-Menge quantitativ bestimmt werden.

Als Fluorophor zur Quantifizierung der DNA stehen mehrere Moleküle zur Verfügung: die einfachste unter ihnen ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen wie Ethidiumbromid [111, 112] oder SYBR Green I [113, 114]. Diese Farbstoffe interkalieren in doppelsträngige DNA, die Fluoreszenz steigt mit jedem Zyklus. Sie besitzen allerdings keine Spezifität für die Ziel-DNA (d.h. jede in der Reaktion auftretende doppelsträngige DNA wird gefärbt), die nur durch eine Schmelzkurvenanalyse ausgeglichen werden kann. Des Weiteren ermöglichen Sie keine Multiplex-qRT-PCR, d.h. das gleichzeitige Detektieren zweier unabhängiger Sequenzen.

Dies ist mit den so genannten FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Sonden möglich. Diese beruhen auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer [115]. Hierbei wird die Energie eines angeregten Farbstoffes, dem Donor, auf einen zweiten Farbstoff, den Akzeptor übertragen, dessen Emission gemessen werden kann. Die Energie wird bei diesem Prinzip strahlenfrei und somit nicht über Photonen ausgetauscht. Die Emission des Donors ist abhängig von der Entfernung des Akzeptors. Vergrößert sich die Distanz zwischen den beiden, verringert sich dieser Transfer, die Emission des Akzeptors verringert sich und es kommt zur messbaren Emission der Wellenlänge des Donors.

Somit kann dieses Prinzip als sogenanntes optisches Nanometermaß eingesetzt werden. In unserem Experiment wurde als Akzeptor ein nicht fluoreszierender Auslöcher eingesetzt, der die transferierte Energie aufnimmt, aber keine Emission abgibt (Abb. 2-4).

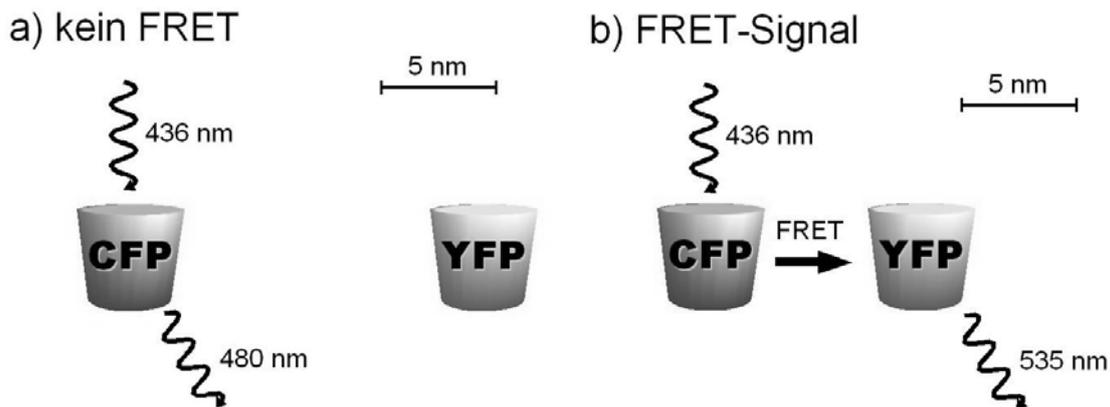


Abbildung 2-4 FRET-Effekt:

CFP ist in diesem Beispiel der Donor, YFP der Akzeptor; in unserer Studie wurden nicht fluoreszierende Auslöcher als Akzeptoren eingesetzt

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:FRET.png>, besucht am 26.04.2012

Folgende FRET-Sonden werden bei der qRT-PCR häufig eingesetzt:

#### I. Hybridisierungssonden (Light-Cycler-Probes)

Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des Förster-Resonanz-Energie-Transfers in der qRT-PCR ist der Einsatz von Hybridisierungssonden: Zwei Oligonukleotide, die sich nebeneinander der Zielsequenz anlagern, werden mit einem Akzeptor bzw. einem dazu gehörigen Donor markiert. Sobald sich diese im Rahmen des *Annealing* der Zielsequenz in einer für den FRET ausreichende Nähe anlagern, verändert sich die Emission vom Spektrum des Donors hin zum Spektrum des Akzeptors. (Abb. 2-5c)

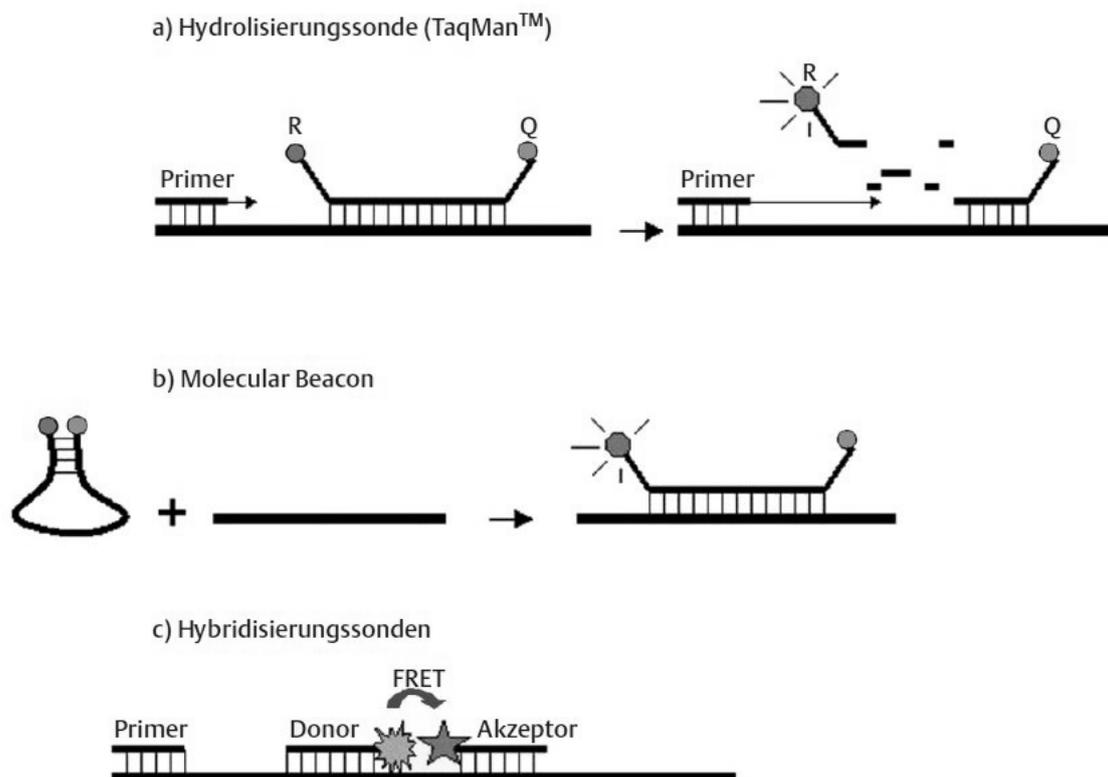
#### II. Taqman-Hydrolyse-Sonden

Eine weitere Möglichkeit der Nutzung des FRET ist der Einsatz der Taqman-Hydrolyse-Sonden, die erstmals 1991 beschrieben worden waren [116]: Die Taqman-Sonde ist am 3'-Ende mit einem Donor-Fluoreszenz-Farbstoff und am 5'-Ende mit einem Quencher markiert. Der Quencher ist ein Akzeptor, der jedoch keine eigene Emission besitzt; er wird auch als

Dark Quencher bezeichnet, da er die Fluoreszenz auslöscht. Wenn die Taq-Polymerase, die zugleich eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, den Donor am 5'-Ende entfernt, bewegt sich der Donor vom Quencher weg und nach dem Prinzip des FRET kann eine steigende Donor-Frequenz gemessen werden. (Abb. 2-5a)

### III. Molecular Beacons

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Molecular Beacons. Dies sind Oligonukleotide in einer Haarnadelstruktur, die an ihren Enden sowohl Donor wie Quencher enthalten. Durch das Annealing entfernen sich Donor und Quencher, es kommt zum Anstieg der Fluoreszenz der Donor-Frequenz. (Abb. 2-5b)



**Abbildung 2-5 FRET-Sonden in der Real-Time PCR**

Bianca Holzapfel LW: Die quantitative Real-Time-PCR. *Biologie unserer Zeit* 2007, Band 37.

In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau wurden TaqMan-Hydrolyse-Sonden im Sinne von Minor Groove Binding (MGB) Sonden eingesetzt. MGB-Sonden haben eine höhere Stabilität in der Anlagerung an den DNA-Einzelstrang;

insbesondere bei hoher Variabilität und *Mismatch* stabilisieren sie den neu entstandenen Doppelstrang. Dadurch können kürzere Sonden eingesetzt werden, die dennoch eine hohe Spezifität besitzen [117-119].

Die Fluoreszenz wird während jedes Zyklus gemessen. Erst wenn die Fluoreszenz-Emission das Zehnfache des Grundrauschens übersteigt, gilt sie als positiv. Dieser Wert wird *ct-Wert (Cycle threshold)* genannt und wird in Zyklen angegeben. Ct-Werte zweier Proben sind hierdurch vergleichbar [108, 120-122]. Da sich die qRT-PCR noch in der Etablierungsphase befand und somit als experimentelle Methode genutzt wurde, werteten wir in unserem Versuchsaufbau nur die Positivität bzw. Negativität der in den mikroskopischen Präparaten nicht übereinstimmender Blutproben mittels qRT-PCR aus, ohne die quantitative Analyse zu berücksichtigen.

### **2.3.2.2 PCR in der Diagnostik von Malaria**

Die PCR wurde für den Einsatz zur Diagnostik von Malaria in den Neunziger Jahren zum ersten Mal in Erwägung gezogen [72] und etablierte sich wenig später im Forschungsbereich. Sie gilt als besonders sensitive Methode [77, 123], die durch den Einsatz spezifischer Primer zugleich eine sichere Identifikation der Arten zulässt [77]. Andererseits wurde bereits beschrieben, dass PCR-Analysen in einigen Fällen Proben mit hoher Parasiten-Last nicht als positiv erkannt haben [124, 125]. Sie ist zudem eine teure, schwer standardisierbare und zeitintensive Methode [76], die sich nicht für die tägliche Routinediagnostik in Gegenden mit geringer Ausstattung eignet und daher ihr Einsatzgebiet mehr in der Forschung findet.

### **2.3.2.3 Durchführung der qRT-PCR**

#### **2.3.2.3.1 DNA – Extraktion aus den Blutproben**

Das bei -80°C eingefrorene EDTA-Blut wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Durch die Bildung von Kristallen kam es bereits beim Einfrieren zur Erythrozytolyse. Die aufgetauten flüssigen Proben wurden im Vortex Mixer

(NeoLab, Gemmy, Taiwan) gemischt, um anschließend die gleichmäßig verteilte parasitäre DNA mithilfe eines vorbereiteten Kits (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Hilden) unter sterilen Bedingungen zu extrahieren. Die hierfür benötigten Materialien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

<b>Tabelle 2.1 Materialien für die DNA-Extraktion</b>	
<b>Pipetten</b>	<b>Mikropipetten, Karl Roth GmbH, Karlsruhe</b>
<b>Pipettenspitzen</b>	<b>safeseal tips premium, Biozym scientific GmbH, hess. Oldendorf</b>
<b>Reagiergefäß</b>	<b>1.5 ml, Eppendorf, Deutschland</b>
<b>Auffanggefäß</b>	<b>2 ml, Qiagen, Hilden</b>
<b>Spin Columns</b>	<b>QIAamp Mini Spin Column, Qiagen, Hilden</b>
<b>Pufferlösungen</b>	<b>AL Lysepuffer, Qiagen, Hilden, versetzt mit PhHV (1/100 in PBS) AW1 Waschpuffer, Qiagen, Hilden AW2 Waschpuffer, Qiagen, Hilden AE Elutionspuffer, Qiagen, Hilden</b>
<b>Proteinkinase</b>	<b>Proteinkinase K, Qiagen, Hilden</b>
<b>Ethanol</b>	<b>Medical Research Unit, Lambaréné, Gabon</b>
<b>Vortex Mixer</b>	<b>NeoLab, Gemmy, Taiwan</b>
<b>Trockenbad</b>	<b>Dig Dry Bath, Labnet intern. Inc., UK</b>
<b>Zentrifuge</b>	<b>Heraeus Pico 17 Centrifuge, Heraeus, Hanau</b>

Das Prinzip der Methode beruht darauf, die Proteine einer 200 µl Vollblutprobe durch Zugabe der Proteinase in einem Reagiergefäß (1,5 ml) zu zerschneiden und zu lösen. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer werden die Proben bei 55°C im Trockenbad 10 Minuten lang inkubiert. Dem Lysepuffer ist der Phocin Herpes Virus 1 beigelegt, welcher als Kontrolle der Extraktion sowie der die PCR selbst dient. Die Primer und Probes zu diesem Virus werden jedem Ansatz beigelegt. Auf diese Art und Weise kann auch bei negativem Ergebnis hinsichtlich der zu überprüfenden Substanz sichergestellt werden, dass die Extraktion erfolgreich von statten ging und die PCR nicht inhibiert war. Erst hierdurch können die Ergebnisse validiert werden. Im Anschluss an die Inkubationszeit wird Ethanol hinzu gegeben, um die DNA partiell zu fällen. Die Lösung wird auf Filter in Spin Columns pipettiert und in ein Auffanggefäß

zentrifugiert (9600 g). Die im Filter verbliebene DNA wird mit zwei unterschiedlichen Puffern (AW1 / AW2 je 500 µl) gespült und wiederum zentrifugiert (9600 g bis 17 200 g) und schließlich durch eine Lösungspuffer (AE, 200 µl) aus dem Filter in ein frisches Auffanggefäß ausgewaschen (Zentrifuge 6200 g). Somit ist die parasitäre DNA in einer ähnlichen Konzentration wie in der Ausgangskonzentration vorhanden. Das Gemisch wurde bis zu Analyse per quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (rtPCR) bei 4°C dunkel aufbewahrt.

### 2.3.2.3.2 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR

Im Vorfeld der Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde der PCR-Ansatz aus folgenden Komponenten und Konzentration hergestellt:

Tabelle 2.2 PCR-Mix für rtPCR			
Hotstar TaqMastermix: HotStar Taq-DNA-Polymerase, PCR-Puffer, Trinukleotidtrisphosphate			
	Original-Konzentration	Konzentration für den Ansatz	in µl
Hotstar TaqMastermix (Qiagen, Hilden)	2 x		12,50
MgCl <sub>2</sub> (Qiagen, Hilden)	25 mM		3,50
BSA (Bovine Serum Albumin, Roche, Mannheim)	5 mg/ml		0,50
H <sub>2</sub> O (RNase frei, Qiagen, Hilden)			1,55
Primer PhHV267s forward	5 µM	60 nM	0,30
Primer PhHV337as reverse	5 µM	60 nM	0,30
Sonde PhHV305tq	10 µM	100 nM Cy5	0,25
Primer Plas1047F	5 µM	60 nM	0,30
Primer Plas1718R	5 µM	60 nM	0,30
Sonde Pfa1141MGB	10 µM	100 nM (FAM)	0,25
Sonde Pma189MGB	10 µM	100 nM (VIC)	0,25
Total			20,00

Es wurden gemeinsame Primer für die zwei häufigsten Erreger der Region um Lambaréné, *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* [96], verwendet (Tab. 2.3). Es wurde je eine Sequenz in 5'-3'-Richtung, ein sogenannter „Forward-Primer“ (F), wie in 3'-5'-Richtung, ein so genannter „Reverse-Primer“ (R), verwendet. Um die Sonden (Probes) unterscheiden zu können, wurden sie mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert: die Sonde für *Plasmodium falciparum* am 5'-Ende mit dem Fluoreszenz-Reporter FAM (Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein, Anregung 488 nm, Emission 518 nm) sowie am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszierenden Auslöcher (NFQ). Die Sonde für *Plasmodium malariae* wurde am 5'-Ende mit dem Fluoreszenz-Reporter VIC (Applied Biosystems, Foster City, California, USA; Anregung 515 nm, Emission 545 nm) sowie am 3'-Ende gleichermaßen mit einem nicht fluoreszierenden Auslöcher (NFQ) markiert. Durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq (*Thermus aquaticus*)-Polymerase kommt es zu Abspaltung des Reporters und in Folge dessen zur Fluoreszenz-Emission bei 518 nm bzw. 545 nm. Es wurden Minor-Groove-Binding (MGB)-Sonden verwendet [119]. Als interne Kontrolle wurden wie oben erwähnt zusätzlich Primer - in 3' wie in 5' Richtung - und Sonden zur Detektion des Phocine Herpes Virus 1 verwendet, um Inhibitionen der PCR oder Extraktionsfehler anzuzeigen [126, 127]. Die Sonde für den Phocine Herpes Virus wurde am 5'-Ende mit Cy5 (Cyanine 5, Anregung 650 nm, Emission 670 nm) sowie am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszierenden Auslöcher markiert.

**Tabelle 2.3 Primer & Sonden für die qRT-PCR von Operon**

<b>Primer PhHV267s</b>	<b>5' – GGGCGAATCACAGATTGAATC – 3'</b>
<b>Primer PhHV337as</b>	<b>5' – GCGGTTGGAAACGTACCAA – 3'</b>
<b>Sonde PhHV305tq</b>	<b>Cy5- 5' - TTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC - 3' NFQ</b>
<b>Primer Plas1047F</b>	<b>5' – GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA – 3'</b>
<b>Primer Plas1718R</b>	<b>5' – AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA – 3'</b>
<b>Sonde Pfal1141MGB</b>	<b>FAM - 5'-CTTTCGAGGTGACTTTTAGAT-3' - MGB NFQ</b>
<b>Sonde Pmal89MGB</b>	<b>VIC- 5'-AGCTATCTAAAAGAAACTCAT-3' - MGB NFQ</b>

---

Der Ansatz (20 µl) wurde, wie in Tabelle 2.2 beschrieben, im Vortex-Mixer gemischt und anschließend je 5 µl DNA aus der Blutprobenextraktion hinzugefügt. Es folgte die vollautomatische Auswertung in einer 72-Lochplatte mittels quantitativer Real-Time-PCR mit der Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australien), welche sich zur Minimierung der Kontamination in einem getrennten Raum befand: einer initialen Aktivierungsphase – dem sogenannten Heißstart zur Aktivierung der Taq-Polymerase – von 15 Minuten bei 95°C folgten die Zyklen der Kettenreaktion: Denaturierung der DNA während einer Minute bei 95°C, Hybridisierung des Primers an die DNA-Einzelstränge während einer Minute bei 60°C. Daraufhin kommt es zur Elongationsphase über eine Minute bei 72°C, in der die Taq-Polymerase aktiv ist und die dNTPs in 3' Richtung an den Primer anbaut. Hierbei werden auch Hydrolysesonden verwendet. Bei Einbau der Sonden wird durch 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase der Auslöcher entfernt. Es kommt zur Fluoreszenz mit der Wellenlänge des Farbstoffes. In unserem Experiment VIC® (545 nm) für *Plasmodium malariae*-DNA, FAM (518 nm) für *Plasmodium falciparum*-DNA und Cy5 (670 nm) für den *Phocine Herpes Virus*. Am Ende der PCR Zyklen steht eine finale Extensionsphase von zehn Minuten bei 72°C. Während der Elongationphasen wird jeweils die Intensität der fluoreszierenden Signale. Sobald das Emissionssignal einer der Farbstoffe das Zehnfache des Rauschens übersteigt, gilt die Probe als positiv. Es wurden 50 Zyklen durchgeführt.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Fallbericht-Formblätter auf Papier eingetragen und anschließend in eine elektronische Datenbank übertragen und in das Programm SPSS 16.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) und R, Version 2.12.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Auckland, Neuseeland) eingetragen, um folgende statistische Analysen vorzunehmen:

- **Deskriptive Statistik** wurde zur Beschreibung der Studienpopulation angewandt, um die Studien- sowie die Kontrollgruppe untereinander zu vergleichen. Hierbei wurden die Charakteristika Geschlecht und Alter der Studienteilnehmer wie der zugeordnete medizinische Fachbereich, die angegebenen Symptome und die durch den behandelnden Arzt gestellte Diagnose betrachtet. An Blutwerten gingen die Anzahl weißer und roter Blutkörperchen, der Hämatokrit-Wert, der Hämoglobin-Wert und die Anzahl der Blutplättchen mit ein.

- **Sensitivität, Spezifität, positive und negative Vorhersagewerte**

Die Sensitivität eines diagnostischen Testverfahrens gibt an, wie viele der erkrankten Patienten einer Krankheit durch den Test tatsächlich erkannt werden. Definiert ist sie als Quotient aus richtig positiven Testergebnisse und der Summe aus der richtig positiven und falsch negativen Testergebnisse. Hierbei wurde die Lichtmikroskopie für die Auswertung als Goldstandard gewählt, an der die anderen diagnostischen Testverfahren gemessen wurden.

Die Spezifität eines diagnostischen Testverfahrens gibt an, wie viele der gesunden Testteilnehmer, die nicht an der untersuchten Krankheit leiden, durch den Test tatsächlich als gesund erkannt werden. Definiert ist sie als Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Testergebnissen. Auch hier wurde die Lichtmikroskopie als Standard ausgewählt.

Der positive Vorhersagewert gibt eine Einschätzung der Aussagekraft eines diagnostischen Testverfahrens. Er gibt an, wie viele Personen

tatsächlich krank sind, bei denen eine Krankheit mittels eines Testverfahrens ermittelt wurde. Definiert ist er als Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Testergebnissen.

Der negative Vorhersagewert gibt an, wie viele Personen tatsächlich gesund sind, die mittels eines Testverfahrens bzgl. einer Erkrankung als gesund ermittelt wurden. Definiert ist er als Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus richtig negativen und falsch negativen Testergebnissen.

Die korrigierten Vorhersagewerte beziehen die Prävalenz der getesteten Gruppe mit ein. In dem beschriebenen Fall ist dies die Prävalenz der an Malaria Erkrankten Personen, die sich zur Diagnostik im Alberschweitzer-Spital aufgrund von Fieber, das über 24 Stunden besteht, vorstellten [128]. Dieser Wert ist diesbezüglich sehr aussagekräftig, inwieweit der Einsatz eines Testverfahrens in einem Gebiet mit einer gewissen Prävalenz sinnvoll ist.

Bedeutender Nachteil einer diagnostischen Studie ist die Notwendigkeit eines Goldstandards, wodurch eine Beurteilung der als Referenz festgelegten Methode nicht sicher gelingen kann, da sich die zu beurteilenden Methoden nur an dieser messen können. Aus diesem Grunde wurden die oben genannten Parameter nochmals unter Berücksichtigung der PCR-Ergebnisse bezüglich der diskordanten Resultate erhoben. Für diese Resultate wurde die PCR als Goldstandard gesetzt.

- Der **Cohen's Kappa Test** zur Bestimmung des Übereinstimmungskoeffizienten (Kappa-Koeffizienten) [129] misst die Interrater-Reliabilität zweier verbundener kategorialer Stichproben bzw. Methoden, um den Grad der Übereinstimmung der beiden Methoden zu quantifizieren. Hierbei ist die Höhe der erfassten Parasitämie nicht von Bedeutung.

- 
- **Bland-Altman-Diagramm** [130] als graphische Darstellung zeigt die Übereinstimmung zweier Testverfahren, bei die Differenzen der beiden Messmethoden gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen werden. Hierbei spielt die erfasste Parasitämie eine große Rolle.
  - **Kaplan-Meier-Diagramm** dient als grafische Darstellung des Eintrittes eines Ereignisses bei einer Studiengruppe über die Zeit. Häufig wird es zur Darstellung von Überlebenskurven eingesetzt. Im Fall der beschriebenen Studie zeigt es graphisch den zeitlichen Eintritt des Ereignisses der Detektion des ersten Parasiten im untersuchten Blut und damit dem Hinweis auf Positivität einer Probe. Der Log-Rank-Test ist ein nichtparametrischer Test für den Vergleich des Zeitpunktes des Eintrittes eines Ereignisses zweier unverbundener Stichproben. Er zeigt in Falle der beschriebenen Studie an, ob eine Methode eine signifikant kürzere Parasiten-Detektionszeit aufweisen kann [131].
  - Der **Box-Whiskers-Plot** dient in dieser Studie zur Darstellung der Varianz der Präzision der Ergebnisse unterschiedlicher Untersucher in der Lichtmikroskopie und in der LED-Fluoreszenzmikroskopie. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Sie wird also durch das obere und das untere Quartil begrenzt. Durch die Whiskers werden die außerhalb der Box liegenden Werte dargestellt, die 80% der Daten repräsentieren. Sie werden durch das obere und untere Zehntel begrenzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Studienpopulation

Es wurden insgesamt 210 Patienten aus den Aufnahmestationen des Albert-Schweitzer-Spital in die Studie aufgenommen. Alle gaben an, in den letzten 24 Stunden unter Fieber gelitten zu haben. Von diesen waren 72 männlich, 122 weiblich, von 16 Teilnehmer fehlen die Angaben. Das arithmetische Mittel des Alters betrug 19,5 Jahre bei einer Altersspanne von 1 bis 87 Jahren. Insgesamt wurden 85 Patienten in der Pädiatrie eingeschlossen, 33 in der Gynäkologie und 87 in der gemeinsamen Poliklinik aus Chirurgie und Innerer Medizin; von fünf Studienteilnehmern gibt es keine Angabe. Der größte Anteil der positiv getesteten Teilnehmer (62,1 %) kam aus der Pädiatrie (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1 Geschlecht, Alter und Station der Population

		positive Population	negative Population	Gesamt-population
<b>Geschlecht</b>	männlich n (%)	41 (39,8)	31 (29,0)	72 (34,3)
	weiblich n (%)	52 (50,5)	70 (65,4)	122 (58,1)
	fehlende Werte n (%)	10 (9,7)	6 (5,6)	16 (7,6)
<b>Alter in Jahren</b>	Mittelwert (StAbw)	11,5 (13,0)	26,8 (19,2)	19,5 (18,2)
	Median	7	24	17
	Min / Max	1 / 70	1 / 87	1 / 87
	fehlende Werte n (%)	12 (11,7)	8 (7,5)	20 (9,5)
<b>Station</b>	Pädiatrie n (%)	64 (62,1)	21 (19,6)	85 (40,5)
	Gynäkologie n (%)	8 (7,8)	25 (23,4)	33 (15,7)
	Polyklinik (%)	28 (27,2)	59 (55,1)	87 (41,4)
	fehlende Werte n (%)	3 (2,9)	2 (1,9)	5 (2,4)

### 3.2 Laborwerte, Symptome und Diagnose

Die Blutwerte, die unter anderem zur Berechnung der Parasitämien dienen, ergaben die in Tabelle 3.2 dargestellte Werte. Die Werte für Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten lagen in der positiv getesteten Gruppe niedriger. Der Hämatokrit-Wert der positiven Teilnehmer lag im Mittel unter dem Referenzbereich für Gesunde [132].

Tabelle 3.2 Blutwerte der Studienteilnehmer				
WBC (Leukozyten/ $\mu$ l); RBC (Erythrozyten/ $\mu$ l); Hb (Hämoglobin in g/dl); Hct (Hämatokrit in %); Plt (Thrombozyten/ $\mu$ l)				
		positive Population	negative Population	Gesamt-Population
WBC	Min / Max	2 200 / 29 300	4 100 / 20 700	2 200 / 29 300
	Mittelwert (StAbw)	8 165 (4 577)	9 463 (3 252)	8 826 (4 001)
RBC	Min / Max	1,37 / 7,65	2,32 / 7,34	1,37 / 7,65
	Mittelwert (StAbw)	4,00 (1,08)	4,62 (0,93)	4,32 (1,05)
HB	Min / Max	2,3 / 16,8	4,5 / 17,2	2,3 / 17,2
	Mittelwert (StAbw)	9,49 (2,77)	11,14 (2,23)	10,33 (2,64)
Hct	Min / Max	8 / 47	12 / 51	8 / 51
	Mittelwert (StAbw)	26,40 (7,08)	31,01 (6,45)	28,75 (7,13)
Plt	Min / Max	60 / 554	93 / 758	60 / 758
	Mittelwert (StAbw)	178,81 (93,36)	255,32 (119,18)	217,79 (113,7)

In Tabelle 3.3 sind die Symptome der Teilnehmer der Studie angegeben, die gegenüber dem betreuenden Arzt während der Sprechstunde im Albert-Schweitzer-Spital geäußert wurden. Zudem sind die Mittelwerte der per rektalen Messung erhobenen Temperaturen angegeben. Diese waren im Mittel bei den im dicken Tropfen positiv getesteten Teilnehmern um 0,8 Kelvin höher.

**Tabelle 3.3 Studien-Teilnehmer nach Symptomen [absolute Anzahl (in %) ]  
bei Fieber in den vergangenen 24 Stunden**

Studien-Teilnehmer nach Symptomen geordnet		positive Population	negative Population	Gesamt-population
Fieber bei Aufnahme	Personen (%)	92 (89,32)	73 (68,2)	165 (78,6)
Temperatur	Min / Max in °C	36 / 41	36 / 41	36 / 41
	Mittelwert in °C	38,7	37,9	38,4
Magen-Darm-Beschwerden		45 (43,7)	33 (30,8)	78 (37,1)
	Erbrechen (%)	28 (27,2)	15 (14,0)	43 (20,5)
	Durchfall	20 (19,4)	12 (11,2)	32 (15,2)
	Bauchschmerzen	9 (8,7)	17 (15,9)	26 (12,4)
	Übelkeit	5 (4,9)	4 (3,7)	9 (4,3)
Kopfschmerzen		24 (23,3)	23 (21,5)	47 (22,4)
Müdigkeit		3 (2,9)	9 (8,4)	12 (5,7)
Atemwegsbeschwerden		14 (13,6)	9 (8,4)	23 (11,0)
	Husten	13 (12,6)	9 (8,4)	22 (10,5)
	Andere	1 (1,0)	0 (0)	1 (0,5)
Malaria Kontrolle		5 (4,9)	0 (0)	5 (2,4)
andere		14 (13,6)	31 (29,0)	45 (21,4)

Durch den betreuenden Arzt wurden folgende Diagnosen (Tab. 3.4) im Rahmen der Sprechstunde am Albert-Schweitzer-Spital gestellt:

**Tabelle 3.4 Klinische Diagnosen [absolut (in %) ]**

	positive Population	negative Population	Gesamt-Population
Malaria	87 (84,5)	18 (16,8)	105 (50,0)
Gastro-Enteritis	8 (7,8)	13 (12,2)	21 (10,0)
Atemwegserkrankung	9 (8,7)	17 (15,9)	26 (12,4)
andere Diagnose	14 (13,6)	48 (44,9)	62 (29,5)
fehlende Diagnose	2 (1,9)	7 (6,5)	9 (4,3)

### 3.3 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte

Von den 210 untersuchten Präparaten wurden in 102 Präparaten in der Lichtmikroskopie (LM), in 107 in der konventionellen UV-Lampen-Fluoreszenz-Mikroskopie (uvFM), in 111 in der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie (ledFM) in 400-facher Vergrößerung und in 109 in der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie (ledFM) in 1000-facher Vergrößerung Parasiten nachgewiesen und diese somit als positiv gewertet. Bei Betrachtung der LM als Goldstandard-Technik lagen die Sensitivitäten somit bei 97,1% für die uvFM und bei 99,0% für die ledFM in beiden Vergrößerungen. Die Spezifität bei 92,6% für die uvFM, bei 90,7% für die ledFM in 400-facher Vergrößerung und bei 92,6% für die ledFM in 1000-facher Vergrößerung. Tabelle 3.5 zeigt des Weiteren den positiven und negativen Vorhersagewert bezogen auf die Studie, sowie die korrigierten Werte unter Berücksichtigung der Prävalenz unter Patienten, die sich mit Angabe von Fieber in der Ambulanz des Albert-Schweitzer-Spitals vorstellen. [128]

**Tabelle 3.5 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte**

mit der LM (Lichtmikroskopie) als GS (Goldstandard) für ledFM (LED-Fluoreszenz-Mikroskopie) und uvFM (konventionelle UV-Lampen-Fluoreszenz-Mikroskopie). Der PPV (positive Vorhersagewert) und der NPV (negativer Vorhersagewert) betrifft die Studienpopulation, die korrigierten Werte basieren auf der Prävalenz von Malaria bei Patienten am Albert-Schweitzer-Spital mit der Angabe von Fieber [128].

	LM	uvFM	ledFM x400	ledFM x1000
<b>Falsch Positive</b>	0	8	10	8
<b>Richtig Positive</b>	102	99	101	101
<b>Falsch Negative</b>	0	3	1	1
<b>Richtig Negative</b>	108	100	98	100
	210	210	210	210
<b>Sensitivität</b>	<b>GS</b>	97,1%	99,0%	99,0%
<b>Spezifität</b>	<b>GS</b>	92,6%	90,7%	92,6%
<b>PPV</b>		92,7%	91,2%	92,8%
<b>NPV</b>		97,0%	99,0%	99,0%
<b>PPV korrigiert</b>		49,7%	44,6%	50,2%
<b>NPV korrigiert</b>		99,8%	99,9%	99,9%

### 3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Von den 210 untersuchten Präparaten ergab sich in 18 Fällen keine Übereinstimmung der Resultate in den mikroskopischen Methoden hinsichtlich der Positivität. Diese Ergebnisse wurden mit den Resultaten der durchgeführten quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verglichen. Bei 13 der 18 Präparate stellten sich die qRT-PCR als positiv heraus. Legt man für diese 18 Proben die qRT-PCR als Gold-Standard-Referenz (GS) fest, ergibt sich folgende Tabelle (Tab. 3.6):

**Tabelle 3.6 Nicht übereinstimmende Resultate**

Die Resultate der 18 Blutproben, die in den mikroskopischen Methoden hinsichtlich Positivität keine Übereinstimmung ergaben, wurden mit der durchgeführten PCR verglichen.

	PCR (GS)	LM	uvFM	ledFM x400	ledFM x1000
<b>Falsch Positive</b>		0	3	2	2
<b>Richtig Positive</b>	13	4	5	10	8
<b>Falsch Negative</b>		9	8	3	5
<b>Richtig Negative</b>	5	5	2	3	3
<b>Summe</b>	18	18	18	18	18

Bei Festlegung der qRT-PCR als Referenzmethode für diese 18 Präparate, lagen die Sensitivitäten bei 91,9% für die Lichtmikroskopie, bei 93,7% für die UV-Lampen-Fluoreszenz-Mikroskopie, bei 97,3% für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 400facher Vergrößerung und bei 96,4% für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 1000facher Vergrößerung. Die Spezifität lag bei 100% für die Lichtmikroskopie, bei 97,0% für die konventionelle UV-Lampen-Fluoreszenz-Mikroskopie und die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 400-facher Vergrößerung sowie bei 98,0% für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 1000-facher Vergrößerung (Tab. 3.7). Tabelle 3.7 zeigt des Weiteren den positiven und negativen Vorhersagewert bezogen auf die Studie, sowie die korrigierten Werte in Bezug auf die Malaria-Prävalenz unter Patienten, die sich mit Angabe von Fieber in der Ambulanz des Albert-Schweitzer-Spitals vorstellen. [128]

Tabelle 3.7 Sensitivität, Spezifizität und Vorhersagewerte II

für die LM (Lichtmikroskopie), die ledFM (LED-Fluoreszenz-Mikroskopie) und uvFM (konventionelle UV-Lampen-Fluoreszenz-Mikroskopie) unter Berücksichtigung der PCR als Standard für die nicht übereinstimmenden Ergebnisse. Der PPV (positive Vorhersagewert) und der NPV (negativer Vorhersagewert) betrifft die Studienpopulation, die korrigierten Werte basieren auf der Prävalenz von Malaria bei Patienten am Albert-Schweitzer-Spital mit der Angabe von Fieber [128].

	LM/PCR	LM	uvFM	ledFM x400	ledFM x1000
Falsch Positive	0	0	3	3	2
Richtig Positive	111	102	104	108	107
Falsch Negative	0	9	7	3	4
Richtig Negative	99	99	96	96	97
	210	210	210	210	210
Sensitivität		91,9%	93,7%	97,3%	96,4%
Spezifizität		100,0%	97,0%	97,0%	98,0%
PPV		100,0%	97,2%	97,3%	98,2%
NPV		91,7%	93,2%	97,0%	96,0%
PPV korrigiert		100,0%	91,2%	91,5%	94,1%
NPV korrigiert		97,4%	97,9%	99,1%	98,8%

### 3.5 Übereinstimmung der Methoden

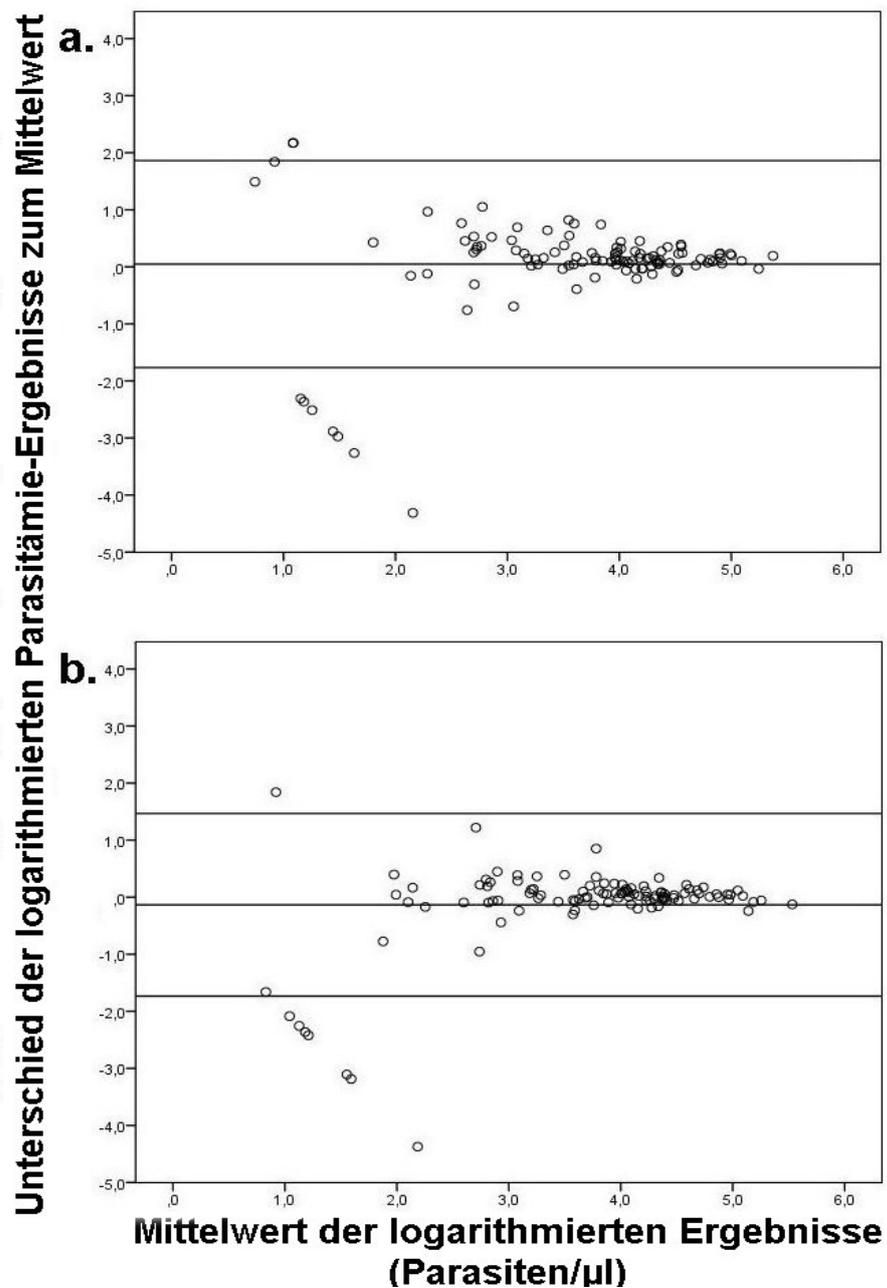
Die Übereinstimmung der drei Fluoreszenz-Methoden mit der Lichtmikroskopie wurde mit dem Cohens Kappa-Koeffizienten [129] erhoben. Beim Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Methoden mit der Lichtmikroskopie zeigten sich bei allen drei Methoden hohe Übereinstimmungswerte um 0,9. Zum Vergleich wurde der Cohens-Kappa-Koeffizient für die Übereinstimmung der zwei Leser in der Lichtmikroskopie berechnet, der einen ähnlichen Wert aufzeigt. (Tab. 3.7)

Tabelle 3.8 Cohens Kappa Koeffizient der Übereinstimmung

	Cohens Kappa Coefficient
uvFM & LM	0,895
ledFM x400 & LM	0,895
ledFM x1000 & LM	0,914
Zwei Untersucher in der LM	0,905

### 3.5.1 Übereinstimmung hinsichtlich der Parasitämie

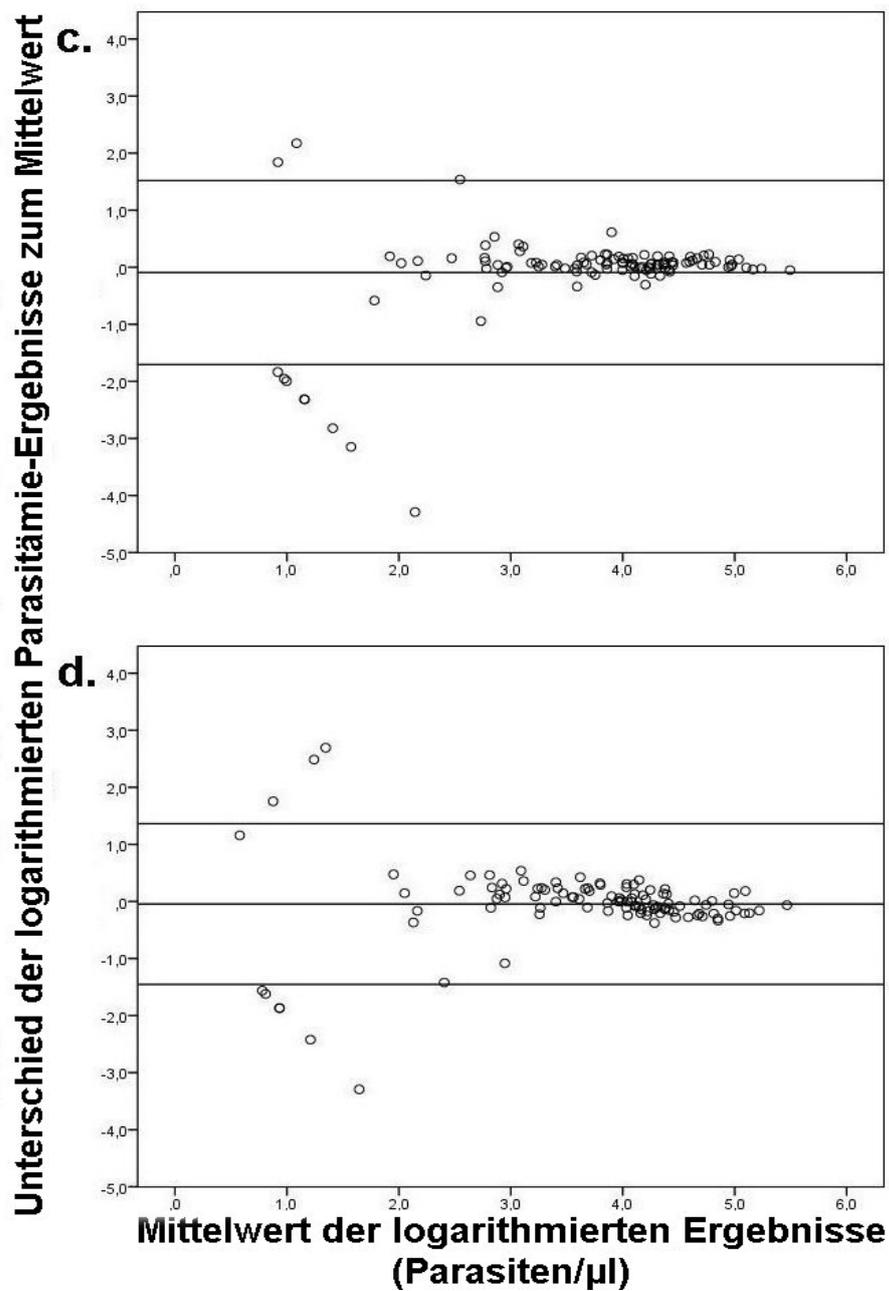
Die Übereinstimmung der Methoden hinsichtlich der Parasitämie wurde mit dem Bland-Altman-Diagramm [130] visualisiert. Die Diagramme (Abb. 3-1, Abb. 3-2) zeigen hohe Übereinstimmungen der Fluoreszenz-Mikroskopie-Methoden mit der Lichtmikroskopie. Um diesen Vergleich zu visualisieren wurden die Parasitämien vorher mit dem 10er-Logarithmus transformiert. Nach der Logarithmierung betrug der mittlere Unterschied (inklusive 95% Intervall-Grenzwerten) für konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie und Lichtmikroskopie 0,048 (-1,766, 1,861, n=103) (Abb. 3-1a), für LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 400facher Vergrößerung und Lichtmikroskopie -0,134 (-1,73,4, 1,466, n=103) (Abb. 3-1b) und für LED Fluoreszenz-Mikroskopie in 1000facher Vergrößerung und Lichtmikroskopie -0,092 (-1,704, 1,519, n=103) (Abb. 3-2c). Der mittlere Unterschied der Ergebnisse beider Untersucher in der Lichtmikroskopie wurde zudem erhoben: -0,045 (-1,453, 1,363, n=103) und in Abb. 3-2d dargestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Methoden zeigen im Vergleich mit der Lichtmikroskopie ähnliche Mittelwerte und 95% Intervallgrenzwerte wie der Vergleich zweier Untersucher in der Lichtmikroskopie, welche als Goldstandard in der täglichen Routine-Diagnostik eingesetzt wird.



**Abbildung 3-1** Bland-Altman-Plot der  $\log_{10}$ -transformierten Parasitämien. Die Daten zeigen die Unterschiede zum Mittelwert aus beiden Ergebnissen, den Mittelwert der Parasitämie wie das 95% Intervall für:

- Die zwei Endergebnisse aus LM und uvFM
- Die zwei Endergebnisse aus LM und ledFM (400x)

**Zu beachten:** Die Resultate, die außerhalb des 95%-Intervalls liegen, sind auf divergente Ergebnisse hinsichtlich der Positivität zurückzuführen.



**Abbildung 3-2** Bland-Altman-Plot der  $\log_{10}$ -transformierten Parasitämien. Die Daten zeigen die Unterschiede zum Mittelwert aus beiden Ergebnissen, den Mittelwert der Parasitämie wie das 95% Intervall für:

- c. Die zwei Endergebnisse aus LM und ledFM (1000x)
- d. Die zwei Endergebnisse der beiden Leser in der Lichtmikroskopie

**Zu beachten:** Die Resultate, die außerhalb des 95%-Intervalls liegen, sind auf divergente Ergebnisse hinsichtlich der Positivität mit der Ausnahme eines Ergebnisses in c. zurückzuführen.

### 3.6 Präzision und Wiederholbarkeit

Tabelle 3.9. zeigt die Lesungen der 10 Untersucher in der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie bei 1000-facher Vergrößerung zu den Präparaten mit niedriger (X1), mittlerer (X2) und hoher (X3) Parasitämie. Tabelle 3.10 zeigt analog dazu die Ergebnisse für die Lichtmikroskopie bei 1000-facher Vergrößerung von Präparaten mit niedriger (Y1), mittlerer (Y2) und hoher (Y3) Parasitämie. Ein Untersucher lag hinsichtlich der Diagnose falsch beim Untersuchen der Probe mit niedriger Parasitämie in der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie.

Um die Ungenauigkeit, die durch die Kalkulation der Parasitämie bei unterschiedlicher Parasitenlasten auftritt, wieder auszugleichen und somit die Ergebnisse der unterschiedlichen Proben und Methoden hinsichtlich der Präzision vergleichen zu können, wurden diese zur Basis 10 logarithmiert.

Des Weiteren wurde das arithmetische Mittel der Ergebnisse jeder Probe nach Logarithmieren auf den Wert „1“ normalisiert, um eine vergleichbare Darstellung der Differenzen zum Mittelwert im Box-Whiskers-Plot um den Wert „1“ zu erreichen. Dieser ist in Abb. 3-3 dargestellt und zeigt die jeweiligen Ergebnisse und deren Abweichungen der jeweiligen Parasitämien zum direkten Vergleich nebeneinander.

Für die Lichtmikroskopie betragen die 95%-Konfidenz-Intervalle normalisierten Parasitämie 0,83 – 1,16 für die hohe Parasitämie (20800 Parasiten /  $\mu$ l), 0,74 – 1,3 für die mittleren Parasitämie (1580 Parasiten /  $\mu$ l) und 0,71 – 1,29 für die niedrige Parasitämie (635 Parasiten /  $\mu$ l). Für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie betragen die Werte des 95%-Konfidenzintervalls 0,77 – 1,2 für die hohe (31790 Parasiten /  $\mu$ l), 0,68 – 1,3 für die mittlere (8314 Parasiten /  $\mu$ l) und 0,37 – 1,6 für die niedrige Parasitämie (712 Parasiten /  $\mu$ l). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3.9 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in ledFM

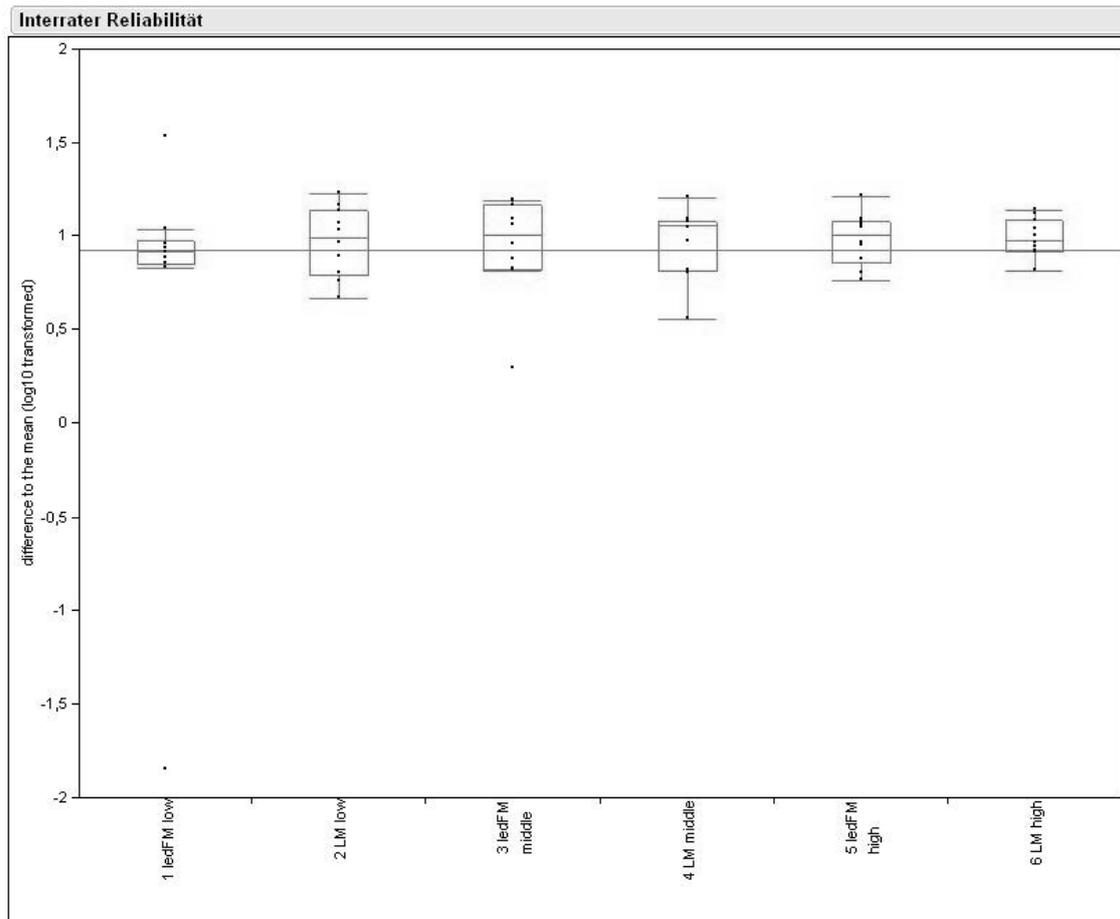
ledFM (1000x): 3 Präparate, 10 Leser

Leser	Präparate AO ledFM (1000x)		
	X 1	X 2	X 3
1	605	5 491	38 359
2	578	7 457	28 881
3	536	11 924	28 023
4	771	12 595	23 648
5	476	10 191	35 949
6	643	9 517	51 845
7	0	5 375	20 065
8	2 403	12 773	35 166
9	506	1 620	18 331
10	601	6 196	37 625
<b>Mittelwert:</b>	<b>712</b>	<b>8 314</b>	<b>31 789</b>

Tabelle 3.10 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in LM

LM (1000x): 3 Präparate, 10 Leser

Leser	Präparate Giemsa LM (1000x)		
	Y1	Y2	Y3
1	576	1 847	22 339
2	490	1 860	16 900
3	911	1 917	28 686
4	359	564	13 530
5	400	1 031	20 516
6	291	987	19 020
7	735	1 900	17 945
8	1 062	2 532	25 013
9	850	1 480	26 852
10	672	1 731	17 209
<b>Mittelwert:</b>	<b>635</b>	<b>1 585</b>	<b>20 801</b>



**Abbildung 3-3 Interrater-Reliabilität.**

Log10 transformierter Unterschied zu den jeweiligen Mittelwerten, die auf den Wert "1" normalisiert wurden mit niedriger (low), mittlerer (middle) und hoher Parasitämie (high) in den Methoden der ledFM x1000 und der LM.

Tab. 3.11 zeigt die Ergebnisse der oben genannten Serie (X1, X2, X3) in der ledFM der Leser eins bis fünf sowie die Ergebnisse derselben Untersucher am Folgetag, die ohne es zu wissen, erneut ein Präparat derselben Blutprobe untersuchten. Die Abweichungen sind vergleichbar mit den Abweichungen zwischen den einzelnen Untersuchern eines Präparates (Tab. 3.9 und Tab. 3.10).

Tabelle 3.11 Wiederholbarkeit der Ergebnisse in ledFM

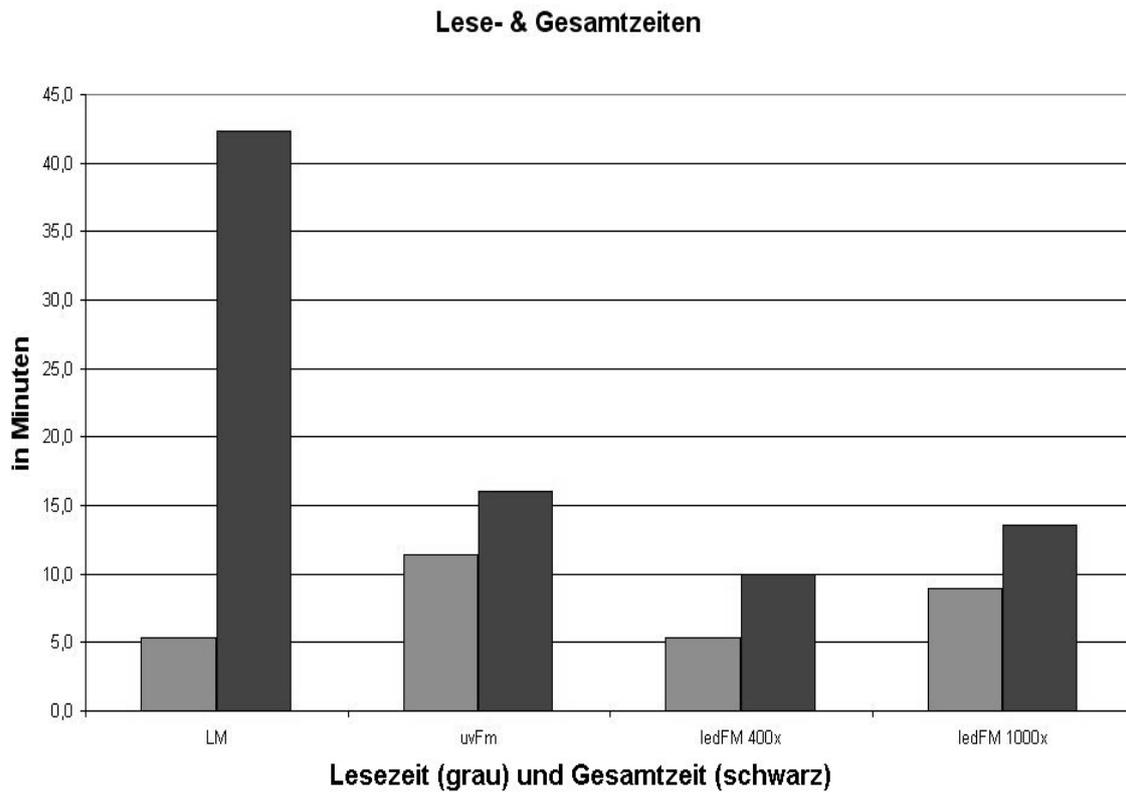
ledFM (1000x): 3 Präparate, 5 Leser

Leser	Präparate AO ledFM (1000x)		
	X 1	X 2	X 3
1 Tag 1	605	5.491	38.359
1 Tag 2	511	4.345	26.122
2 Tag 1	578	7.457	28.881
2 Tag 2	515	9.044	37.547
3 Tag 1	536	11.924	28.023
3 Tag 2	1553	7.034	20.270
4 Tag 1	771	12.595	23.648
4 Tag 2	925	7.507	32.257
5 Tag 1	476	10.191	35.949
5 Tag 2	1750	3.330	22.074

### 3.7 Zeitmessungen

#### 3.7.1 Präparations-, Lese- und Gesamtzeit

Die Präparationszeit der Fluoreszenz-Präparate mit Acridinorange war mit 4:37 min deutlich kürzer als diejenige der Giemsa-Präparate mit 37:02 min. Die Lesezeiten (Gesamtzeiten) lagen für die Lichtmikroskopie bei 5:20 min (42:22 min), für die konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie bei 11:25 min (16:02 min), für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 400-facher Vergrößerung bei 5:20 min (9:57 min) und für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 1000-facher Vergrößerung bei 8:54 min (13:31 min) (Abb. 3-4).



**Abbildung 3-4 Lese- und Gesamtzeiten nach Methoden**

### 3.7.2 Parasiten-Detektionszeit

Der Vergleich der Parasitendetektionszeit im Kaplan-Meier-Diagramm zeigte sehr ähnliche Verläufe und im Log-Rank-Test [133] wurden, wie erwartet, keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,67$ ) zwischen den Methoden deutlich (Abb. 3-5).

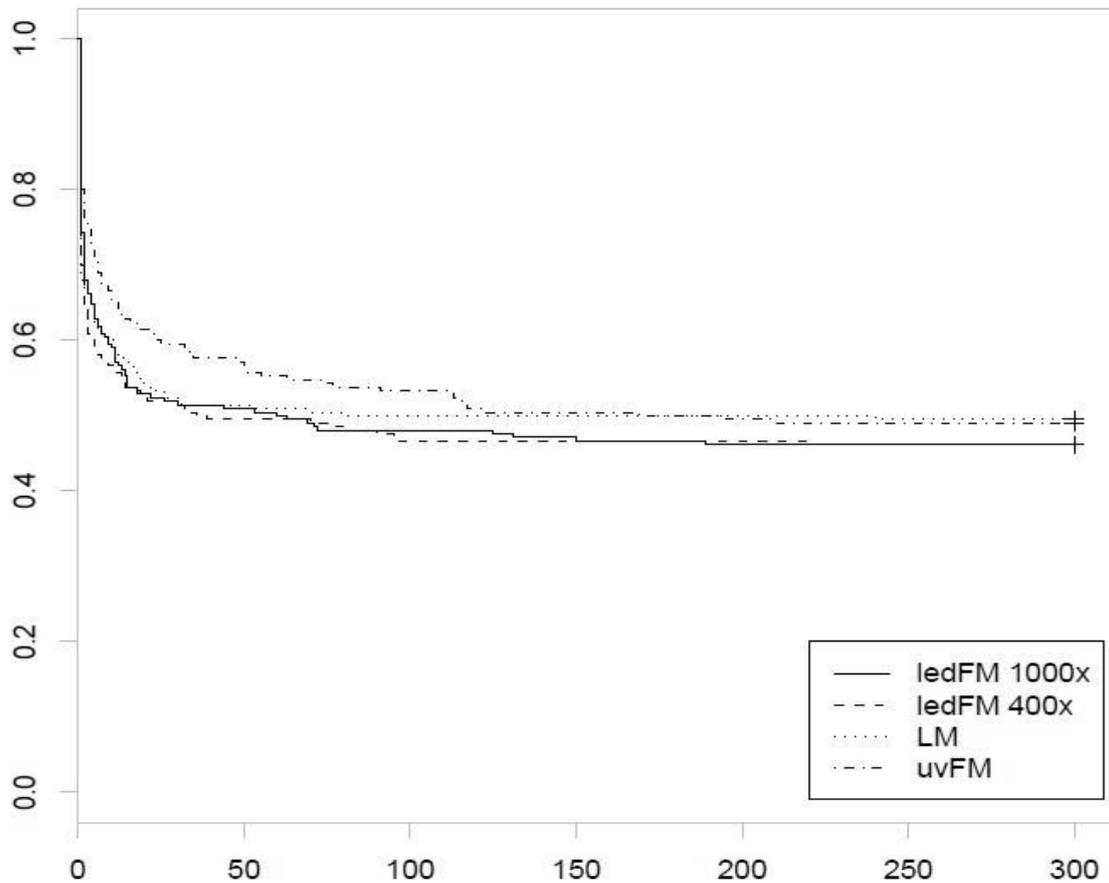


Abbildung 3-5 Kaplan-Meier-Kurve der Parasitendetektionszeit (bis max. 5 min)

### 3.8 Drittlösungen

Drittlösungen aufgrund von nicht übereinstimmenden Ergebnissen der ersten beiden Untersucher waren in 12,4% (LM), 22,9% (uvFM), 14,8% (ledFM x400), und 12,9% (ledFM x1000) notwendig.

### 3.9 Kostenaufstellung

Die Errechnung der laufenden Kosten der beiden Methoden in unserer Studie ohne Berücksichtigung der Anschaffungskosten ergaben folgende Werte:

**Tabelle 3.12** Aufstellung der Materialkosten für Acridinorange- & Giemsa ohne Berücksichtigung der Anschaffungskosten des Mikroskops, bei Annahme einer Kapazität von 20 Präparate pro angesetzte Giemsa-Färbung.

iLED	Packungspreis / €	Kosten in € / Untersuchung
Primo Star iLED (FIND)	(1250)	<i>Nicht eingerechnet</i>
Eukitt Quick hardening mounting medium 100ml (SIGMA)	23,9	<i>Nur zur Aufbewahrung</i>
Pipette 2-20µl (Abimed)	151	0,00604
Objektträger 50 Stück (Mediware)	1,49	0,0298
Deckgläser 100 Stück (LMS)	1	0,0100
PBS Puffer 10 l (Genaxxon)	43,89	0,0000
Acridinorange 100g (Genaxxon)	93,92	0,0000
Pipettenspitzen 1000 Stück (Abimed)	11	0,0220
Immersionsöl 500ml (VWR)	53,1	0,0106
Summe		0,0785
GIEMSA	Packungspreis / €	Kosten in € / Untersuchung
Olympus CX 21	(1160)	<i>Nicht eingerechnet</i>
Pipette 2-20µl (Abimed)	151	0,00604
Objektträger 50 Stück (Mediware)	1,49	0,0298
Pipettenspitzen 1000 Stück (Abimed)	11	0,0110
Giemsa Lsg. 500ml (Lehrmittelshop)	16,73	0,0697
Pufferlösung nach Weise 100 Tabletten (VWR)	77,4	0,0387
Immersionsöl 500ml (VWR)	53,1	0,0106
Aqua destillata für Weise-Lösung	selbst hergestellt	0,0000
Summe		0,1659

### 3.10 Fragebogen

Der Fragebogen (Tab. 3-11) zeigt die persönliche Einschätzung durch die zwei ständigen Untersucher auf dem Hintergrund ihrer Erfahrung und Selbsteinschätzung ihrer mikroskopischen Fähigkeiten. Während sich Lichtmikroskopie und LED-Fluoreszenz-Mikroskopie abgesehen von der Art-Identifikation in der Bewertung die Waage halten (im Schnitt LM: 7,65 Punkte, ledFM: 6,8 Punkte), liegt die konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie mit 2,95

von 10 Bewertungspunkten abgeschlagen zurück. Sieht man von der Art-Identifikation ab, ergeben sich für die Lichtmikroskopie 7,61 von 10 Punkten und für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie 7,28 von 10 Punkten.

**Tabelle 3.13 Fragebogen zur subjektiven Beurteilung der Methoden**

	Leser 1			Leser 2			Gesamt		
	LM	uv FM	led FM	LM	uv FM	led FM	LM	uv FM	led FM
<b>Mikroskopische Fähigkeiten (0-10)</b>	7			6					
<b>Erfahrung in Jahren</b>	1,5			0,7					
	LM	uv FM	led FM	LM	uv FM	led FM	LM	uv FM	led FM
<b>Fähigkeit allgemein (0-10)</b>	7	5	7	7	5	7	7	5	7
<b>Schnelligkeit allgemein (0-10)</b>	7	4	7	8	3	7	7,5	3,5	7
<b>Parasiten-Detektionszeit (0-10)</b>	7	4	7	6	3	7	6,5	3,5	7
<b>Einfache Erlernbarkeit (0-10)</b>	8	5	7	6	3	7	7	4	7
<b>Mögliche tägliche Routine (0-10)</b>	10	3	6	9	1	8	9,5	2	7
<b>Nicht ermüdend (0-10)</b>	8	3	7	5	2	7	6,5	2,5	7
<b>Klares Bild (0-10)</b>	7	2	7	10	1	8	8,5	1,5	7,5
<b>Klarer Aspekt der Parasiten (0-10)</b>	7	3	8	8	4	9	7,5	3,5	8,5
<b>Sicherheit der Diagnostik (0-10)</b>	9	2	7	8	3	8	8,5	2,5	7,5
<b>Artendifferenzierung (0-10)</b>	9	0	0	7	3	5	8	1,5	2,5
<b>Allgemeines Resumee</b>	7,9	3,1	6,3	7,4	2,8	7,3	7,65	2,95	6,8

---

## 4 Diskussion

---

Malaria bleibt eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität weltweit. Über 90% der weltweiten Todesfälle durch Malaria treten im tropischen Afrika südlich der Sahara auf, wo die Mehrheit der Infektionen durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird.

Die epidemiologischen Daten zeigen, dass Malaria etwa 20% der Todesfälle bei afrikanischen Kindern unter fünf Jahren verursacht. In endemischen Gebieten haben kleine Kinder und schwangere Frauen das größte Risiko an schweren Formen der Malaria zu erkranken.

Doch Malaria ist eine heilbare Krankheit und es gibt wirksame Medikamente. Eine frühzeitige Diagnose, um eine schnelle und wirksame Behandlung zu beginnen, verkürzt die Dauer der Erkrankung und verhindert die Entwicklung von Komplikationen und somit die überwiegende Mehrheit der Todesfälle durch Malaria. Wichtige Merkmale einer effizienten Diagnostik sind hohe Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte, Präzision, Wiederholbarkeit und eine kurze Zeit zur Diagnostik. Diese Parameter werden im Folgenden diskutiert.

### 4.1 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte

Bezüglich des Goldstandards der Giemsa-Lichtmikroskopie zeigten sich für die Fluoreszenz-Techniken hohe Sensitivitäten und akzeptable Spezifitäten. In der Sensitivität war die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie der konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie überlegen (97,1% zu 99,0%). Unter Nutzung der Kawamoto-Methode waren in vorangegangenen Studien schlechtere Ergebnisse (82,8% bis 97,9%) erreicht worden [82, 134, 135]. Die niedrigeren Spezifitäten könnten auf die im Goldstandard nicht erfassten positiven Proben zurückzuführen sein, liegen aber gegenüber bereits veröffentlichten Studien über die Kawamoto-Methode deutlich höher [135, 136]. Dies ist nicht überraschend, da die Acridinorange-Färbung unter Nutzung der Fluoreszenz-Mikroskopie in bereits veröffentlichten Studien als sensitiver im Vergleich zur

konventionellen Lichtmikroskopie bewertet worden ist [79]. In der hier vorliegenden Studie ist die Tatsache, dass die Giemsa gefärbten Präparate als Goldstandard dienen zugleich eine Limitierung der Aussagekraft, denn ohne eine weitere Methode kann nicht bestimmt werden, ob die zu überprüfende Methode eventuell die Möglichkeiten des Goldstandard übersteigt. Dieser Sachverhalt bestätigt sich beim Blick auf die nicht übereinstimmenden Ergebnisse unter Zuhilfenahme der Polymerase-Kettenreaktion. Unter Berücksichtigung dieser als qualitative Referenz für die nicht übereinstimmenden Resultate verändert sich das Bild zu Gunsten der Fluoreszenz-Mikroskopie folgendermaßen: alle drei Fluoreszenz-Techniken erreichen gegenüber der Lichtmikroskopie eine höhere Sensitivität (uvFM: 93,7%, ledFM x400: 97,3%, ledFM x1000: 96,4%, LM: 91,9%). Hinsichtlich der Spezifität rücken die Methoden stark zusammen, obschon hier die Lichtmikroskopie mit 100% die höchste Spezifität aufweist (uvFM: 97,0%, ledFM x400: 97,0%, ledFM x1000: 98,0%).

Diese Unterschiede vor allem bzgl. der Sensitivität spiegeln sich in den Vorhersagewerten wider. Diese gelten als außerordentlich wichtige Parameter hinsichtlich der Aussagekraft eines Testes unter möglichen Einsatzbedingungen. In der vorliegenden Studie sind dies potentiell an Malaria erkrankte Patienten, die sich aufgrund ihrer Symptome ärztlich vorstellen. Dies entspricht einem sinnvollen Anwendungskollektiv für ein Malaria-Diagnostik-Verfahren. In diesem Sinne ist insbesondere die hohe negative Vortestwahrscheinlichkeit der ledFM von Bedeutung, da hierdurch nur wenigen Patienten aufgrund eines falschen Testergebnisses eine notwendige Behandlung vorenthalten werden würde. Die Anzahl derer ist bei der Lichtmikroskopie erhöht. Andererseits wären nach der Methode der ledFM die Anzahl der Gesunden mit positivem Testergebnis, die demnach auch einer unnötigen Behandlung unterzogen würden, höher. Hier spielt vor allem das Risiko der Medikamententoxizität und die Resistenzentwicklung eine Rolle. In der Priorisierung ist allerdings der negative Vorhersagewert als wichtiger einzuschätzen.

---

Diskussionswürdig bleibt die Frage, ob die durch die hoch sensitive PCR detektierten Infektionen aus klinischem Blickwinkel zu berücksichtigen sind oder ob damit vor allem subklinische Infektionen erfasst werden, deren Bedeutung hinsichtlich der Behandlung nicht klar abschätzbar sind. Es konnte in einer vorausgegangene Studie bereits die Bedeutung der Diagnose auch subklinischer Infektionen mit *Plasmodien* in Gabun während der Schwangerschaft gezeigt werden, so dass einer sensitiveren Diagnostik insbesondere bei gesundheitlich Kompromittierten, Kindern und schwangeren Frauen eine Bedeutung zukommt [75]. Andererseits ist die PCR äußerst anfällig für Störfaktoren wie z.B. Verunreinigungen während der Aufreinigungsphase, was ein akkurates Ergebnis unter einfachen nicht sterilen Bedingungen schwer ermöglicht [137]. Als einen limitierenden Faktor des Einsatzes der PCR wie auch der Schnelltests muss angeführt werden, dass diese bisweilen parasitäre Nukleinsäure oder deren Proteine als Abbauprodukt nach statt gehabten, ausklingender oder behandelter Infektion nachweisen, ohne dass eine tatsächliche Erkrankung vorhanden ist. Dies wurde insbesondere bei auf Immunchromatographie basierenden Schnelltests in der Vergangenheit beschrieben und häufig diskutiert [13, 70]. Daher muss der klinische Nutzen einer PCR in endemischen Gebieten, wie es Gabun und weite Gebiete Subsahara-Afrikas sind, gut überdacht sein. Andererseits gibt Hänscheid [76] einen guten Überblick über den Einsatz der PCR in endemischen Regionen, in denen Sensitivität und Spezifität sehr hoch einzustufen sind [123, 138].

Ein limitierender Faktor der Fluoreszenz-Methode hingegen ist eine erhöhte Zahl der Retikulozyten, die insbesondere bei Patienten mit hoher Erythrozytopoese nachgewiesen werden kann. Im zentralafrikanischen Raum ist als hauptsächliche Ursache dafür die Sichelzellanämie zu erwähnen, die mit einem erhöhten Zellumsatz der roten Blutkörperchen einhergeht. In diesen Retikulozyten befinden sich noch Residualbestandteile von menschlicher Nukleinsäure, die durch den Nukleinsäure interkalierenden Farbstoff Acridinorange angefärbt werden und auf den ersten Blick nicht immer eindeutig von Parasiten unterschieden werden können. Nur der geübte Beobachter

erkennt die morphologischen Unterschiede unter genauer Betrachtung. Dies ist allerdings nur mit einer ausreichenden Beleuchtung zu erlangen, die sich bei der konventionellen Methode der Fluoreszenzmikroskopie nicht zeigte. Hier überwog eine schwache Beleuchtung, die selbst dem geübten Betrachter die Morphologie der Plasmodien schwer erkenntlich machte. Dieser Sachverhalt könnte die falsch positiven Ergebnisse erklären. Dabei ist gerade bei von der Sichelzellanämie Betroffenen eine akkurate Diagnostik besonders notwendig, da die Folgen der Sequestration durch Plasmodien durch die Grunderkrankung erheblich verstärkt werden können. Eine Entwicklung hin zu einem spezifischeren Fluoreszenz-Farbstoff sowie z.B. einem Antikörper-Fluoreszenz-Komplex könnte hier wegweisend sein.

## 4.2 Übereinstimmung der Methoden

Der Cohens-Kappa Koeffizient gibt für die Übereinstimmung der Fluoreszenz-Mikroskopie-Methoden mit dem Goldstandard der Lichtmikroskopie für alle Methoden einen Koeffizienten um 0,9 an. Nach Landis und Koch fallen hierbei alle erreichten Werte in den Bereich „fast vollkommener Übereinstimmung“ [139]. Vergleichend hierzu ergab die Übereinstimmung nach Cohens Kappa der Resultate zweier Untersucher derselben Probe in der Lichtmikroskopie mit 0,905 einen ähnlichen Wert. Somit ist die Abweichung zweier unterschiedlicher Methoden im Bereich der Abweichung zwischen zwei erfahrenen Lesern zu sehen, welche bei untersucherabhängigen Diagnostikmethoden einen Teil der auftretenden Ungenauigkeit darstellt.

Differenziertere Ergebnisse zeigen diesbezüglich die Bland-Altman-Diagramme: eine höhere Übereinstimmung hinsichtlich der Größe der 95%-Intervalle ergibt der Vergleich zwischen LED-Fluoreszenz-Mikroskopie mit der Lichtmikroskopie gegenüber dem Vergleich der WHO etablierten konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie [140] mit der Lichtmikroskopie. Wiederum zeigt das Diagramm der beiden routinierten Untersucher in der Lichtmikroskopie einen ähnlichen Mittelwert und ein ähnliches 95%-Intervall wie

die Vergleiche zwischen den Methoden. Selbst die Streuung erscheint optisch fast identisch. Auffällig ist die Divergenz der Resultate im Bereich niedriger Parasitämien in allen Diagrammen, welche aus der Logarithmierung resultiert. Des Weiteren kommt es bei niedrigen Parasitämien zu nicht übereinstimmenden Resultaten hinsichtlich der Positivität, was die weite Streuung in diesem Bereich zusätzlich erklärt. Da letztlich diese Streuung auch im Vergleich zweier Untersucher derselben Probe in der Lichtmikroskopie in diesem Maße auftritt, können wir von einer akkurat hohen Übereinstimmung der Methoden untereinander ausgehen. Planche hat mit dieser grafischen Methode bereits eine von der Leukozytenzahl unabhängige Giemsa-Färbemethode, die Lambaréné-Methode, im Vergleich zur WHO-Methode evaluiert [53]

### **4.3 Präzision und Wiederholbarkeit**

Für die Präzision und Wiederholbarkeit zeigen sich in der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie ähnlich hohe Ergebnisse wie in der Lichtmikroskopie. Das große 95%-Intervall für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie bzgl. des Objektträgers mit niedriger Parasitämie erklärt sich insbesondere durch die verfehlte Diagnose eines der Untersucher (siehe auch Abb. 3.3). Eine Exklusion dieses Ergebnisses führt zu einem 95%-Intervall von 0,41 – 1,59 und somit zu einem weitaus dichter liegenden Resultat. Nichtsdestotrotz ist für alle drei Parasitämie-Gruppen die Streuung in der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie größer als in der Lichtmikroskopie. Diese Tatsache könnte auf das kurze vorangegangene, nur 30 Minuten lange, Training und fehlende Erfahrung hinsichtlich der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie erklärt werden. Dieser steht einer jahrelangen täglichen Routine im Bereich der Lichtmikroskopie gegenüber. Die beschriebene Studie kann aber diese Frage nicht hinreichend beantworten.

### **4.4 Zeitmessung**

Die Gesamtzeiten bis zur Diagnosestellung fielen wie in bereits veröffentlichten Artikeln beschrieben [76] für die Fluoreszenz-Mikroskopie-Methoden deutlich kürzer aus. Dies ist vor allem auf die verkürzte Färbezeit zurückzuführen. Die

Zeiten lagen durchschnittlich bei 37:02 min für die Giemsa-Färbung und bei 4:37 min für die Acridinorange-Färbung. Dieser Zeitgewinn stellt sich als bedeutender Vorteil der Fluoreszenz-Methoden dar. Die schnellsten Lesezeiten wurden für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie bei 400-facher Vergrößerung sowie für die Lichtmikroskopie gemessen (5:20 min). Für die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie in 1000-facher Vergrößerung wurden im Schnitt 8:54 min gebraucht. Dies ist unter anderem bedingt durch die geringere Konzentration des Blutes im Acridinorange gefärbten Präparates. Im dicken Tropfen überlagern sich mehrere Zellschichten, was durch die durch die Giemsa-Färbung erreichte Hämolyse unproblematisch ist, während in der AO-Färbung die Zellen in der Regel nebeneinander zu liegen kommen. Daher müssen insgesamt mehr Gesichtsfelder untersucht werden, bis die erforderliche Anzahl an weißen Blutkörperchen erreicht ist. Des Weiteren könnte auch hier die geringere Erfahrung mit der Fluoreszenz-Mikroskopie im Vergleich zur herkömmlichen Lichtmikroskopie ins Feld geführt werden. In der konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie (11:25 min) erschwerten die geringe Helligkeit in der Auflichtfluoreszenz und die Anpassung der Augen des Untersuchers an die Bedingungen der Dunkelkammer die Diagnosestellung zusätzlich. Jedoch bleibt in allen verglichenen Methoden der Fluoreszenz-Mikroskopie die Gesamtzeit der Diagnosestellung deutlich unter der der Lichtmikroskopie, was für den Einsatz in der Notfalldiagnostik bedeutsam ist, da somit die notwendige Behandlung schneller begonnen werden kann und somit Komplikationen oder unnötige Überbehandlungen verhindert werden.

Ist das Präparat einmal angefertigt zeigt ist die Parasitendetektionszeit im zwischen den Methoden sehr ähnlich (Abbildung XY).

#### **4.5 Drittlösungen**

Sehr viele Drittlösungen waren unter Verwendung der herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskopie von Nöten: die Rate von 22,9%, in denen die Kriterien der Übereinstimmung zweier Lesungen nicht erfüllt waren, ist fast doppelt so hoch wie unter Verwendung der Lichtmikroskopie (12,4%) und der LED-

---

Fluoreszenz-Mikroskopie (14,8% unter 400facher Vergrößerung, 12,9% unter 1000facher Vergrößerung). Dies ist am ehesten durch die mangelnde Erfahrung und die geringe Helligkeit der konventionellen Auflichtfluoreszenz bedingt. Bestätigt wird das durch die Äußerungen der Untersucher (vgl. Tab. 3-11). Zugleich macht diese Menge an nötigen Drittlösungen den sinnvollen Einsatz der konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie in der täglichen Routine uninteressant.

#### 4.6 Fragebogen

Der Fragebogen ist durch seine Individualität und Vorhandensein von nur zwei regelmäßigen Untersuchern nur deskriptiv auswertbar. In diesen wird die konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie als ungünstiges diagnostisches Instrument beschrieben, das in allen Kategorien schlecht abschneidet.

Beim Vergleich der LED-Fluoreszenz-Methode zur Lichtmikroskopie fallen vor allem die fragliche Tauglichkeit der neuen Methode im Alltag sowie die schwere Artenidentifikation ins Auge. Durch die Interkalation des AO-Farbstoffes kommen die klassischen mikroskopischen Merkmale der verschiedenen Arten nicht zu tragen. Hier wäre zumindest eine neue Anleitung der Untersucher diesbezüglich von Nöten, die nach wie vor offen lässt, in wie fern diese Methode eine solche Arten-Klassifikation erlaubt. Zu berücksichtigen bleibt, dass in unserer Studie nur eine geringe Anzahl von gemischten Infektionen mit anderen *Plasmodium*-Arten vorkam, so dass die durchgeführte Studie diesbezüglich keine sinnvolle Beurteilung zulässt.

#### 4.7 Studienpopulation

Mit 85 Studienteilnehmer und damit knapp 62% der eingeschlossenen Patienten kamen die meisten der Teilnehmer aus der Pädiatrie, die am Albert-Schweitzer-Spital auch einen großen Teil der Patientenpopulation ausmachen. Im Jahr 2010 waren 21,9% aller Konsultationen in der Pädiatrie zu verzeichnen; davon entfielen etwa 14% auf Malariafälle, während in der internistischen Sprechstunde nur bei 8,4% eine Malaria diagnostiziert wurde [141].

In der positiven Gruppe wurden im Mittel in der hämatologischen Untersuchung niedrigere Werte für Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten als in der negativen Gruppe gemessen. Dies ist aufgrund der Pathogenese der Malaria mit einhergehender Hämolyse und Sequestration zu erwarten gewesen. Allerdings lag nur der Wert des Hämatokrit mit dem arithmetischen Mittel von 26,4% außerhalb der gängigen Referenzbereiche [132].

In Bezug auf die klinisch erfassten Symptome waren die gemessenen Temperaturen bei der positiven Gruppe im Mittel 0,8 K höher als in der negativen Gruppe. Allerdings waren hier eine enorme Anzahl an fehlenden Werten (61%) zu verzeichnen, was auf die lückenhafte, papierbasierte Dokumentation im Spital zurückzuführen ist. Die häufigsten klinischen Angaben neben der Fieber-Anamnese waren Magen-Darm-Beschwerden, Kopfschmerzen, Atem-Beschwerden und Müdigkeit, aber insbesondere Erbrechen und Durchfall trat in der positiven Gruppe häufiger auf.

Von Seiten der Ärzte im Spital wurden 84,5% der nach Goldstandard im Labor durchgeführten Lichtmikroskopie positiven Teilnehmer als Malaria-Patienten behandelt. In der der vorliegenden Studie nach Goldstandard negativen Gruppe wurden immerhin noch 16,8% der Studienteilnehmer als Malaria-Patienten behandelt. Diese Tatsache zeigt die Schwierigkeit der klinischen Diagnose der Malaria [47] und zugleich die Notwendigkeit einer schnellen und akkuraten Diagnostik. Denn Fehldiagnosen können durch Komplikationen und Resistenzentwicklungen kostspielige und weitreichende Folgen haben

Eine Limitierung der Aussagekraft der Studie ist der Tatsache geschuldet, dass die Studienpopulation keine repräsentative Stichprobe der Krankenhaus-Besucher mit Fieberanamnese darstellt. Oyakhirome et al. hatte 2010 zeigen können, dass nur etwa 7% der Patienten, die sich mit Fieberanamnese im Albert-Schweitzer-Spital vorstellen [128], an einer Malaria leiden. Die zur Testung der diagnostischen Methoden erwünschte gleichmäßige Verteilung positiver und negativer Ergebnissen ist der beschriebenen Vorauswahl geschuldet. Daher wurde diese 2010 beschriebene Prävalenz in die Berechnung der korrigierten Vorhersagewerte übernommen.

#### 4.8 Evaluierung und Schlussfolgerung

Die vorliegenden Resultate zeigen eine hohe Sensitivität, Spezifität und aussagekräftige Vorhersagewerte für die Fluoreszenz-Techniken. Des Weiteren konnte durch die PCR gezeigt werden, dass insbesondere bei niedriger Parasitämie die Acridinorange-Technik die sensitivere Methode ist, was bereits in früheren Studien beschrieben wurde [79, 82]. Die Übereinstimmung der LED-Fluoreszenz-Methode mit der Lichtmikroskopie war akkurat mit etwas besseren Ergebnissen für die 1000-fache Vergrößerung. In jedem Fall legten die LED-Methoden eine bessere Leistung an den Tag als die von der WHO für die Diagnostik der Malaria seit langem anerkannte konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie [140]. Die Übereinstimmung war mit derjenigen zweier Untersucher in der Lichtmikroskopie vergleichbar und kann somit im Rahmen der normalen Abweichungen gesehen werden. Zu denselben Ergebnissen kommt man durch die Visualisierung im Bland-Altman-Diagramm. Der prozentuale Anteil der Drittlösungen und der Lesezeit wurde im Verlauf der Studie immer besser, blieb aber unter den Ergebnissen der Lichtmikroskopie. Auch hier ist der geringe Erfahrungsschatz in den neuen Methoden sicherlich ein zu berücksichtigender Faktor.

Jedoch sind wie in der Einleitung bereits erwähnt für eine neue Technik und gleichermaßen für den Goldstandard nicht allein die Kennwerte der Sensitivität, Spezifität, Übereinstimmung und Präzision von Bedeutung. Insbesondere müssen die klinische Relevanz, der Zeitaufwand, die Kosten und somit der sinnvolle Einsatz der neuen und alten Methode hinterfragt werden. Erst auf diese Art ergibt sich ein komplettes Bild, welches den Hinweis liefert, ob eine Methode, die als Goldstandard gilt, trotz langen Bestehens als Methode des Goldstandards abgelöst werden sollte [52]. Bezüglich der klinischen Relevanz und somit der Gefahr der Überdiagnostik zeigt sich eine hohe Übereinstimmung mit der klinisch relevanten lichtmikroskopischen Methode bei erhöhter Sensitivität im Bereich niedriger Parasitämien; dies allerdings bei Patienten, die sich allesamt mit klinischer Symptomatik, im Sinne des Einschlusskriteriums der positiven Fieberanamnese, in der Ambulanz des Albert-Schweitzer-Spitals

---

vorstellten. Die Frage nach der Überdiagnostik – als der positiven Diagnostik asymptomatischer oder subklinischer Infektionen, die zu einer Überbehandlung klinisch Gesunder führen könnte, war nicht Gegenstand unserer Studie und kann somit nicht beantwortet werden. Im Zuge dessen wäre eine Vergleichsstudie mit einer negativen asymptomatischen Kontrollgruppe von großem Nutzen. Nichtsdestotrotz kann aufgrund der hohen Deckungsgleichheit mit der lichtmikroskopischen Methoden eine hohe klinische Relevanz angenommen werden. In dieser Hinsicht wurde in Lambaréné bereits eine Studie zur Auswirkung von submikroskopischen Infektionen in der Schwangerschaft bei vergleichender PCR-Diagnostik durchgeführt [75]. Inwieweit die LED-Fluoreszenz-Technik dieses Manko gerade im Bereich niedriger Parasitämie ausgleichen könnte, ist nur schwer einzuschätzen.

Als weiterer wichtiger Maßstab muss die klinische tägliche routinemäßige Einsatzmöglichkeit gelten: Um eine schnelle Diagnostik und damit einen schnellen Beginn einer gesicherten Therapie gerade bei schwer kranken Patienten zu gewährleisten, ist die Diagnosezeit ein wichtiger Vergleichsparameter. Wie oben beschrieben konnte vor allem bezüglich der Färbung ein enormer Zeitgewinn verzeichnet werden, während sich in den reinen Lesezeiten keine Verbesserungen erzielen lassen konnten. Es kann spekuliert werden, ob nach weiterem Routineeinsatz die Lesezeit in der 400-fachen Vergrößerung in der LED-Fluoreszenz-Technik weiter verkürzt werden kann. Im Verlauf der Studie konnte bereits ein Trend in diese Richtung festgestellt werden. In jedem Fall verkürzt sich aber die Gesamtzeit bis zur Diagnosestellung drastisch: im Fall der 400-fachen Vergrößerung in der LED-Technik konnte fast eine Viertelung der Zeit im Vergleich zur Giemsa-Lichtmikroskopie festgestellt werden und in anderen Studien konnte bereits die Vergleichbarkeit verschiedener Vergrößerungen in der Fluoreszenz-Mikroskopie bzgl. der Malaria-Diagnostik gezeigt werden [142]. Dieses Zeitersparnis bei akkurater Diagnostik könnte vor allem dazu beitragen, dass die Überbehandlung mit Medikamenten aufgrund von noch ausstehenden Ergebnissen und damit die Resistenzentwicklung gegen die gängigen

Medikamente abnimmt. Des Weiteren würden die Abnahme des Medikamentenabusus eine geringere Toxizität mit sich bringen und die Ausgaben im Gesundheitswesen verringern.

Ein weiterer zu beachtender Faktor sind die Kosten der verglichenen Diagnostik-Methoden unabhängig von den erheblichen Folgekosten. Diese sind bei der LED-Fluoreszenz-Technik einmalig im Sinne der Anschaffungskosten als hoch anzusehen, da der Preis eines LED-Fluoreszenz-Mikroskops bisher noch teurer ist als die Anschaffung eines Lichtmikroskops. Zudem stehen Lichtmikroskope bereits heute in allen Ländern flächendeckend zur Verfügung und erfüllen weitere labortechnische Aufgaben. Seit kurzer Zeit gibt es allerdings Nachrüstmodule mit LED-Auflicht-Fluoreszenz-Technik für Lichtmikroskope [143]. Diese Leuchtdioden sind langlebiger als konventionelle Quecksilber-Dampflampen-Module. Das in der Studie verwendete Mikroskop ist das Lichtmikroskop *PrimoStar* von Zeiss, das mit einem solchen Modul nachgerüstet wurde. Vorangegangene Studien konnte keine Unterlegenheit der so nachgerüsteten Lichtmikroskope gegenüber originalen LED-Fluoreszenz-Mikroskopen feststellen [144, 145]. Zudem wird der Kauf von z.B. dem in der Studie verwendeten *PrimoStar* iLED-Mikroskopen durch die Stiftung für innovative und neue Diagnostik (FIND: *Foundation for innovative and new Diagnostics*, Zürich) für Institutionen in Entwicklungsländern finanziell subventioniert, sodass die Anschaffungskosten mit denen der Lichtmikroskope vergleichbar sind. Betrachtet man die laufenden Kosten, kann man eine deutliche Reduzierung derselben durch den Einsatz der LED-Fluoreszenz-Mikroskopie wie in unserem Fall erreichen. Pro Patient kann hierbei mit einer Kostenreduktion von über 50% gegenüber der Lichtmikroskopie ausgegangen werden, wenn man die gängigen Einkaufspreise berücksichtigt. Dabei darf nicht vernachlässigt werden, dass in unserer Kostenaufstellung (Tab. 3-11) die Arbeitszeit nicht eingegangen ist. Diese ist aufgrund der etwas höheren Lesezeit in der LED-Fluoreszenz-Technik länger und damit teurer. Es ist aber wahrscheinlich, dass sich im Verlauf weiterer Trainings die Lesezeiten anpassen und somit der Einsatz an Arbeitskraft und damit die hierfür

anfallenden Kosten angleichen. Zusätzlich kommt der neuen Methode die deutlich einfachere Aufbewahrung des Farbstoffes zu Gute. Insbesondere die Tatsache, dass Acridinorange im Gegensatz zur Giemsa-Lösung nicht entzündlich ist, verringert die schwer einzuschätzenden Kosten für Transport und Logistik erheblich.

Andere Methoden, Malaria zu diagnostizieren, wie Schnelltests auf Immunchromatographie-Basis, Immunofluoreszenz-Antikörper-Assays [IFA] oder Enzym gebundene Immunosorbent-Assays [ELISA] oder die Polymerase-Kettenreaktion sind zeitaufwendig und teuer. Nichtsdestotrotz haben sie ihre bedeutende Rolle in der Forschung, Epidemiologie und im Screening von Blut-Produkten. Schnelltests sind eine schnelle und zuverlässige Alternative, sie liefern allerdings nur qualitative Ergebnisse, unterliegen einer kurzen Aufbewahrungszeit und bedürfen einer auf Temperatur und Luftfeuchtigkeit kontrollierten Aufbewahrung. Des Weiteren verfälschen Kreuzreaktionen mit Rheumafaktoren [68, 69] oder Persistenzen von parasitären Proteinen [13, 66, 70] die Ergebnisse. Dies macht sie zum sinnvollen Diagnostik-Instrument für Reisende, nicht aber zum sinnvollen Routine-Testverfahren in holoendemischen ländlichen Regionen. Daneben haben RDT im Vergleich zur Mikroskopie sehr hohe Material-Kosten, die sich nach Wongsrichanalai auf U.S. \$0,55 - \$1,50 belaufen, während die einer Diagnostik durch Licht-Mikroskopie mit U.S. \$0,12 - \$0,40 per Probe schon weit darunter halten [13, 105].

Andererseits ist in vorangegangenen Studien in Gabun gezeigt worden, dass die Parasitämie keinesfalls mit der Schwere der klinisch manifesten Malaria in direktem Zusammenhang steht [146].

Dies sind alles wichtige Aspekte, die bereits Kawamoto mit der Fluoreszenz-Technik mithilfe von Interferenz-Filter, bei der ein normales Lichtmikroskop durch Interferenzfilteraufsätze zum Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskop umfunktioniert hatte [84], berücksichtigte. Jedoch war die schwache Beleuchtung der Objektträger ein entscheidender Nachteil [81, 147]. Diese Tatsache verhinderte einen sinnvollen Einsatz vor allem unter

---

Tageslichtbedingungen. Der große Vorteil gegenüber den konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopen hingegen bestand in den sehr günstigen Anschaffungskosten. Aber das schwache Licht, das durch die Filter weiter geschwächt wurde, durchdrang nur wenige Blutschichten. Dies stand einer hohen Konzentration und Dichte entgegen, wodurch der Zeitgewinn bis hin zur Diagnostik deutlich geringer ausfiel. Daher wurde im Verlauf die bereits in der Einleitung beschriebene quantitative buffy coat (QBC)-Methode entwickelt [86, 148, 149], die die Zentrifugation von Blut-Zellen in Spezialgefäßen nutzt um höhere Konzentrationen von Erythrozyten und damit Parasiten pro Gesichtsfeld zu erlangen. Aber diese Methode erfordert eine stabile Stromversorgung in der täglichen Routine wie auch eine spezielle Zentrifuge und Gefäße, was die Kosten auf U.S. \$1.70 pro Untersuchung steigen lässt [105].

Im Falle der LED-Fluoreszenz-Methode wird durch das helle Auflicht eine Untersuchung höheren Konzentrationen sogar unter Tageslichtbedingungen problemlos ermöglicht, wodurch die Lesezeit stark verkürzt wird und eine teure und technisch aufwendige Installation einer Dunkelkammer obsolet wird. Die Untersucher beschrieben die Detektion der Parasiten als einfach und wenig ermüdend für die Augen. Verglichen mit der konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie gibt es keinen Zeitverlust durch die Dunkeladaptation der Augen, da die neue Methode auch unter Tageslicht-Bedingungen anwendbar ist. Die Möglichkeit des Betriebs unter Batterie-Strom während Stromausfällen oder unterwegs ist ein weiterer Vorteil im täglichen Routine-Einsatz, den die Untersucher angaben, da es in der Studienzeit in Lambaréné häufig zu solchen Ausfällen kam.

Ein augenscheinlicher Nachteil hingegen ist die Schwierigkeit der Unterscheidung der verschiedenen *Plasmodium*-Arten. Diese kamen in unserer Studie selten vor, da *Plasmodium falciparum* als prädominante Art in Zentralafrika vorherrscht. Andererseits beschreibt Rickmann [148] eine gute Differenzierbarkeit der Arten in der Acridinorange-Färbung.

Allerdings muss die Schwierigkeit der Aufbewahrung der Präparate in Acridinorange-Färbung erwähnt werden, da bereits nach wenigen Stunden die

Qualität abnimmt und diese nach 6 Stunden keine verlässlichen Ergebnisse mehr erlauben. Dies besitzt für die tägliche Laborroutine keine Bedeutung, ist aber im wissenschaftlichen Kontext entscheidend, da hier eine Aufbewahrung unabdingbar ist. Andererseits konnte in vorangehender Studie über eine nachträgliche Färbung mit Giemsa berichtet werden, auch wenn hierdurch ein zusätzlicher Zeitaufwand entsteht [90].

Unter Berücksichtigung all dieser diskutierten Punkte ist die Acridinorange-Färbung eine sehr schnelle Färbemethode und aufgrund seiner langen Haltbarkeitsdauer an einem dunklen Ort in Pulverform einfach in der Aufbewahrung. Eine wöchentlich zubereitete Lösung kann problemlos über sieben Tage verwendet werden. Eine Machbarkeitsstudie in Tansania [135] zeigte bereits seine Effizienz und Leistung. LED-Fluoreszenzmikroskope sind seit einigen Jahren verfügbar. Sie sind länger haltbar und verbrauchen weniger Energie als herkömmliche Lichtmikroskope. Eine Aufrüstung dieser mit LED-Auflichtmodulen ist denkbar. Zusätzlich zur verbesserten Tuberkulose-Diagnostik [88], die mit der Malaria nach WHO-Daten einen erheblichen Anteil der Gründe für hohe Krankheitslasten ausmacht [8, 95], sind sie günstiger, akkurat und daher ein zu empfehlendes Instrument für die tägliche Routine-Diagnostik der Malaria unter einfachen Umständen in ganz Afrika.

---

## 5 Zusammenfassung

---

**Hintergrund:** Mit etwa 300 – 500 Mio. Infektionsfällen und 1 Mio. Toten durch die Infektion mit *Plasmodien* bleibt die Malaria eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität weltweit. Über 90% der Todesfälle treten im tropischen Afrika auf, wo die Mehrheit der Infektionen durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird. Doch Malaria ist eine heilbare Krankheit. Eine schnelle und akkurate Diagnostik ist hierbei die zentrale Voraussetzung für die klinische Versorgung der Patienten. Zudem verhindert sie Fehlbehandlungen, welche zu Resistenzentwicklungen, Toxizität und wirtschaftlichen Verlusten führen können. Goldstandard ist seit 1904 die Lichtmikroskopie von mit Giemsa-Lösung gefärbter Dicker Tropfen. Unter optimalen Bedingungen ist dieses Verfahren schnell und zuverlässig, nichtsdestotrotz wäre ein schnelleres Ergebnis von großem Nutzen. Schnelltests als denkbare Alternative sind teuer und liefern nur qualitative Ergebnisse. Jedoch ist in Zeiten abnehmender Inzidenzen sowie schnellen Resistenzentwicklungen und teuren Medikamenten eine kostengünstige schnelle und zuverlässige Malaria-Diagnostik unabdingbar. Die auf Leuchtdioden basierende Fluoreszenz-Mikroskopie wurde als mögliches alternatives Diagnostik-Instrument in dieser Arbeit untersucht.

**Methoden:** In Lambaréné (Gabun) wurden über ein Jahr die Leuchtdioden (LED)-Fluoreszenz-Mikroskopie in 400-facher (ledFM 400x) und 1000-facher Vergrößerung (ledFM 1000x) sowie die konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie (uvFM) in 1000facher Vergrößerung mit konventioneller Lichtmikroskopie (LM) anhand von Proben von 210 Patienten, die sich mit Fieber-Anamnese im Albert-Schweitzer-Krankenhaus vorstellten, verglichen. Die Präparate wurden mit Acridinorange und Giemsa gefärbt, ausgezählt, die Diagnose-Zeit gemessen und die Methoden mittels Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewerte, Bland-Altman-Plot, Cohens-Kappa-Koeffizient und Box-Whiskers-Plot beurteilt. Für nicht übereinstimmende Ergebnisse stand die quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) als sensitive Referenz zur Verfügung. Des Weiteren wurden die Wiederholbarkeit, die Präzision und die Kosten bestimmt.

**Ergebnisse:** Bei Festlegung der LM als Goldstandard lagen die Sensitivitäten bei 99,1% für ledFM 400x und ledFM 1000x, 97,0% für die uvFM, die Spezifitäten bei 90,7% für die ledFM 400x, 92,6% für die ledFM 1000x und bei 92,6% für die uvFM. Eine hohe Übereinstimmung zeigte sich im Bland-Altman-Plot und anhand des Kappa-Koeffizienten (ledFM 400x: 0,895, ledFM 1000x: 0,914, uvFM 0,895). Unter Berücksichtigung der qRT-PCR als Referenz für nicht übereinstimmende Resultate lagen die Sensitivitäten bei 91,9% für die LM, bei 93,7% für die uvFM, bei 97,3% für die ledFM 400x und bei 96,4% für die ledFM 1000x, die Spezifitäten bei 100,0% für die LM, bei 97,0% für die uvFM und die ledFM 400x sowie bei 98,0% für die ledFM 1000x. Die Diagnose-Zeiten für die Fluoreszenz-Methoden waren im Vergleich zur Lichtmikroskopie kürzer (LM: 43 min, ledFM 400x: 10 min, ledFM 1000x: 14 min, uvFM: 16 min). Für alle mikroskopischen Verfahren zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Untersuchern sowie eine hohe Präzision und Wiederholbarkeit. Die Kosten für ein Präparat der LED-Fluoreszenz-Methode lagen bei 47,3% der Kosten eines Präparates der Lichtmikroskopie.

**Schlussfolgerung:** Die vorliegenden Resultate zeigen hohe Sensitivitäten, Spezifitäten, aussagekräftige Vorhersagewerte und eine hohe Präzision für die Fluoreszenz-Techniken. Zudem konnte mittels qRT-PCR die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie bei niedriger Parasitämie als sensitivere Methode bewertet werden. Die Übereinstimmung der LED-Fluoreszenz-Methoden mit der Lichtmikroskopie war akkurat. Zu denselben Ergebnissen kommt man durch die Visualisierung im Bland-Altman-Diagramm. Bezüglich Diagnose-Zeit und Kosten zeigt sich ein deutlicher Vorteil der LED-Fluoreszenz-Technik gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskopie sowie der Lichtmikroskopie. Allerdings gelingen Spezies-Differenzierung und Aufbewahrung der Präparate nur bedingt unter Verwendung der Acridinorange-Färbung. Diese Nachteile sollten durch spezifischere Färbungen in Zukunft noch verbessert werden. In jedem Fall aber ist die LED-Fluoreszenz-Mikroskopie unter Berücksichtigung der diskutierten Punkte ein zuverlässiges akkurates schnelles und vergleichsweise kostengünstiges Instrument für die tägliche Routine-Diagnostik der Malaria und somit als geeignete Methode unter einfachen Bedingungen einsetzbar.

---

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Roetyncck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S: **Natural killer cells and malaria.** *Immunol Rev* 2006, **214**:251-263.
2. Laveran A: **Note Sur Un Nouveau Parasite Trouvé Dans Le Sang De Plusieurs Malades Atteints De Fièvre Palustre.** *Bull Acad Med* 1880, **9**:1235-1236.
3. Laveran A: **Nature Parasitaire Des Accidents de L'impaludisme. Description D'un Nouveau Parasite Découvert Dans Le Sang De Malades Atteints De Fièvre Palustre.** *C R Séances Acad Sciences* 1881, **93**:627-630.
4. Guillemin J: **Miasma, malaria, and method.** *Mol Interv* 2001, **1**:246-249.
5. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI: **The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature* 2005, **434**:214-217.
6. World Health Organization: **Making a difference. The World Health Report 1999.** *Health Millions* 1999, **25**:3-5.
7. WHO Expert Committee on Malaria: **Report.** *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000, **892**:i-v, 1-74.
8. **WHO Country health profile: Gabon: Health statistics profile, besucht am 26.06.2013** [<http://www.afro.who.int/en/gabon/country-health-profile.html>]
9. Gwer S, Newton CR, Berkley JA: **Over-diagnosis and co-morbidity of severe malaria in African children: a guide for clinicians.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:6-13.
10. Nolan T, Angos P, Cunha AJ, Muhe L, Qazi S, Simoes EA, Tamburlini G, Weber M, Pierce NF: **Quality of hospital care for seriously ill children in less-developed countries.** *Lancet* 2001, **357**:106-110.
11. Barnish G, Bates I, Iboro J: **Newer drug combinations for malaria.** *BMJ* 2004, **328**:1511-1512.
12. Ruebush TK, Kern MK, Campbell CC, Oloo AJ: **Self-treatment of malaria in a rural area of western Kenya.** *Bull World Health Organ* 1995, **73**:229-236.
13. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH: **A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT).** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:119-127.
14. Giemsa G: **Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung.** *Centralblatt für Bakteriologie* 1904, **1**:307-313.
15. Fleischer B: **Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**:755-756.
16. Ross R: **On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood.** *Br Med J* 1897, **2**:1786-1788.
17. Bignami A: **Come Si Prendono Le Febbri Malariche. Ricerche Sperimentali.** *Bull della R Acad Med di Roma* 1899, **a25**:1898-1899.

18. Cox FE: **History of human parasitology.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:595-612.
19. **ACTIVITY of a new antimalarial agent, chloroquine (SN 7618).** *J Am Med Assoc* 1946, **130**:1069.
20. Rieckmann KH: **The chequered history of malaria control: are new and better tools the ultimate answer?** *Ann Trop Med Parasitol* 2006, **100**:647-662.
21. Ray AP, Sharma GK: **Acquired resistance to chloroquine diphosphate in *P. gallinaceum* in chicks.** *Nature* 1956, **178**:1291-1292.
22. Hemmer CJ, Frimmel S, Kinzelbach R, Gurtler L, Reisinger EC: **[Global warming: trailblazer for tropical infections in Germany?].** *Dtsch Med Wochenschr* 2007, **132**:2583-2589.
23. Expert Committee on Malaria: **20th Report. WHO Technical Report.** vol. 892. Geneva: WHO; 2000.
24. World Health Organization: **World Malaria Report 2011.** [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/9789241564403\\_eng.pdf](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf), besucht am 18.06.2012.
25. World Health Organization: **Malaria Fact Sheet. 2012, No. 94.**
26. Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K: **Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population.** *Bull World Health Organ* 1999, **77**:624-640.
27. Breman JG, Egan A, Keusch GT: **The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**:iv-vii.
28. Tuteja R: **Malaria - an overview.** *FEBS J* 2007, **274**:4670-4679.
29. Jelinek T: **Imported falciparum malaria in Europe: 2007 data from TropNetEurop.** *Euro Surveill* 2008, **13**.
30. Schoneberg I, Stark K, Altmann D, Krause G: **[Imported malaria in Germany--countries of infection and parasite species, 1993-2007].** *Gesundheitswesen* 2008, **70**:256-261.
31. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z, Matteelli A, Clerinx J, Corachan M, Puente S, et al: **Imported Falciparum malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases.** *Clin Infect Dis* 2002, **34**:572-576.
32. Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS: **Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management.** *Clin Infect Dis* 1998, **27**:142-149.
33. Andriopoulos P, Economopoulou A, Spanakos G, Assimakopoulos G: **A local outbreak of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Laconia, Greece--a re-emerging infection in the southern borders of Europe?** *Int J Infect Dis*, **17**:e125-128.
34. Danis K, Lenglet A, Tseroni M, Baka A, Tsiodras S, Bonovas S: **Malaria in Greece: historical and current reflections on a re-emerging vector borne disease.** *Travel Med Infect Dis*, **11**:8-14.
35. Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH: **Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon.** *Trop Med Parasitol* 1995, **46**:77-82.

36. Knobloch J: *Malaria - Grundlagen und klinische Praxis*. Bremen: Uni Med Science, ISBN-10: 3895996238; 2003.
37. Löscher T, Burchard GD, Lang W: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme; 2010.
38. Barnwell JW, Galinski, M.R.: **Invasion of Vertebrate Cells: Erythrocytes**. In *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. Edited by Press A. Washington, D.C.; 1998: 93-112
39. Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Holloway P, Hien TT, White NJ: **The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria**. *Crit Care Med* 2000, **28**:1833-1840.
40. Mehta KS, Halankar AR, Makwana PD, Torane PP, Satija PS, Shah VB: **Severe acute renal failure in malaria**. *J Postgrad Med* 2001, **47**:24-26.
41. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM: **TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria**. *Lancet* 1990, **336**:1201-1204.
42. Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M: **The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria**. *J Infect Dis* 1999, **180**:1288-1297.
43. Maitland K, Marsh K: **Pathophysiology of severe malaria in children**. *Acta Trop* 2004, **90**:131-140.
44. Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ: **Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria**. *Parasitol Today* 2000, **16**:228-232.
45. Aikawa M, Iseki M, Barnwell JW, Taylor D, Oo MM, Howard RJ: **The pathology of human cerebral malaria**. *Am J Trop Med Hyg* 1990, **43**:30-37.
46. **WHO Guidelines For The Treatment Of Malaria 2010, besucht am 26.06.2013**  
[<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html>]
47. World Health Organization: **World Malaria Report 2005, Section II**. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593199\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593199_eng.pdf), besucht am 07.05.2012.
48. Eckart WU: *Geschichte der Medizin, 6. Auflage, ISBN 3-540-79215-5, S. 323-324*. Springer; 2008.
49. Rudd P: **In search of the gold standard for compliance measurement**. *Arch Intern Med* 1979, **139**:627-628.
50. Duggan P: **Time to abolish "gold standard"**. *BMJ* 1992, **304**:p. 1568-1569.
51. Versi E: **"Gold standard" is an appropriate term**. *BMJ* 1992, **305**:187.
52. Timmermans S, Berg M: *The gold standard: the challenge of evidence-based medicine and standardization in health care; ISBN 1-59213-187-5*. Temple University Press; 2003.
53. Planche T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher JF, Ngou-Milama E, Kreamsner PG: **Comparison of methods for the rapid laboratory**

- assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**:599-602.
54. White NJ, Krishna S: **Treatment of malaria: some considerations and limitations of the current methods of assessment.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989, **83**:767-777.
55. **Severe falciparum malaria.** World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94 Suppl 1**:S1-90.
56. Jamjoom GA: **Formation and role of malaria pigment.** *Rev Infect Dis* 1988, **10**:1029-1034.
57. Silamut K, White NJ: **Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **87**:436-443.
58. Metzger WG, Mordmuller BG, Kremsner PG: **Malaria pigment in leucocytes.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995, **89**:637-638.
59. Day NP, Pham TD, Phan TL, Dinh XS, Pham PL, Ly VC, Tran TH, Nguyen TH, Bethell DB, Nguyen HP, White NJ: **Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria.** *Blood* 1996, **88**:4694-4700.
60. Jamjoom GA: **Patterns of pigment accumulation in Plasmodium falciparum trophozoites in peripheral blood samples.** *Am J Trop Med Hyg* 1988, **39**:21-25.
61. Rebelo M, Shapiro HM, Amaral T, Melo-Cristino J, Hanscheid T: **Haemozoin detection in infected erythrocytes for Plasmodium falciparum malaria diagnosis-prospects and limitations.** *Acta Trop*, **123**:58-61.
62. Noedl H, Wongsrichanalai C, Miller RS, Myint KS, Looareesuwan S, Sukthana Y, Wongchotigul V, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH: **Plasmodium falciparum: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II.** *Exp Parasitol* 2002, **102**:157-163.
63. Dobeli H, Itin C, Meier B, Certa U: **Is Plasmodium falciparum aldolase useful for rational drug design?** *Acta Leiden* 1991, **60**:135-140.
64. Lee N, Baker J, Bell D, McCarthy J, Cheng Q: **Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:4547-4549.
65. Grobusch MP, Hanscheid T, Zoller T, Jelinek T, Burchard GD: **Rapid immunochromatographic malarial antigen detection unreliable for detecting Plasmodium malariae and Plasmodium ovale.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, **21**:818-820.
66. Moody A: **Rapid diagnostic tests for malaria parasites.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:66-78.
67. Risch L, Bader M, Huber AR: **Self-use of rapid tests for malaria diagnosis.** *Lancet* 2000, **355**:237.
68. Grobusch MP, Jelinek T, Hanscheid T: **False positivity of rapid antigen detection tests for diagnosis of Plasmodium falciparum malaria:**

- issue appears to be more complicated than presented. *J Clin Microbiol* 1999, **37**:3781-3782.
69. Grobusch MP, Alpermann U, Schwenke S, Jelinek T, Warhurst DC: **False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor.** *Lancet* 1999, **353**:297.
70. Grobusch MP, Hanscheid T, Gobels K, Slevogt H, Zoller T, Rogler G, Teichmann D: **Comparison of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travellers returning to Berlin, Germany.** *Parasitol Res* 2003, **89**:354-357.
71. Weiss JB: **DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections.** *Clin Microbiol Rev* 1995, **8**:113-130.
72. Barker RH, Jr., Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwuntragoon K, Wirth DF: **A simple method to detect Plasmodium falciparum directly from blood samples using the polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 1992, **46**:416-426.
73. Barker RH, Jr., Suebsaeng L, Rooney W, Alecrim GC, Dourado HV, Wirth DF: **Specific DNA probe for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria.** *Science* 1986, **231**:1434-1436.
74. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**:315-320.
75. Adegnika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LP, Ramharter M, Frolich M, Issifou S, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M: **Microscopic and sub-microscopic Plasmodium falciparum infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:798-803.
76. Hanscheid T: **Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy.** *Clin Lab Haematol* 1999, **21**:235-245.
77. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN: **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* 1993, **58**:283-292.
78. Makler MT, Gibbins B: **Laboratory diagnosis of malaria.** *Clin Lab Med* 1991, **11**:941-956.
79. Gay F, Traore B, Zanoni J, Danis M, Fribourg-Blanc A: **Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:516-518.
80. Jones D, Nyalwidhe J, Tetley L, Barrett MP: **McArthur revisited: fluorescence microscopes for field diagnostics.** *Trends Parasitol* 2007, **23**:468-469.
81. Kawamoto F, Billingsley PF: **Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy.** *Parasitol Today* 1992, **8**:69-71.
82. Lowe BS, Jeffa NK, New L, Pedersen C, Engbaek K, Marsh K: **Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional**

- Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:34-36.
83. Wongsrichanalai C, Chuanak N, Webster HK, Timasarn K: **Rapid test for malaria diagnosis.** *Lancet* 1992, **339**:1176.
84. Kawamoto F: **Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter.** *Lancet* 1991, **337**:200-202.
85. Wongsrichanalai C, Pornsilapatip J, Namsiripongpun V, Webster HK, Luccini A, Pansamdang P, Wilde H, Prasittisuk M: **Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in populations with low-density parasitemia.** *Am J Trop Med Hyg* 1991, **44**:17-20.
86. Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL: **Detection of haematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes.** *Parasitol Today* 1989, **5**:132-134.
87. Wongsrichanalai C, Namsiripongpun V, Pornsilapatip J, Kyle DE, Wilde H: **Sensitivity of QBC malaria test.** *Lancet* 1992, **340**:792-793.
88. Anthony RM, Kolk AH, Kuijper S, Klatser PR: **Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of Mycobacterium tuberculosis.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, **10**:1060-1062.
89. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins M, Aziz MA, Pai M: **Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review.** *Lancet Infect Dis* 2006, **6**:570-581.
90. Kawamoto F: **Rapid Detection of Plasmodium by a New 'Thick Smear' Method using Transmission Fluorescence Microscopy: Direct Staining with Acridine Orange.** *J Protozool Res* 1991, **2**:27-34.
91. Fischer: **Weltalmanach.** *Fischer Taschenbuch Verlag in der S Fischer Verlag GmbH, Frankfurt am Main* 2010.
92. Deutsche Stiftung Weltbevölkerung: **Soziale und demographische Daten zur Weltbevölkerung.** *DSW-Datenreport* 2009.
93. **Auswärtiges Amt: Länderinformation: Gabun, besucht am 26.06.2013** [<http://www.auswaertiges-amt.de/diplo/de/Laenderinformationen/01-Laender/Gabun.html>]
94. Munz J, Munz W: **Mit dem Herzen einer Gazelle und der Haut eines Nilpferds, Albert Schweitzer in seinen letzten Lebensjahren und die Entwicklung seines Spitals bis zur Gegenwart.** *Verlag Huber, Frauenfeld* 2005.
95. **WHO Factsheet of health statistics Gabon, besucht am 26.06.2013** [<http://www.afro.who.int/en/gabon/country-health-profile.html>]
96. Elissa N, Karch S, Bureau P, Ollomo B, Lawoko M, Yangari P, Ebang B, Georges AJ: **Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooue, Gabon.** *J Am Mosq Control Assoc* 1999, **15**:15-23.
97. Sylla EH, Kun JF, Kremsner PG: **Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**:652-656.

98. World Medical Association General Assembly: **Declaration of Helsinki**. <http://www.wmanet/en/30publications/10policies/b3/indexhtml> Seoul Oktober 2008.
99. European Medicines Agency: **ICH-Guidelines Good Clinical Practice**. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/013595en.pdf> 2002.
100. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD): **OECD-Grundsätze der guten Laborpraxis**. [http://www.oecd.org/olis/1998docnsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/04B94848PDF](http://www.oecd.org/olis/1998docnsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/04B94848PDF) 1997.
101. World Health Organization: *Basic Malaria Microscopy*, ISBN: 9789241544306. Geneva, 1991.
102. Neville DM, Jr., Davies DR: **The interaction of acridine dyes with DNA: an x-ray diffraction and optical investigation**. *J Mol Biol* 1966, **17**:57-74.
103. Darzynkiewicz Z: **Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange**. *Methods Cell Biol* 1990, **33**:285-298.
104. Lerman LS: **Structural considerations in the interaction of DNA and acridines**. *J Mol Biol* 1961, **3**:18-30.
105. Makler MT, Palmer CJ, Ager AL: **A review of practical techniques for the diagnosis of malaria**. *Ann Trop Med Parasitol* 1998, **92**:419-433.
106. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, **51 Pt 1**:263-273.
107. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. *Science* 1985, **230**:1350-1354.
108. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, et al: **The real-time polymerase chain reaction**. *Mol Aspects Med* 2006, **27**:95-125.
109. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: **Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences**. *Biotechnology (N Y)* 1992, **10**:413-417.
110. Barker RH, Jr., Suebsaeng L, Rooney W, Wirth DF: **Detection of Plasmodium falciparum infection in human patients: a comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis**. *Am J Trop Med Hyg* 1989, **41**:266-272.
111. Le Pecq JB, Paoletti C: **[Interaction of ethidium hydrobromate (EH) with polyribonucleotides. Applications to the study of hybridization reactions]**. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1965, **260**:7033-7036.
112. Waring MJ: **Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids**. *J Mol Biol* 1965, **13**:269-282.
113. Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP: **Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide**. *J Androl* 1994, **15**:620-629.

114. Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R: **Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain.** *PCR Methods Appl* 1995, **4**:234-238.
115. Förster T: **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** *Annalen der Physik* 1948, **6**:55.
116. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:7276-7280.
117. Yao Y, Nellaker C, Karlsson H: **Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification.** *Mol Cell Probes* 2006, **20**:311-316.
118. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, et al: **3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:655-661.
119. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB: **Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:2657-2660.
120. Busch U: **PCR und Real-Time PCR.** *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik* 2010, **1**:S. 35-46.
121. Linz U, Degenhardt H: **[Polymerase chain reaction: an overview].** *Naturwissenschaften* 1990, **77**:515-530.
122. Bianca Holzapfel LW: **Die quantitative Real-Time-PCR.** *Biologie unserer Zeit* 2007, **Band 37** S. 120-126.
123. Seesod N, Nopparat P, Hedrum A, Holder A, Thaithong S, Uhlen M, Lundeberg J: **An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **56**:322-328.
124. Kain KC, Brown AE, Mirabelli L, Webster HK: **Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study.** *J Infect Dis* 1993, **168**:1323-1326.
125. Long GW, Fries L, Watt GH, Hoffman SL: **Polymerase chain reaction amplification from *Plasmodium falciparum* on dried blood spots.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**:344-346.
126. Niesters HG: **Clinical virology in real time.** *J Clin Virol* 2002, **25 Suppl 3**:S3-12.
127. Wiria AE, Prasetyani MA, Hamid F, Wammes LJ, Lell B, Ariawan I, Uh HW, Wibowo H, Djuardi Y, Wahyuni S, et al: **Does treatment of intestinal helminth infections influence malaria? Background and methodology of a longitudinal study of clinical, parasitological and immunological parameters in Nangapanda, Flores, Indonesia (ImmunoSPIN Study).** *BMC Infect Dis*, **10**:77.
128. Oyakhirrome S, Profanter K, Kreamsner PG: **Assessment of fever in African children: implication for malaria trials.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **82**:215-218.

129. Cohen J: **A coefficient of agreement for nominal scales.** *Educational and Psychological Measurement* 1960, **20**:37-46.
130. Bland JM, Altman DG: **Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.** *Lancet* 1986, **1**:307-310.
131. Kaplan EL, Meier P: **Nonparametric estimation from incomplete observations.** *J Amer Statist Assn* 1958, **53**:457-481.
132. Schmidt R, Lang F, Heckmann M: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010.
133. Mantel N: **Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration.** *Cancer Chemother Rep* 1966, **50**:163-170.
134. Htut Y, Aye KH, Han KT, Kyaw MP, Shimono K, Okada S: **Feasibility and limitations of acridine orange fluorescence technique using a Malaria Diagnosis Microscope in Myanmar.** *Acta Med Okayama* 2002, **56**:219-222.
135. Keiser J, Utzinger J, Premji Z, Yamagata Y, Singer BH: **Acridine Orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:643-654.
136. Clendennen TE, 3rd, Long GW, Baird JK: **QBC and Giemsa-stained thick blood films: diagnostic performance of laboratory technologists.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995, **89**:183-184.
137. Bustin SA, Mueller R: **Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis.** *Clin Sci (Lond)* 2005, **109**:365-379.
138. Oliveira DA, Shi YP, Oloo AJ, Boriga DA, Nahlen BL, Hawley WA, Holloway BP, Lal AA: **Field evaluation of a polymerase chain reaction-based nonisotopic liquid hybridization assay for malaria diagnosis.** *J Infect Dis* 1996, **173**:1284-1287.
139. Landis JR, Koch GG: **The measurement of observer agreement for categorical data.** *Biometrics* 1977, **33**:159-174.
140. Shute GT, Sodeman TM: **Identification of malaria parasites by fluorescence microscopy and acridine orange staining.** *Bull World Health Organ* 1973, **48**:591-596.
141. Dr. Adzoda GKA, Médecin chef.: **Rapport annuel des activités médicales 2010.** Lambaréné: Albert-Schweitzer-Hospital; 2010.
142. Long GW, Jones TR, Rickman LS, Trimmer R, Hoffman SL: **Acridine orange detection of Plasmodium falciparum malaria: relationship between sensitivity and optical configuration.** *Am J Trop Med Hyg* 1991, **44**:402-405.
143. EB: **Fluoreszenzmikroskopie: Nachrüstsatz für Lichtmikroskope.** *Dtsch Arztebl* 2009, **106(18)**:A-890.
144. Affolabi D, Torrea G, Odoun M, Senou N, Ali Ligali M, Anagonou S, Van Deun A: **Comparison of two LED fluorescence microscopy build-on modules for acid-fast smear microscopy.** *Int J Tuberc Lung Dis*, **14**:160-164.

- 
145. Van Deun A, Chonde TM, Gumusboga M, Rienthong S: **Performance and acceptability of the FluoLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2008, **12**:1009-1014.
  146. Gendrel D, Kombila M, Richard-Lenoble D: **When is fever malaria?** *Lancet* 1992, **339**:691.
  147. Delacollette C, Van der Stuyft P: **Direct acridine orange staining is not a 'miracle' solution to the problem of malaria diagnosis in the field.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994, **88**:187-188.
  148. Rickman LS, Long GW, Oberst R, Cabanban A, Sangalang R, Smith JI, Chulay JD, Hoffman SL: **Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites.** *Lancet* 1989, **1**:68-71.
  149. Spielman A, Perrone JB, Teklehaimanot A, Balcha F, Wardlaw SC, Levine RA: **Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood.** *Am J Trop Med Hyg* 1988, **39**:337-342.

---

## 7 Veröffentlichung

---

Dominic Lenz<sup>1,2</sup>, Peter G Kremsner<sup>1, 2</sup>, Bertrand Lell<sup>1, 2</sup>, Barbara Biallas<sup>1, 2</sup>,  
Michael Boettcher<sup>1, 2</sup>, Benjamin Mordmüller<sup>1,2</sup>, Ayola Akim Adegnika<sup>1, 2, 3</sup>

**Assessment of LED fluorescence microscopy for the diagnosis of  
*Plasmodium falciparum* infections in Gabon,**

Malaria Journal 2011 July 18;10:194.

<sup>1</sup> Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambaréné, Gabon

<sup>2</sup> Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Germany

<sup>3</sup> Department of Parasitology, Leiden University Medical Center,  
The Netherlands

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1-1 Globale Malaria-Verteilung .....	8
Abbildung 1-2 Entwicklungszyklus von <i>Plasmodium</i> spp. ....	9
Abbildung 1-3 Dicker Tropfen mit <i>Plasmodium falciparum</i> -Befall.....	15
Abbildung 1-4 Schnelltest auf ELISA-Basis.....	16
Abbildung 2-1 Topographische Landkarte von Gabun .....	24
Abbildung 2-3 Polymerase Kettenreaktion .....	33
Abbildung 2-4 FRET-Effekt:.....	35
Abbildung 2-5 FRET-Sonden in der Real-Time PCR .....	36
Abbildung 3-1 Bland-Altman-Plot der $\log_{10}$ -transformierten Parasitämien.....	52
Abbildung 3-2 Bland-Altman-Plot der $\log_{10}$ -transformierten Parasitämien.....	53
Abbildung 3-3 Interrater-Reliabilität. ....	56
Abbildung 3-4 Lese- und Gesamtzeiten nach Methoden.....	58
Abbildung 3-5 Kaplan-Meier-Kurve der Parasitendetektionszeit .....	59

---

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 2.1 Materialien für die DNA-Extraktion.....	38
Tabelle 2.2 PCR-Mix für rtPCR .....	39
Tabelle 2.3 Primer & Sonden für die qRT-PCR von Operon .....	40
Tabelle 3.1 Geschlecht, Alter und Station der Population .....	45
Tabelle 3.2 Blutwerte der Studienteilnehmer.....	46
Tabelle 3.3 Studien-Teilnehmer nach Symptomen [absolute Anzahl (in %) ]...	47
Tabelle 3.4 Klinische Diagnosen [absolut (in %) ] .....	47
Tabelle 3.5 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte .....	48
Tabelle 3.6 Nicht übereinstimmende Resultate .....	49
Tabelle 3.7 Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewerte II.....	50
Tabelle 3.8 Cohens Kappa Koeffizient der Übereinstimmung .....	50
Tabelle 3.9 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in ledFM.....	55
Tabelle 3.10 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in LM.....	55
Tabelle 3.11 Wiederholbarkeit der Ergebnisse in ledFM .....	57
Tabelle 3.12 Aufstellung der Materialkosten für Acridinorange- & Giemsa .....	60
Tabelle 3.13 Fragebogen zur subjektiven Beurteilung der Methoden .....	61

## Anhang

Fragebogen zur subjektiven Beurteilung der Methoden									
	Leser 1			Leser 2			Gesamt		
	LM	uv FM	led FM	LM	uv FM	led FM	LM	uv FM	led FM
Mikroskopische Fähigkeiten (0-10)	7			6					
Erfahrung in Jahren	1,5			0,7					
Fähigkeit allgemein (0-10)	7	5	7	7	5	7	7	5	7
Schnelligkeit allgemein (0-10)	7	4	7	8	3	7	7,5	3,5	7
Parasiten-Detektionszeit (0-10)	7	4	7	6	3	7	6,5	3,5	7
Einfache Erlernbarkeit (0-10)	8	5	7	6	3	7	7	4	7
Mögliche tägliche Routine (0-10)	10	3	6	9	1	8	9,5	2	7
Nicht ermüdend (0-10)	8	3	7	5	2	7	6,5	2,5	7
Klares Bild (0-10)	7	2	7	10	1	8	8,5	1,5	7,5
Klarer Aspekt der Parasiten (0-10)	7	3	8	8	4	9	7,5	3,5	8,5
Sicherheit der Diagnostik (0-10)	9	2	7	8	3	8	8,5	2,5	7,5
Artendifferenzierung (0-10)	9	0	0	7	3	5	8	1,5	2,5
Allgemeines Resumee	7,9	3,1	6,3	7,4	2,8	7,3	7,65	2,95	6,8

### Aufstellung der Materialkosten für Acridinorange- & Giemsa

ohne Berücksichtigung der Anschaffungskosten des Mikroskops, bei Annahme einer Kapazität von 20 Slides pro angesetzte Giemsa-Färbung.

iLED	Packungspreis / €	Kosten in € / Untersuchung
Primo Star iLED (FIND)	(1250)	<i>Nicht eingerechnet</i>
Eukitt Quick hardening mounting medium 100ml (SIGMA)	23,9	<i>Nur zur Aufbewahrung</i>
Pipette 2-20µl (Abimed)	151	0,00604
Objektträger 50 Stück (Mediware)	1,49	0,0298
Deckgläser 100 Stück (LMS)	1	0,0100
PBS Puffer 10 l (Genaxxon)	43,89	0,0000
Acridine Orange 100g (Genaxxon)	93,92	0,0000
Pipettenspitzen 1000 Stück (Abimed)	11	0,0220
Immersionsöl 500ml (VWR)	53,1	0,0106
		0,0785
GIEMSA	Packungspreis / €	Kosten in € / Untersuchung
Olympus CX 21	(1160)	<i>Nicht eingerechnet</i>
Pipette 2-20µl (Abimed)	151	0,00604
Objektträger 50 Stück (Mediware)	1,49	0,0298
Pipettenspitzen 1000 Stück (Abimed)	11	0,0110
Giemsa Lsg. 500ml (Lehrmittelshop)	16,73	0,0697
Pufferlösung nach Weise 100 Tabletten (VWR)	77,4	0,0387
Immersionsöl 500ml (VWR)	53,1	0,0106
Aqua destillata für Weise-Lösung	selbst hergestellt	0,0000
		0,1659

---

## Erklärung zum Eigenanteil

---

Der Doktorand Dominic Lenz hat im Rahmen seiner Tätigkeiten an der Medical Research Unit des Tropeninstituts Tübingen am Albert-Schweitzer-Spital in Lambaréné/Gabun maßgeblich an der Konzeption, Durchführung und Veröffentlichung der oben genannten Studie mitgewirkt:

Dominic Lenz konzipierte in Zusammenarbeit mit Benjamin Mordmüller, Peter G Kremsner, Bertrand Lell, Michael Böttcher und Ayola Akim Adegnika die Studienexperimente. Gemeinsam mit Michael Böttcher und Ayola Akim Adegnika erarbeitete er den Antrag an die Ethikkommission in Lambaréné. Eigenständig führte er Pilotstudien durch, arbeitete sich in die verwendeten Labormethoden ein und verfeinerte diese. Die Experimente sowie die Datenerhebung wurden unter seiner Federführung gemeinsam mit Barbara Biallas durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Dominic Lenz, Benjamin Mordmüller und Ayola Akim Adegnika. Anschließend verfasste der Doktorand mithilfe von Benjamin Mordmüller das Manuskript der besagten Veröffentlichung. Bertrand Lell und Peter G Kremsner betreuten die Studie in Form von konzeptionell beratender und technischer Unterstützung.

---

## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Benjamin Mordmüller für die Ermöglichung der Dissertation und die hervorragende Betreuung in Lambaréné und Tübingen.

Mein Dank gebührt des Weiteren Prof. Dr. Peter Gottfried Kremsner für die Ermöglichung des Aufenthaltes in Lambaréné und die großzügige Überlassung des Themas.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Ayola Akim Adegnika und Dr. Bertrand Lell, die mir während des Aufenthaltes in Lambaréné geduldig bezüglich aller Fragen zum Studiendesign, der Planung sowie statistischen Auswertung der Studie zur Seite standen.

Ich danke all meinen Kollegen in Lambaréné, die diese Studie ermöglichten. Namentlich möchte ich hierbei folgende Personen erwähnen: Barbara Biallas, Dr. Michael Böttcher und Tedy Mabama.

Allen Teilnehmern, die an dieser Studie teilgenommen haben und sie somit erst ermöglicht haben, bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet.

Den größten Dank aber möchte ich meinen Eltern Mechtild und Ingolf Lenz aussprechen, die mich während meines gesamten Studiums mit Rat und Tat begleiteten und mich in allen Vorhaben unterstützten.

---

## Lebenslauf

---

Name: Dominic Andreas Lenz  
Geburtsdatum: 16. April 1984  
Geburtsort: Lörrach  
Nationalität: deutsch

### Schulische Ausbildung:

1990 – 1994 Hellberg-Grundschule in Lörrach-Brombach  
1994 – 2003 Hebelgymnasium Lörrach, Abitur mit der Note 1,0 (sehr gut)  
2003 – 2004 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Schopfheim

### Akademische Ausbildung:

2004 – 2011 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
2006 Erster Teil der ärztlichen Prüfung, M1, Note: sehr gut (1,0)  
2007 – 2008 Auslandstudienjahr: Université Montpellier I, Frankreich  
2009 Forschungsaufenthalt an der Medical Research Unit, Albert-Schweitzer-Spital, Lambaréné, Gabun  
GCP Course des African Malaria Network  
2010 – 2011 Praktisches Jahr am Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasilien und am Universitätsklinikum Heidelberg  
22.11.2011 Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung, M2, Note: sehr gut (1,5)  
15.02.2012 Ärztliche Approbation  
Seit 07/2012 Assistenzarzt am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Freiburg