

Aus dem Institut für Tropenmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulare Marker der Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegen
Sulfadoxin-Pyrimethamin bei Schwangeren in Ghana im Kontext
intermittierender präventiver Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Hommerich
aus Bergisch-Gladbach

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. P. Mockenhaupt
2. Prof. Dr. med. H.-W. Presber
3. Prof. Dr. med. T. Löscher

Datum der Promotion: 19.11.2010

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Zusammenfassung der Publikationspromotion	4
2.1	Titel.....	4
2.2	Autorin	4
2.3	Abstract	4
2.4	Einleitung.....	5
2.5	Zielstellung	7
2.6	Material und Methoden.....	8
2.7	Ergebnisse.....	10
2.8	Diskussion	14
2.9	Referenzen	17
3	Anteilerklärung.....	21
4	Drei Publikationen als Publikationsleistung.....	22
4.1	Publikation 1: Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Junge C, Hommerich L, Eggelte TA, Bienzle U. Markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistant <i>Plasmodium falciparum</i> in Placenta and Circulation of Pregnant Women. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 2007; 51:332-334 (IF 4,72).	22
4.2	Publikation 2: Hommerich L, von Oertzen C, Bedu-Addo G, Holmberg V, Acquah PA, Eggelte TA, Bienzle U, Mockenhaupt FP. Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. <i>Malar J</i> 2007; 6:144 (IF 2,91).	25
4.3	Publikation 3: Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Eggelte TA, Hommerich L, Holmberg V, von Oertzen C, Bienzle U. Rapid Increase in the Prevalence of Sulfadoxine- Pyrimethamine Resistance among <i>Plasmodium falciparum</i> Isolated from Pregnant Women in Ghana. <i>J Infect Dis</i> 2008; 198:1545-9 (IF 5,68).	34
5	Lebenslauf.....	40
6	Publikationsliste.....	41
7	Selbstständigkeitserklärung	42
8	Danksagung	43

2 Zusammenfassung der Publikationspromotion

2.1 Titel

Molekulare Marker der Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin bei Schwangeren in Ghana im Kontext intermittierender präventiver Therapie.

2.2 Autorin

Lena Hommerich

2.3 Abstract

Die Malaria in der Schwangerschaft ist ein bedeutendes Problem in Afrika südlich der Sahara. In den Endemiegebieten haben Schwangere, insbesondere Primigravide, ein erhöhtes Risiko für die Infektion mit *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Trotz häufig mildem oder asymptomatischem Verlauf für die Mutter können Fehl- und Totgeburten, intrauterine Wachstumsretardierung, niedriges Geburtsgewicht sowie Frühgeburtlichkeit resultieren. Dies trägt zu einer hohen Neugeborenen- und Säuglingssterblichkeit bei. Die Weltgesundheitsorganisation empfiehlt daher die intermittierende präventive Therapie in der Schwangerschaft (engl. *intermittent preventive treatment in pregnancy*, IPTp) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP). Dabei wird im zweiten und dritten Trimenon, ungeachtet einer Infektion, eine kurative Dosis SP gegeben. Diese Strategie ist aber durch die Ausbreitung parasitärer SP-Resistenz bedroht. Zwar bestehen mit den Punktmutationen im parasitären Dihydrofolatreduktase (*dhfr*)-Gen Marker für die SP-Resistenz; deren Anwendbarkeit für die in der Regel plazentar sequestrierten *P. falciparum*-Stämme ist jedoch unbekannt.

In Agogo, Ghana, wurde IPTp mit SP Ende 2004 eingeführt. In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit drei Fragestellungen bearbeitet: 1) Die Untersuchung der Entwicklung klinisch-parasitologischer Parameter bei Gebärenden und Schwangeren aus den Jahren 1998, 2000 und 2006. 2) Die Untersuchung der Verlässlichkeit peripher-venös gewonnener Isolate zur Bestimmung der SP-Resistenzmarker bei Schwangeren vorliegender Parasitenstämme. 3) Die Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Häufigkeit laut Genotypmuster SP-resistenter Stämme.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Einführung von IPTp mit SP die Prävalenzen von *P. falciparum*-Infektion und mütterlicher Anämie signifikant abnahmen und das mittlere Geburtsgewicht stieg. Nach Typisierung mittels PCR-RFLP zeigte sich zwischen plazentaren und peripher-venös gewonnenen Isolaten von *P. falciparum* eine hohe Konkordanz: Die klinische SP-Resistenz vermittelnde *dhfr*-Dreifachmutation plazentarer Parasiten wurde in 91.6% der

Fälle im peripheren Blut korrekt ermittelt. Dies ermöglichte, darzustellen, dass sich der Anteil dieser resistenten Variante von 1998 bis 2006 von 36.0% auf 73.0% verdoppelt hatte. Es wurde aber kein Anhalt für eine Selektion resistenter Parasiten durch IPTp gefunden.

IPTp hat zu einer deutlichen Verbesserung klinisch-parasitologischer Parameter im Studiengebiet geführt. Dem steht allerdings eine deutliche Zunahme von SP-Resistenz entgegen. Die Untersuchungen zeigen, dass diese durch die Typisierung peripher-venöser Isolate Schwangerer erfassbar ist. Dringend notwendig ist nun die Bestimmung des Verhältnisses der parasitären *dhfr*-Allele zur Effektivität von IPTp mit SP. Die SP-Resistenz wird aber voraussichtlich an Intensität und Verbreitung zunehmen. Ergänzende Präventionsstrategien und alternative Malariamedikamente stehen daher für die Kontrolle der Malaria in der Schwangerschaft im Vordergrund.

2.4 Einleitung

Die Malaria ist eine durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursachte Infektionskrankheit. Sie stellt weltweit die wichtigste parasitäre Erkrankung dar. Nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung lebt in tropischen und subtropischen Risikogebieten, in denen die Malaria übertragen wird. Jährlich erkranken ca. 500 Millionen Menschen, davon verlaufen 1-3 Millionen Erkrankungen tödlich. [1-4] Betroffen sind vorwiegend Kinder und schwangere Frauen. [5-8]

Die Infektion mit *P. falciparum* verursacht die Malaria tropica, die schwerste Form, die für den ganz überwiegenden Teil der Todesfälle verantwortlich ist. [9] Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten exprimieren auf deren Oberfläche Rezeptoren, die die Bindung an endotheliale Oberflächen des Wirts vermitteln. Die daraus resultierende Sequestrierung im tiefen Kapillarbett mit nachfolgenden Mikrozirkulationsstörungen erklärt einen großen Teil der Pathophysiologie der so genannten schweren und komplizierten Malaria tropica. Eine der gefährlichsten Komplikationen ist dabei die zerebrale Malaria mit Bewusstseinsstörungen und generalisierten Krampfanfällen. [10-11] In der Regel weniger dramatisch, aber ebenfalls von erheblicher klinischer und epidemiologischer Bedeutung, ist die Sequestrierung infizierter Erythrozyten in der Plazenta, was die so genannte „plazentare Malaria“ verursacht. [12-15]

Jedes Jahr werden in den Malariaendemiegebieten annähernd 30 Millionen Frauen schwanger. [16] Malaria in der Schwangerschaft ist eine der Hauptgründe für die hohe mütterliche, fetale und frühkindliche Morbidität und Mortalität in Afrika südlich der Sahara. [7-8,17-18] In den Hochendemiegebieten verfügen die Schwangeren zwar in der Regel über eine klinische Immunität, nicht aber über Mechanismen, die die plazentare Malaria, also die Sequestrierung von Parasitenklonen mit spezifischen Rezeptoren für Plazentaoberflächenmoleküle, verhindern.

Besonders gefährdet sind Erstgebärende. [8, 19-21] Bei weitgehendem Fehlen sonstiger Symptome kommt es häufig zu mütterlicher Anämie und neben Aborten und Totgeburten v. a. zu intrauteriner Wachstumsretardierung, niedrigem Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit. Als direkte und indirekte Folgen der Malaria in der Schwangerschaft werden jährlich 200.000 Todesfälle im Säuglingsalter geschätzt. [7-8, 17, 22-23]

Aufgrund des hohen Risikos für Schwangere in Hochendemiegebieten empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation dort als Prophylaxe der Malaria in der Schwangerschaft die so genannte intermittierende präventive Therapie mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) (engl. *intermittent preventive treatment in pregnancy*; IPTp). [24] Die Strategie der IPTp sieht eine 2-3-malige Gabe einer Einmaldosis von SP im zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft vor, unabhängig von einer nachgewiesenen Parasitämie. Es konnte gezeigt werden, dass es unter IPTp zu einer Abnahme der plazentaren Malaria und der mütterlichen Anämie sowie zu einer Zunahme des Geburtsgewichtes kommt. [25-30] Viele der klinischen Untersuchungen zur Effektivität von IPTp mit SP wurden in Ostafrika durchgeführt. Der Nachweis der Effektivität nach Einführung von IPTp mit SP ist in Westafrika wesentlich schlechter dokumentiert. [31-32] In Ghana, wo eine Malaria in der Schwangerschaft sowie die damit verbundene Morbidität häufig ist, wurde IPTp als Präventionsstrategie Ende 2004 eingeführt.

Ein zunehmendes Problem generell und für IPTp im speziellen ist die Resistenzentwicklung gegen SP. [33-34] Die SP-Resistenz ist mit spezifischen Mutationen der für die *P. falciparum* Dihydrofolatreduktase und Dihydrooatsynthetase codierenden Gene (*dhfr*, *dhps*) assoziiert. [35] In Ghana konnte 2002 bei 28.0% der mit SP behandelten Kinder ein Behandlungsversagen beobachtet werden. Eine *dhfr*-Dreifachmutation (Ile51, Arg59, Asn108) erhöhte das Risiko eines Therapieversagens um das 10-fache. [36] Für die Wirksamkeit von SP bei Schwangeren oder für IPTp mit SP liegen keine derartigen Daten im Zusammenhang mit *dhfr/dhps* Mutationen vor. Zudem ist eine durchgängige Kontrolle der Wirksamkeit der IPTp-Strategie lokal oder zumindest regional notwendig, um Entwicklungen zu nachlassender Effektivität frühzeitig zu erfassen. Eine bestehende hohe Prävalenz von Infektionen durch *P. falciparum* in der Schwangerschaft sollte zudem Anlass zur Optimierung und Nutzung alternativer Präventionsstrategien sein, wie der regelmäßigeren Gebrauch eines Moskitonetzes und die mögliche Einführung neuer alternativer Antimalariamedikamente. [37]

2.5 Zielstellung

1. Untersuchung *Plasmodium falciparum*-assoziierter klinischer und parasitologischer Parameter vor und nach Einführung von IPTp mit SP in Agogo, Ghana.

In Agogo, Ghana, wurde IPTp mit SP 2004 eingeführt. Die Auswirkungen auf klinischer und parasitologischer Ebene sollen durch den Vergleich von Probandinnen aus Zeiträumen vor und nach dieser Einführung dargestellt werden.

2. Spiegelt die Resistenztypisierung von *Plasmodium falciparum* aus einem peripher gewonnenen Isolat das Gesamtbild einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* bei Schwangeren wider?

Während der Schwangerschaft sind nur peripher-venöse Isolate von *P. falciparum* zugänglich. Die plazentare Sequestrierung des Erregers kann einen Einfluss auf die im peripheren Blut nachweisbaren Stämme und damit auf den Nachweis molekularer Resistenzmarker haben. Dies soll bei Patientinnen mit Nachweis von *P. falciparum* im plazentaren als auch im peripheren Blut untersucht werden. Das Ergebnis hat Bedeutung für die allgemeine Anwendbarkeit der im peripheren Blut typisierbaren Resistenzmarker.

3. Zeitlicher Verlauf des Anteils SP-resistenter *Plasmodium falciparum*-Stämme vor und nach Einführung von IPTp SP in Agogo, Ghana.

P. falciparum-Isolate aus den Jahren 1998, 2000, und 2006 (also nach Einführung von IPTp) sollen hinsichtlich ihres dhfr-Musters untersucht werden, um einen resistenz-selektierenden Effekt der Einführung von IPTp abzuschätzen.

2.6 Material und Methoden

Studiengebiet

Agogo ist eine Stadt mit ca. 30.000 Einwohnern im Asante Akim North District in der Ashanti Region in Ghana. Die Vegetation wird durch sekundären Regenwald bestimmt. Das Gebiet ist hinsichtlich der Malaria hyper- bis holoendemisch. Mehr als 90% der Infektionen werden durch *P. falciparum* verursacht. Die höchsten Transmissionsraten werden in der Regenzeit zwischen Mai und Oktober beobachtet. [38] Agogo liegt etwa 80 Kilometer östlich der Regionalhauptstadt Kumasi. Das Presbyterian Mission Krankenhaus in Agogo wurde 1931 gegründet und ist das älteste Missionskrankenhaus in Ghana. Die hier dargestellten Studien wurden dort in den Jahren 1998, 2000-2001 und 2006 durchgeführt. Die Planung und Durchführung der Studien erfolgte in Kooperation zwischen dem Institut für Tropenmedizin, Charité, Berlin, dem Presbyterian Mission Hospital Agogo und der School of Medicine, University of Science and Technology, Kumasi. Die Studienprotokolle wurden durch die Ethikkommission der University of Science and Technology, Kumasi, geprüft und genehmigt.

Studienpopulation

Im Jahr 1998 wurden 530 Frauen im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge, unabhängig vom Gestationsalter, in eine deskriptive Studie zur Prävalenz der Malaria in der Schwangerschaft eingeschlossen.

In einer Nachfolgestudie von Januar 2000 bis Januar 2001 wurden insgesamt 839 gebärende Frauen und deren Kinder im Rahmen einer Studie zur Manifestation der Malaria in der Schwangerschaft untersucht.

Im Jahre 2006 wurden unter Beteiligung der Verfasserin 277 Frauen in der Frühschwangerschaft (<27. Schwangerschaftswoche (SSW)) und 226 gebärende Frauen mit ihren Kindern untersucht.

Fast alle untersuchten Probandinnen stammten aus Agogo und dem ländlichen Einzugsgebiet. Die Einwilligung der teilnehmenden Frauen wurde in Form von Aufklärungsbögen schriftlich dokumentiert.

Anamnese und Untersuchungsgang

Eine ausführliche Anamnese und die klinischen Untersuchungen erfolgten durch das Personal der Abteilung für Geburtshilfe des Presbyterian Mission Hospital in Agogo. Die anamnestisch erhobenen Daten über Herkunft der Frauen, Alter, Parität, Ausbildungsstand, Anzahl der bereits

erfolgten Schwangerschaftsvorsorgetermine und der bisherigen Einnahme von Antimalariamedikamenten wurden dokumentiert. Die Körpertemperatur wurde axillär gemessen und Fieber als $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ definiert. Eine periphere Blutprobe wurde in EDTA-Röhrchen entnommen. Eine weitere EDTA-Blutprobe wurde in der Gruppe der gebärenden Frauen nach der Geburt aus der maternalen Seite der Plazenta gewonnen. Die Untersuchung der Kinder erfolgte unmittelbar nach der Geburt. Zur Bestimmung des Reifegrades diente der Finnström Score (1977). Ein ermitteltes Gestationsalter von <37 Wochen galt als Frühgeburt und ein Geburtsgewicht <2500 Gramm als niedriges Geburtsgewicht. Der Hämoglobingehalt (Hb) wurde mit dem HemoCue Photometer bestimmt (Ångelholm, Schweden). [39] Eine Anämie wurde mit einem Hb $<11\text{g/dl}$, eine schwere Anämie mit einem Hb $<7\text{g/dl}$ definiert. [40] Alle Blutproben wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ in Agogo und später bei -20°C in Kumasi gelagert und auf Trockeneis nach Berlin transportiert.

Erregernachweis

Von jeder Blutprobe wurde ein „Dicker Tropfen“ zur Bestimmung der Parasitendichte und zur Differenzierung der Spezies ein Ausstrich angefertigt. In dem mit Giemsa gefärbten „Dicken Tropfen“ des peripheren Blutes wurde mit einem Lichtmikroskop (Zeiss) die Zahl der Parasiten pro 500 Leukozyten bestimmt. Zur Bestimmung der plazentaren Parasitendichte wurde die Parasitenanzahl pro 100 Blickfelder bestimmt. Zur Beurteilung des zeitlichen Stadiums einer *P. falciparum*-Infektion wurde das Malariapigment herangezogen. Das Stadium der plazentaren Infektion wurde kategorisiert als frühe Infektion (Nachweis von Parasiten), späte Infektion (Nachweis von Parasiten und Malariapigment) und als Infektion in Abheilung (alleiniger Nachweis von Malariapigment). Als weitere Nachweismethode einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* diente ein Malaria-Schnelltest. Im Jahr 2000 wurde der ICT Malaria P.f./P.v Test (Becton Dickinson, Deutschland) und im Jahr 2006 der Malaria NOW Pf./P.v Test (Inverness Medical, Deutschland) verwendet. $15\mu\text{l}$ plazentares Blut wurden auf die mit kolloidalen Antikörpern behafteten Testkarten gegeben. Bei *P. falciparum*-Positivität spiegeln sich die Antigen-Antikörper-Komplexe in Form eines sichtbaren Teststreifens wider. Ein *P. falciparum*-Nachweis wurde nur als positiv dokumentiert, wenn sowohl die HRP2 (Histidine Rich Protein) Linie als auch der Kontrollstreifen sichtbar waren. [41-42]

Resistenztypisierung

Am Institut für Tropenmedizin Berlin erfolgte zunächst die Extrahierung der DNA mittels *QIAamp Blood Kit* (Qiagen, Hilden). Zur Diagnosesicherung sowie zum Nachweis submikroskopischer Infektionen erfolgten Untersuchungen mittels PCR (engl. *polymerase chain reaction*) als

hochsensitive Methode zum Nachweis kleinster Mengen genetischen Materials. Zum Nachweis der *dhfr*-Mutationen Ser108Asn, Asn511Ile und Cys59Arg wurde zunächst eine geschachtelte PCR durchgeführt. Im Anschluss folgte der Einsatz von für die jeweiligen Mutationen spezifische Endonukleasen und deren Darstellung als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in der Gelelektrophorese. [43-46] Gemischte Isolate mit sowohl einem mutierten als auch einem Wildtyp-Allel wurden als mutiert definiert. Im Zusammenhang mit der Typisierung der Medikamentenresistenz wurden die Konzentrationen von Chloroquin und Pyrimethamin im Plasma mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) gemessen (Dr. T.A. Eggelte, Department of Clinical Pharmacology, Academic Medical Centre, University of Amsterdam). [47]

Statistik

Mit dem Chi-Quadrat-Test wurden die Verteilungseigenschaften der Studienpopulationen untersucht. Zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen wurde weiter mit dem Mann-Whitney-U-Test gearbeitet und dem Kruskal-Wallis-Test, der ähnlich wie der Mann-Whitney-U-Test vergleicht, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich ihrer ordinalskalierten Variable unterscheiden.

2.7 Ergebnisse

Vergleich der Kenndaten von 1998-2006

Im Folgenden werden klinische und parasitologische Daten schwangerer und gebärender Frauen vor und nach Einführung von IPTp SP verglichen. Es wurde zudem untersucht, ob die Anzahl der eingenommen Dosen SP mit einer Verbesserung der Kenndaten einhergeht. 1998 berichteten 42.0% und 2000 alle teilnehmenden Frauen über die wöchentliche Einnahme von 25 mg Pyrimethamin als Chemoprophylaxe einer Malaria. Im Jahr 2006, also ein Jahr nach Implementierung von IPTp mit SP, wurde keine Chemoprophylaxe eingenommen, aber die Anwendung von IPTp wurde bei 76.5% der Gebärenden dokumentiert. 23.0% der schwangeren Frauen in 2006 verneinten sowohl eine Chemoprophylaxe als auch die Anwendung von IPTp SP.

Die grundlegenden klinischen Charakteristika der Probandinnen von 1998 bis 2006 sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Statistisch signifikante Unterschiede im Alter der untersuchten Frauen bestanden nicht. Der Anteil der Erstgebärenden aller rekrutierten Probandinnen nahm über die Jahre zu. Von 1998 bis 2006 nahm der mittlere Hb-Wert statistisch signifikant zu und die jeweiligen Anteile von mütterlicher Anämie und niedrigem Geburtsgewicht ab (Tabelle 1).

Tabelle 1. Charakteristika schwangerer und gebärender Frauen in Agogo, Ghana 1998-2006

Charakteristika	ANC	Geburten	ANC	Geburten	p-Wert
	1998	2000	2006	2006	
Anzahl (n)	530	839	277	226	
Alter(Jahre) Mtw.	26.6	26.2	27.3	26.9	.03
Gravidität Mtw.	3	2	2	2	<.0001
Primigravidae/parae	130	304	89	74	<.0001
ANC, Mtw.	1	4	1	4	<.0001
>3 Besuche	45/530	429/821	6/277	131/223	<.0001
GBW-Mtw. (g)	n.a.	2950	n.a.	3080	.02
LBW	n.a.	134/838	n.a.	28/225	.19
Hb- Wert Mtw. g/dl	10.7	11.5	11.7	12.0	<.0001
Anämie					
<11g/dl	284/530	295/839	90/277	53/226	<.0001
<7g/dl	5/530	15/839	1/277	0/226	.03
Fieber	79/530	23/826	4/277	15/226	<.0001

ANC: engl. Antenatal Care: dt.: Schwangerschaftsvorsorge, Mtw: Mittelwert, GBW; Geburtsgewicht, n.a.: engl. not available: dt.: keine Daten verfügbar, LBW: engl. Low Birth Weight; dt: niedriges Geburtsgewicht<2500g, Hb: Hämoglobinkonzentration, p-Wert: χ^2 -Test für Trend. Zum Vergleich wurden die Daten der beiden Gruppen von 2006 zusammengefasst. Daten zur Gravidität wurden in der Gruppe der Schwangerschaftsvorsorge erhoben, die Daten zur Parität in der Gruppe der gebärenden Frauen.

Die Häufigkeiten des Nachweises von *P. falciparum* bei Schwangeren und Gebärenden von 1998 bis 2006 sind in Tabelle 2 dargestellt. Insgesamt bestand ein abnehmender Trend für die *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft (PCR, $p<0.0001$). Nach Einführung von IPTp mit SP wurde eine plazentare *P. falciparum*-Infektion signifikant seltener dokumentiert. Der diesbezügliche Unterschied zwischen den Jahren 2000 und 2006 war für alle diagnostischen Methoden statistisch signifikant (jeweils: $p<0.0001$), nicht aber für die Ergebnisse der „Dicken Tropfen“ aus peripher-venösem Blut ($p=0.13$).

Tabelle 2. Nachweis von *Plasmodium falciparum* bei Schwangeren von 1998 bis 2006

	ANC 1998	Geburten 2000	ANC 2006	Geburten 2006
Anzahl (n)	530	839	277	226
Peripher-venöse Blutprobe				
Dicker Tropfen positiv (%)	32.5	19.0	16.6	14.6
PCR positiv (%)	63.2	52.9	36.8	38.2
Plazentare Blutprobe				
Dicker Tropfen positiv (%)	-	34.9	-	15.0
HRP2 Schnelltest positiv (%)	-	40.8	-	22.1
PCR positiv (%)	-	59.4	-	31.9

ANC: engl. Antenatal Care: Schwangerschaftsvorsorge, HRP2: Histine Rich Protein 2

Bei Betrachtung der Unterschiede zwischen Erst- und Mehrgebärenden zwischen 2000 und 2006 konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Prävalenz einer plazentaren Malaria in der Gruppe der Multiparae (-54.4%) prägnanter ausfiel als in der Gruppe der Primiparae (-31.4%). Eine Reduktion des niedrigen Geburtsgewichtes konnte nur bei den Erstgebärenden (-37.7.%) nicht jedoch bei den Mehrgebärenden (+ 3.9%) beobachtet werden.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Verbesserung der parasitologischen und klinischen Indizes und der Anzahl an eingenommenen Dosen von SP existierte. Insgesamt hatten 2006 53 Gebärende kein IPTp und insgesamt 173 Frauen mindestens eine Dosis IPTp eingenommen. Letztere wiesen eine um rund 50% geringere Rate plazentarer Malaria auf ($p < 0.05$). Dann wurden die in 2006 rekrutierten Frauen in Gruppen eingeteilt, die IPTp SP nicht eingenommen ($n=53$), bzw. eine ($n=60$), zwei ($n=59$) oder drei ($n=54$) Dosen SP eingenommen hatten. In diesen Gruppen lag der Anteil mit PCR nachweisbarer, plazentarer Malaria bei 49.1%, 21.7% ($p < 0.05$), 32.2%, bzw. 25.9% ($p < 0.05$). Das Geburtsgewicht und die Hb-Konzentration lag in der Gruppe der Frauen mit drei eingenommenen Dosen SP am höchsten. Zwischen Primiparae und Multiparae gab es bezüglich des Gebrauchs von IPTp SP sowie der Anzahl an eingenommenen SP Dosen keinen erkennbaren Unterschied.

Nachweis molekularer Marker der Resistenz gegen SP sowie deren Vergleich zwischen peripheren und plazentaren Isolaten

Vor der Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der mit der SP-Resistenz korrelierenden Punktmutationen im parasitären *dhfr*-Gen, sollte überprüft werden, inwiefern die Sequestrierung der Parasiten im intervillösen Raum der Plazenta die Ergebnisse beeinflussen kann.

Bei 300 der im Jahr 2000 rekrutierten Gebärenden war eine *P. falciparum*-Infektion sowohl in plazentaren als auch in peripher-venösen Proben nachweisbar. Die *dhfr*-Typisierung anhand der PCR-RFLP und Darstellung mittels Agarose-Gelelektrophorese gelang in 297 der peripheren und 294 der plazentaren Proben.

In den peripheren Proben konnte der *dhfr*-Wildtyp in 5% der Fälle nachgewiesen werden, eine Einfachmutation in 4.0%, eine Zweifachmutation in 36.3% und die Dreifachmutante in 53.7% der Fälle. Die entsprechenden Häufigkeiten in den plazentaren Proben waren 5.7%, 4.3%, 36.6% und 51.3%. Konkordanz zwischen peripheren und plazentaren Proben konnte in 83.2% (247/297) der Fälle gezeigt werden. Dabei war die Konkordanz für Codon 108 mit 97.6% höher als für Codon 59 (94.2%) und Codon 51 (90.0%). Das Vorliegen der Hochresistenz-vermittelnden *dhfr*-Dreifachmutation bei plazentaren Parasiten wurde in 91.6% der Fälle im peripheren Blut als solche korrekt ermittelt.

In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen der prophylaktischen Einnahme von Pyrimethamin und dem Auftreten von resistenten *P. falciparum*-Stämmen besteht. Bei den schwangeren Frauen ohne nachweisbaren Pyrimethaminspiegel im Plasma wurden Parasiten mit zwei oder drei *dhfr*-Mutationen in 87.6% der Fälle nachgewiesen, bei Frauen mit nachweisbarem Pyrimethaminspiegel dagegen in 95.7% ($p=0.03$). Es wurde zudem deutlich, dass der suppressive Effekt des Pyrimethamins auf die plazentare Parasitendichte mit Zunahme an *dhfr*-Mutationen sank.

Verlauf des Anteils resistenter *Plasmodium falciparum*-Stämme vor und nach Einführung von IPTp SP

Nachdem das *dhfr*-Muster von *P. falciparum* als genügend repräsentativ für die gesamte Parasitenpopulation bei Schwangeren befunden worden war (s. o.), wurden die Isolate aus peripher-venösen Blutproben von 1998, 2000 und 2006 auf die entsprechenden Punktmutationen hin untersucht.

Der Anteil der *P. falciparum*-Isolate, die eine mit SP-Resistenz einhergehende *dhfr*-Dreifachmutation aufwiesen, verdoppelte sich innerhalb des Zeitraumes von acht Jahren: Waren es 1998 noch 35.6% der Isolate, wiesen diese im Jahr 2000 bereits 52.4% der Erreger auf und im Jahr 2006 72.9% ($p < 0.001$). Dabei konnte im Jahre 2006 kein Unterschied im Anteil der Erreger mit *dhfr*-Dreifachmutation bei Frauen zur Geburt (von denen die Mehrheit IPTp verwendet hatte) und Frauen in der Frühschwangerschaft (vor Einsatz von IPTp) beobachtet werden: Der jeweilige Anteil lag bei 73.3% bzw. 72.6%. Zudem war der Anteil derartiger Parasiten bei Gebärenden, die kein IPTp (74.0%) bzw. mindestens eine Dosis eingenommen hatten (73.0%), nahezu identisch. Einnahme von SP und ggf. deren Häufigkeit hatten somit keinen erkennbaren Einfluss auf die *dhfr*-Mutationen.

2.8 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass es nach der Implementierung von IPTp mit SP an einem Krankenhaus in Ghana zu einer statistisch signifikanten Verbesserung klinischer und parasitologischer Parameter schwangerer Frauen gekommen ist. Vereinfacht konnte die Prävalenz einer plazentaren *P. falciparum*-Infektion innerhalb von acht Jahren um mehr als die Hälfte reduziert werden, und der Anteil von mütterlicher Anämie und von niedrigem Geburtsgewicht war ebenfalls deutlich rückläufig.

Diese erfreuliche Entwicklung ist mit einiger Wahrscheinlichkeit nicht alleine auf die Einführung von IPTp zurückzuführen. Andere Änderungen, zu denen aber keine Daten vorliegen, haben wahrscheinlich ebenso dazu beigetragen, z. B. eine verbesserte Wahrnehmung des Problems der Malaria in der Schwangerschaft, der beginnende Einsatz von Moskitonetzen und eine verstärkte Nutzung der Schwangerenvorsorge. Ungeachtet dessen steht der verbesserten Situation bezüglich Malaria und z. B. Anämie jedoch die Verdopplung des Anteils SP-resistenter *P. falciparum*-Stämme im Studiengebiet während des achtjährigen Beobachtungszeitraumes entgegen. In Ghana konnte gezeigt werden, dass die hier als molekularer Marker verwendete *dhfr*-Dreifachmutation das Risiko für ein Therapieversagen von SP bei Kindern verzehnfacht. Zwar steht die Überprüfung des prädiktiven Werts der *dhfr*-Allele für die Therapie oder für IPTp bei Schwangeren aus. Allerdings zeigt der schnelle zeitliche Verlauf der beobachteten Entwicklung, dass die Rolle von IPTp mit SP im Rahmen der Prävention einer Malaria in der Schwangerschaft zeitlich begrenzt sein dürfte.

SP ist als Mittel der Therapie in den allermeisten Ländern Afrikas offiziell nicht mehr zugelassen. Eine klinische Studie zur reinen therapeutischen Wirksamkeit von SP bei Schwangeren ist daher aus ethischen Gründen nicht mehr vorstellbar. Damit werden die Resistenzmarker auch nicht

mehr mit der therapeutischen Wirksamkeit von SP bei Schwangeren in Verbindung gesetzt werden können. Gebraucht werden aber dringend Studien, die die Wirksamkeit von IPTp mit SP ins Verhältnis zu den *dhfr*-Mutationen setzen. Erst damit wird es möglich sein, die *dhfr*-Mutationen bei Schwangeren hinsichtlich der vermutlichen Effektivität von IPTp mit SP im zeitlichen Verlauf zu deuten. Dies wiederum ist essentiell zur Kontrolle dieser Präventionsstrategie. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die leicht zugänglichen peripheren Blutproben der Frauen in der Schwangerschaft repräsentativ für das Genotypmuster auch der plazentaren *P. falciparum*-Erreger sind, kann dieses Ziel erreicht werden. Allerdings ist der Nachweis der Resistenzmarker derzeit noch kein Routineverfahren in Afrika.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten auch, dass die Anzahl an eingenommenen Dosen von IPTp mit SP und auch die Einnahme an sich nicht mit der Häufigkeit der Prävalenz von Punktmutationen im *dhfr*-Gen korrelieren. Dies ist zwar beruhigend, weil es darauf hindeutet, dass IPTp nicht zur Resistenzentwicklung beiträgt. Es stellt sich aber die Frage nach den Gründen für eine derart rasche Resistenzentwicklung gegen SP bei schwangeren Frauen in Ghana. Als eine mögliche Ursache werden die vorangegangene Strategie der Pyrimethamin-Chemoprophylaxe und die in 1998 und 2000 mit *dhfr*-Mutationen assoziierten häufigen Pyrimethaminspiegel diskutiert. Im Widerspruch dazu steht, dass in einem angrenzenden Distrikt von Agogo bei 60% der untersuchten Probanden Parasiten mit der *dhfr*- Dreifachmutation nachweisbar waren, jedoch in nur 1.0% ein positiver Pyrimethaminspiegel. [48-49] Die Zusammenhänge diesbezüglich müssen zukünftig noch weiter untersucht werden. Eine andere Ursache für eine rasche Resistenzentwicklung kann ein hoher Medikamentendruck sein. SP selbst wurde jedoch im Studiengebiet nicht exzessiv verwendet und heutzutage ausschließlich im Rahmen des IPTp. SP-Medikamentendruck kann in der Untersuchungsregion keine ausreichende Erklärung für die rasche Resistenzentwicklung sein. Diskutiert wird ferner, dass eine Parasitenlinie mit einer identischen *dhfr*-Dreifachmutation, die sich von Asien über Afrika ausbreitet, die wesentliche Ursache für die zunehmende SP-Resistenz sein könnte [50]

Auch perspektivisch betrachtet, ist ein entscheidender Vorteil von SP bei der IPTp die einfache einmalige orale Darreichungsform. SP ist kostengünstig und kann somit von vielen Ländern Afrikas zur Prävention einer Malaria in der Schwangerschaft finanziert werden. Voraussichtlich wird sich jedoch aufgrund der Resistenz der Gebrauch von SP im Rahmen der Präventionskampagnen bald sehr limitieren. Daten zur Effektivität neuerer Medikamente in der Schwangerschaft sind spärlich, bzw. zur Anwendung als IPTp bislang nicht vorhanden. Zudem ist die Durchführung von großen kontrollierten randomisierten klinischen Studien bei

schwangeren Frauen zum einen aus ethischen Gründen schwierig, zum anderen von den meisten Ländern Afrikas nicht finanzierbar. Insgesamt wird derzeit einerseits an einer Verbesserung von IPTp mit SP in Kombination mit Insektizid behandelten Moskitonetzen [37] andererseits an einer vermehrten und gezielteren Aufklärung über die Folgen einer *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft gearbeitet. [51-52] Der Gebrauch von Moskitonetzen war während der Durchführung der Studie in 2006 mit 8.0% sehr gering, dies verdeutlicht das Verbesserungspotential alternativer Präventionsmöglichkeiten.

Die Effektivität und Sicherheit neuer Antimalariamedikamente zur Prävention einer Malaria in der Schwangerschaft wie Mefloquin (mit dem Vorteil der möglichen Einmaldosierung) müssen noch im Rahmen klinischer Studien getestet werden. Die Ergebnisse werden erst in einigen Jahren vorliegen. Bis dahin bleibt, als Verfahren nachgewiesener Wirksamkeit und pragmatisch betrachtet, nur IPTp mit SP in Kombination mit dem Gebrauch von Moskitonetzen sowie der Nachweis molekularer Marker zur Kontrolle der Resistenzentwicklung.

2.9 Referenzen

1. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):214-7.
2. WHO: World malaria situation in 1994. I. Population at risk. *Wkly Epidemiol Rec* 72 (1997) 269-274.
3. WHO/CTD: Malaria in the world: situation and progress. WHO, Geneva 1996.
4. WHO. Severe *falciparum* malaria. World Health Organization, Communicable Disease Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94 Suppl 1:1-90.
5. McGregor I. A. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*. 1984 Jul;33(4):517-25. Review.
6. Diagne N, Rogier C, Cisse B, Trape JF. . Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Mar-Apr;91(2):166-70.
7. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Font F, Alonso PL. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1740-5. Epub 2000 May 15.
8. Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ*. 1983;61(6):1005–1016.
9. Lang, W. and T. Löscher (2000). *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Stuttgart, New York, Thieme.
10. Wahlgren M, Carlson J, Helmbj H, Hedlund I, Treutiger CJ. Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:323-9. Review.
11. Wahlgren M et al. Cytoadherence and rosetting in the pathogenesis of severe malaria. In: Wahlgren M, Perlmann (Hrsg): *Malaria - molecular and clinical aspects*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1999; pp. 289-327.
12. Mockenhaupt FP, U. Ulmen, C. von Gaertner, G. Bedu-Addo, and U. Bienzle. Diagnosis of placental malaria. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):306-8.
13. White NJ. Malaria pathophysiology. In: Sherman IW (Hrsg.): *Malaria-parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM Press, Washington 1998; pp 371-386.
14. Beeson JG, Reeder JC, Rogerson SJ, Brown GV. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends Parasitol*. 2001 Jul;17(7):331-7. Review.
15. Scherf A., B. Pouvelle, P. A. Buffet and J. Gysin. Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. *Cell Microbiol*. 2001 Mar;3(3):125-31. Review.
16. WHO/UNICEF. Africa malaria report. WHO, Geneva 2003.
17. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb;7(2):93-104.
18. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, Meshnick SR. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J Infect Dis*. 1999 Jun;179(6):1580-3.

19. Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, von Gaertner C, Boyé R, Fricke K, Hannibal I, Karakaya F, Schaller M, Ulmen U, Acquah PA, Dietz E, Eggelte TA, Bienzle U. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J*. 2006 Dec 13;5:119.
20. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 1998 Oct 29;395(6705):851-2.
21. O'Neil-Dunne I, Achur RN, Agbor-Enosh ST, Valiyaveetil M, Naik RS, Ockenhouse CF, Zhou A, Megnekou R, Leke R, Taylor DW, Gowda DC. Gravidity- dependent production of antibodies that inhibit binding of Plasmodium falciparum - infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect Immun* 2001; 69:7487-7492.
22. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Mendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):28-35. Review.
23. van Geertruyden JP, Thomas F, Erhart A, D'Alessandro U. The contribution of malaria in pregnancy to perinatal mortality. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Aug;71(2 Suppl):35-40. Review.
24. WHO. A strategic framework for malaria control and prevention during pregnancy in the African region. Brazzaville, Congo. World Health organization; 2004
25. Verhoeff FH, Brabin BJ, Chimsuku L, Kazembe P, Russell WB, Broadhead RL. An evaluation of the effects of intermittent sulfadoxine-pyrimethamine treatment in pregnancy on parasite clearance and risk of low birthweight in rural Malawi. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998 Mar;92(2):141-50.
26. Parise ME, Ayisi JG, Nahlen BL, Schultz LJ, Roberts JM, Misore A, Muga R, Oloo AJ, Steketee RW. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Nov;59(5):813-22.
27. van Eijk AM, Ayisi JG, ter Kuile FO, Otieno JA, Misore AO, Odondi JO, Rosen DH, Kager PA, Steketee RW, Nahlen BL. Effectiveness of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine for control of malaria in pregnancy in western Kenya: a hospital-based study. *Trop Med Int Health*. 2004 Mar;9(3):351-60.
28. Kayentao K, Kodio M, Newman RD, Maiga H, Doumtable D, Ongoiba A, Coulibaly D, Keita AS, Maiga B, Mungai M, Parise ME, Doumbo O. Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *J Infect Dis*. 2005 Jan 1;191(1):109-16. Epub 2004 Nov 29.
29. Garner P, Gülmezoglu AM. Drugs for preventing malaria in pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Oct 18;(4):CD000169. Review
30. Peters PJ, Thigpen MC, Parise ME, Newman RD. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: Implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf*. 2007;30(6):481-501. Review.
31. ter Kuile FO, van Eijk AM, Filler SJ. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. *JAMA*. 2007 Jun 20;297(23):2603-16. Review.

32. Newman RD, Moran AC, Kayentao K, Benga-De E, Yameogo M, Gaye O, Faye O, Lo Y, Moreira PM, Doumbo O, Parise ME, Steketee RW. Prevention of malaria during pregnancy in West Africa: policy change and the power of subregional action. *Trop Med Int Health*. 2006 Apr;11(4):462-9.
33. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR: Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. 2002 Apr;2(4):209-18. Review.
34. White NJ: Sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria: sulfadoxine-pyrimethamine is not working in Malawi. *BNJ* 2004,328:1259.
35. Nzila A.M., E.K. Mberu, J. Sulo, H. Dayo, P.A. Winstanley, C.H. Sibley, and W.M. Watkins. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000 Apr;44 (4):991-996.
36. Mockenhaupt, F. P., T. J. Bousema, T. A. Eggelte, J. Schreiber, S. Ehrhardt, N. Wassilew, R. N. Otchwemah, R. W. Sauerwein, and U. Bienzle. *Plasmodium falciparum* dhfr but not dhps mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 2005 Sep; 10 (9):901-908.
37. ter Kuile FO, Terlouw DJ, Phillips-Howard PA, Hawley WA, Friedman JF, Kariuki SK, Shi YP, Kolczak MS, Lal AA, Vulule JM, Nahlen BL. Reduction of malaria during pregnancy by pyrimethamine-treated bed nets in area of intense perennial malaria transmission in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2003 Apr; 68 (4Suppl): 50-60.
38. Browne EN, Frimpong E, Sievertsen J, Hagen J, Hamelmann C, Dietz K, Horstmann RD, Burchard GD. Malariometric update for the rainforest and savanna of Ashanti region, Ghana. *Ann Trop Med Parasitol* 2000 Jan; 94 (1): 15-22..
39. Schenk, H. v., M. Falkensson and B. Lundberg (1986) „Evaluation of "HemoCue", a new device for determining hemoglobin.“ *Clin Chem* 32(3): 526-529.
40. World Health Organization. 1972. Nutritional anaemias. WHO Tech. Rep. Ser. 503.
41. Garcia, M., S. Kirimoama, D. Marlborough, J. Leafasia, and K. H. Rieckmann. Immunochromatographic test for malaria diagnosis. *Lancet* Jun 1; 347 (9014):1549
42. Tjitra, E., S. Suprianto, M. Dyer, B. J. Currie, and N. M. Anstey. Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in Eastern Indonesia. *J. Clin. Microbiol*. 1999 Aug; 37 (8):2412–2417.
43. 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 Dec 20;230(4732):1350-4.
44. 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 1:263-73.
45. Duraisingh, M. T., J. Curtis, and D. C. Warhurst. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol* 1998 May; 89 (1):1-8.
46. Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong, and K. N. Brown. High sensitivity of detection of human malaria parasites by

- the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993 Oct; 6 (2):315–320.
47. Witte, A. M., H. J. Klever, B. J. Brabin, T. A. Eggelte, H. J. van der Kaay, and M. P. Alpers. Field evaluation of the use of an ELISA to detect chloroquine and its metabolites in blood, urine and breast-milk. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990 Jul-Aug; 84 (4):521-525.
 48. Marks F, Evans J, Meyer CG, Browne EN, Flessner C, von Kalckreuth V, Eggelte TA, Horstmann RD, May J. High prevalence of markers for sulfadoxine and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in the absence of drug pressure in the ashanti region of Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Mar; 49 (3): 1101-5.
 49. Gregson A, Plowe CV,. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev* 2005 Mar; 57(1):117-45. Review.
 50. Maiga O, Djimde AA, Hubert V, et al. A shared Asian origin of the triple-mutant dhfr allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa. *J Infect Dis* 2007 Jul 1; 196: 165-72. Epub 2007 May 24.
 51. Mbonye AK, Bygbjerg I, Magnusson P: Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: evaluation of a new delivery approaches on access and compliance rates in Uganda. *Trop Med Int Health.* 2007 Apr;12(4):519-31.
 52. Ouma PO, Van Eijk AM, Hamel MJ, Sikuku E, Odhiambo F, Munguti K, Ayisi JG, Kager PA, Slutsker L. The effect of health care worker training on the use of intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in rural western Kenya. *Trop Med Int Health.* 2007 Aug;12(8):953-61.

3 Anteilserklärung

Dieser Promotion, die im Rahmen einer Publikationspromotion durchgeführt wurde, liegen drei Publikationen zugrunde. Die Promovendin hatte daran folgenden Anteil:

Publikation 1:

Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Junge C, **Hommerich L**, Eggelte TA, Bienzle U. Markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistant *Plasmodium falciparum* in Placenta and Circulation of Pregnant Women. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:332-334. (IF 4,72).

Beitrag der Promovendin (50%): Beteiligung an DNA-Extrahierung peripherer und plazentarer Blutproben, PCR-RFLP, Agarose-Gelelektrophorese, Auswertung und Diskussion.

Publikation 2:

Hommerich L, von Oertzen C, Bedu-Addo G, Holmberg V, Acquah PA, Eggelte TA, Bienzle U, Mockenhaupt FP. Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. *Malar J* 2007; 6:144 (IF 2,91).

Beitrag der Promovendin (70%): Planung, Organisation und Koordination der Rekrutierung und Untersuchungen in Agogo, Ghana. Untersuchung und Messung neugeborener Kinder. Probenaufbereitung und -asservierung, Mikroskopie Dicker Tropfen und Ausstriche, Durchführung von HRP2-Schnelltests, Messung von Hb, Dateneingabe (Fragebögen) und Auswertung.

Publikation 3:

Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Eggelte TA, **Hommerich L**, Holmberg V, von Oertzen C, Bienzle U. Rapid Increase in the Prevalence of Sulfadoxine- Pyrimethamine Resistance among *Plasmodium falciparum* Isolated from Pregnant Women in Ghana. *J Infect Dis* 2008; 198:1545-9. (IF 5,68).

Beitrag der Promovendin (30%): DNA-Extrahierung peripherer und plazentarer Blutproben, PCR-RFLP, Agarose-Gelelektrophorese, Dokumentation der Ergebnisse, Auswertung.

Berlin, 12.07.2010

Lena Hommerich

4 Drei Publikationen als Publikationsleistung

- 4.1 **Publikation 1:** Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Junge C, **Hommerich L**, Eggelte TA, Bienzle U. Markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistant *Plasmodium falciparum* in Placenta and Circulation of Pregnant Women. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:332-334 (IF 4,72).

4.2 Publikation 2: Hommerich L, von Oertzen C, Bedu-Addo G, Holmberg V, Acquah PA, Eggelte TA, Bienzle U, Mockenhaupt FP. Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. *Malar J* 2007; 6:144 (IF 2,91).

4.3 Publikation 3: Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Eggelte TA, **Hommerich L**, Holmberg V, von Oertzen C, Bienzle U. Rapid Increase in the Prevalence of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance among *Plasmodium falciparum* Isolated from Pregnant Women in Ghana. *J Infect Dis* 2008; 198:1545-9 (IF 5,68).

5 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6 Publikationsliste

Publikation 1:

Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Junge C, **Hommerich L**, Eggelte TA, Bienzle U. Markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistant *Plasmodium falciparum* in Placenta and Circulation of Pregnant Women. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:332-334. (IF 4,72).

Publikation 2:

Hommerich L, von Oertzen C, Bedu-Addo G, Holmberg V, Acquah PA, Eggelte TA, Bienzle U, Mockenhaupt FP. Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. *Malar J* 2007; 6:144 (IF 2,91).

Publikation 3:

Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Eggelte TA, **Hommerich L**, Holmberg V, von Oertzen C, Bienzle U. Rapid Increase in the Prevalence of Sulfadoxine- Pyrimethamine Resistance among *Plasmodium falciparum* Isolated from Pregnant Women in Ghana. *J Infect Dis* 2008; 198:1545-9. (IF 5,68).

7 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Lena Hommerich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Molekulare Marker der Resistenz von Plasmodium falciparum gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin bei Schwangeren in Ghana im Kontext intermittierender präventiver Therapie, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 12.07.2010

Lena Hommerich

8 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Frank Mockenhaupt für die Überlassung des überaus interessanten Themas, für die uneingeschränkte freundliche und intensive Betreuung sowie die fortwährende wissenschaftliche Unterstützung und Durchsicht der Arbeit.

Besonders herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Bienzle, der mir jederzeit als Mentor und Kritiker zur Seite stand und durch den ich Afrika lieben gelernt habe.

Mein Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe des Tropeninstitutes, vor allem S. Röwer und B. Jacob und allen Mitarbeitern des Presbyterian Mission Krankenhaus Agogo, Ghana, sowie allen Frauen, die an den Studien teilgenommen haben.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mein Studium und somit die Verfassung dieser Arbeit ermöglicht haben. Ich danke Ihnen für die bedingungslose Unterstützung.