

Aus dem Institut für
Sozialmedizin, Epidemiologie und Gesundheitsökonomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Importierte *Plasmodium falciparum*-Isolate in Europa
und molekulare Surveillance von Medikamentenresistenz**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Katerina Neuber, geb. Stoeter
aus Neuss

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. N. Willich
2. Prof. Dr. med. R. Gerzer
3. Prof. Dr. med. T. Löscher

Datum der Promotion: 3. September 2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE BEDEUTUNG UND VERBREITUNG DER MALARIA TROPICA	1
1.2. ENTWICKLUNGSZYKLUS VON <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	2
1.3. DIE KLINIK DER MALARIA TROPICA	3
1.3.1. Unkomplizierte Malaria tropica	3
1.3.2. Komplizierte Malaria tropica	4
1.4. SEMIIMMUNITÄT	4
1.5. MEDIKAMENTENRESISTENZ BEI <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	4
1.6. CHARAKTERISIERUNG UND WIRKUNGSWEISE CHLOROQUINS UND DER ANTIFOLATE	6
1.6.1. Chloroquin	6
1.6.2. Sulfadoxin/Pyrimethamin	7
1.7. DIE BEDEUTUNG VON DHPS UND DHFR FÜR DIE ENTWICKLUNG VON ANTIFOLATRESISTENZ	8
1.8. DIE BEDEUTUNG VON <i>PFCRT</i> FÜR DIE ENTWICKLUNG VON CHLOROQUINRESISTENZ	9
1.9. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	10
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. MATERIAL	12
2.1.1. Proben	12
2.1.2. Chemikalien, Enzyme, Nukleotide	12
2.1.3. Puffer, Lösungen, Gele	13
2.1.4. Gebrauchsgegenstände und Geräte	14
2.2. METHODEN	14
2.2.1. DNA-Präparation	14
2.2.1.1. DNA-Extraktion nach der Chelex-Methode	14
2.2.1.2. DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit	15
2.2.2. Polymerasekettenreaktion	16
2.2.2.1. Grundprinzipien der Polymerasekettenreaktion	16
2.2.2.2. Durchführung der nested-PCR	16

2.2.2.3. Erfolgskontrolle der PCR.....	17
2.2.2.4. Charakterisierung verwendeter Oligonukleotidprimer	18
2.2.3. SSOP-ELISA	18
2.2.3.1. Durchführung des SSOP-ELISAs	18
2.2.3.1.1. Coating	18
2.2.3.1.2. Inkubation I	19
2.2.3.1.3. Inkubation II	19
2.2.3.1.4. Inkubation III	19
2.2.3.1.5. Enzymreaktion	20
2.2.3.2. Sequenzen und Reaktionsbedingungen der SSOPs	20
2.2.3.3. Interpretation des ELISAS.....	21
2.2.3.4. <i>Plasmodium falciparum</i> -Stämme	21
2.2.4. Restriktionsverdau.....	23
2.2.4.1. Nested-PCR	23
2.2.4.2. Durchführung des Restriktionsverdau	24
2.2.5. Statistische Auswertung	25
2.2.6. Ermittlung der Haplotypen.....	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1. PATIENTENCHARAKTERISTIKA	27
3.2. EINTEILUNG IN REGIONEN.....	29
3.3. POLYKLONALITÄT.....	30
3.4. POLYMORPHISMEN DER <i>DHFR</i> -SEQUENZ.....	30
3.4.1. Die <i>dhfr</i> -Sequenz in Afrika	30
3.4.1.1. Codon 51.....	30
3.4.1.2. Codon 59.....	31
3.4.1.3. Codon 108.....	31
3.4.1.4. Codon 164.....	32
3.4.2. Zeitlicher Verlauf der Prävalenz bedeutender <i>dhfr</i> -Haplotypen in Afrika	32
3.4.2.1. <i>dhfr</i> -Wildtyp	33
3.4.2.2. <i>dhfr</i> -Doppelmutation.....	33
3.4.2.3. <i>dhfr</i> -Tripelmutation	34
3.4.3. Die <i>dhfr</i> -Sequenz in Regionen außerhalb Afrikas	35
3.5. POLYMORPHISMEN DER <i>DHPS</i> -SEQUENZ.....	36

3.5.1. Die <i>dhps</i> -Sequenz in Afrika.....	36
3.5.1.1. Codon 436.....	36
3.5.1.2. Codon 437.....	37
3.5.1.3. Codon 540.....	37
3.5.1.4. Codon 581.....	38
3.5.1.5. Codon 613.....	39
3.5.2. Zeitlicher Verlauf der Prävalenz bedeutender <i>dhps</i> -Haplotypen in Afrika.....	39
3.5.2.1. <i>dhps</i> -Wildtyp	40
3.5.2.2. Mutation an Codon 437 und an Codon 540 des <i>dhps</i> -Gens.....	41
3.5.3. Die <i>dhps</i> -Sequenz in Regionen außerhalb Afrikas	41
3.6. DIE <i>DHFR/DHPS</i> -QUADRUPELMUTATION UND –QUINTUPELMUTATION....	42
3.6.1. Prävalenz der <i>dhfr/dhps</i> -Quadrupelmultation in Afrika	42
3.6.2. Prävalenz der <i>dhfr/dhps</i> -Quintupelmultation in Afrika.....	43
3.6.3. Die <i>dhfr/dhps</i> -Quadrupelmultation und die <i>dhfr/dhps</i> -Quintupelmultation in den Regionen außerhalb Afrikas.....	44
3.7. POLYMORPHISMEN DER <i>PFCRT</i> -SEQUENZ.....	44
3.7.1. Die <i>pfcr</i> t-Sequenz in Afrika.....	44
3.7.2. Die <i>pfcr</i> t-Sequenz in Regionen außerhalb Afrikas	45
3.8. EINFLUSS DER MEDIKAMENTÖSEN PROPHYLAXE AUF DIE PRÄVALENZ VON MUTATIONEN.....	45
3.8.1. Einfluss der medikamentösen Prophylaxe auf Mutationen der <i>dhfr</i> - und <i>dhps</i> - Gene.....	46
3.8.2. Einfluss der medikamentösen Prophylaxe auf Mutationen des <i>pfcr</i> t-Gens.....	46
4. DISKUSSION	47
4.1. DISKUSSION DER METHODEN	48
4.1.1. Studienaufbau und Probengewinnung	48
4.1.1.1. Limitierungen des Studienaufbaus.....	49
4.1.2. Genotypisierung	49
4.2. <i>DHFR</i> UND <i>DHPS</i> ALS MARKER FÜR ANTIFOLATRESISTENZ.....	50
4.2.1. Die <i>dhfr</i> - und die <i>dhps</i> -Sequenz in Afrika.....	51
4.2.1.1. Westafrika	52
4.2.1.2. Südliches Afrika	53
4.2.1.3. Zentralafrika	54

4.2.1.4. Ostafrika	55
4.2.2. Die <i>dhfr</i> - und die <i>dhps</i> -Sequenz in Regionen außerhalb Afrikas	56
4.3. <i>PFCRT</i> ALS MARKER FÜR CHLOROQUINRESISTENZ	57
4.3.1. Die <i>pfcr</i> t-Sequenz in Afrika.....	57
4.3.1.1. Westafrika	58
4.3.1.2. Südliches Afrika	58
4.3.1.3. Zentralafrika	59
4.3.1.4. Ostafrika.....	60
4.3.2. Die <i>pfcr</i> t-Sequenz in Regionen außerhalb Afrikas	60
4.4. POLYKLONALE INFEKTIONEN DURCH PLASMODIUM FALCIPARUM	61
4.5. DER EINFLUSS DER MEDIKAMENTÖSEN PROPHYLAXE AUF DIE MUTATIONSPRÄVALENZ.....	62
4.6. SCHLUSSBETRACHTUNG.....	64
 5. ZUSAMMENFASSUNG	 66
 6. LITERATURVERZEICHNIS	 68
 7. ANHANG	 82
ABKÜRZUNGEN	82
DANKSAGUNG	84
ERKLÄRUNG	85
LEBENS LAUF	86
PUBLIKATIONS LISTE.....	87

1. EINLEITUNG

1.1. DIE BEDEUTUNG UND VERBREITUNG DER MALARIA TROPICA

Die Malaria ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren 2006 rund 3,3 Milliarden Menschen in 109 Ländern und Regionen von der Malaria bedroht. Etwa 189-327 Millionen Menschen erkrankten laut WHO-Schätzungen jährlich an Malaria und knapp eine Million sterben, hauptsächlich Kinder unter fünf Jahren und schwangere Frauen [131]. Von einigen Autoren werden diese Schätzungen als zu niedrig betrachtet, insbesondere hinsichtlich der Malariagebiete außerhalb Afrikas [108]. Darüber hinaus sind ein großer Anteil der Kindersterblichkeit, der Schwangerschaftskomplikationen und der Anämien bei Kindern und Schwangeren ebenfalls auf Malaria zurückzuführen [127].

Annähernd 60 % der durch Malaria bedingten Morbidität und über 80 % der Mortalität sind in Afrika südlich der Sahara zu verzeichnen, wo die Mehrzahl der Infektionen durch *Plasmodium falciparum* verursacht wird. Malaria tritt jedoch in nahezu allen tropischen und subtropischen Gebieten der Erde auf, wenn auch außerhalb Subsahara-Afrikas häufiger durch *Plasmodium vivax* verursacht [131]. Besonders in Südostasien, Indien und Pakistan, Papua-Neuguinea und dem Amazonasbecken besteht eine hohe Transmissionsintensität mit etwa drei Millionen Malariafällen jährlich allein auf dem indischen Subkontinent. Auch wurde in den letzten Jahren eine Rückkehr der Malaria in den Nahen und Mittleren Osten sowie nach Zentralasien beobachtet [127].

Die 1998 gegründete „Roll Back Malaria“-Initiative der WHO, UNICEF, Weltbank und des Entwicklungsprogramms der Vereinten Nationen (UNDP) verfolgt das Ziel, die Anzahl der Malariafälle bis zum Jahre 2010 zu halbieren. Dies soll durch erleichterten Zugang Betroffener zu einer effektiven Behandlung erreicht werden, durch Expositionsprophylaxe mittels imprägnierter Moskitonetze und Vektorkontrolle, durch Malariaprävention bei Schwangeren und durch verbesserte Vorbeugung bzw. Kontrolle von Malariaepidemien, aber auch durch Armutsbekämpfung [128]. Nach Anlaufschwierigkeiten mit zuerst weiter steigender Morbidität und Mortalität durch Malaria, unter anderem durch zunehmende Resistenz der Parasiten gegen verbreitete Medikamente und Resistenz der Vektoren gegen die gängigsten Insektizide [126] sowie durch anfangs unzureichende Verteilung imprägnierter Bettnetze [137], wurde in den letzten Jahren aus einigen Regionen ein Rückgang der Malaria berichtet [16, 132].

Eine besondere Bedeutung für Europa haben die vor allem durch Tourismus und Migration aus Endemiegebieten importierten Malariafälle. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 547 Erkrankungen und zwei Todesfälle durch Malariaerreger gemeldet. Beide Todesfälle und 82,5 % der Erkrankungen wurden durch *Plasmodium falciparum* verursacht, 88 % der Infektionen wurden aus Afrika importiert [96].

Erreger der Malaria sind Protozoen der Gattung Plasmodium. Vier der über 100 Plasmodienspezies sind humanpathogen. Infektionen mit *P. vivax* und *ovale*, den Erregern der Malaria tertiana und mit *P. malariae*, dem Erreger der Malaria quartana, zeigen meist milde Verläufe [59]. Dagegen ist *P. falciparum*, der Erreger der malignen Malaria tropica, verantwortlich für den Großteil aller Erkrankungen und fast alle Todesfälle durch Malaria [127]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit diesem aggressivsten Vertreter der Plasmodien.

1.2. ENTWICKLUNGSZYKLUS VON *PLASMODIUM FALCIPARUM*

1897 konnte der britische Mikrobiologe Sir Ronald Ross den Entwicklungszyklus der Malariaerreger aufklären, indem er nachwies, dass *P. falciparum* durch den Stich weiblicher Mücken der Gattung Anopheles auf den Menschen übertragen wird [59]. Der Mensch ist hierbei Nebenwirt, in ihm findet nur die asexuelle Vermehrung der Parasiten statt (exoerythrozytäre und erythrozytäre Schizogonie). Die sexuelle Vermehrung (Sporogonie) findet im Hauptwirten, der Anophelesmücke, statt (Abbildung 1).

Über den Speichel der Mücke gelangen mit dem Stechakt Erreger in Form von Sporozoiten in die menschliche Blutbahn. Sie differenzieren sich zunächst in den Hepatozyten innerhalb von fünf bis 15 Tagen zu bis zu 30.000 Merozoiten. Diese verlassen die Leber, um in Erythrozyten einzudringen. Über die Entwicklungsstadien der ringförmigen Trophozoiten und Schizonten bilden sich binnen von etwa 48 Stunden bis zu 32 erythrozytäre Merozoiten, welche die roten Blutzellen schließlich zum Platzen bringen und neue Erythrozyten befallen. Nach zwei bis drei erythrozytären Zyklen bilden sich aus einer Subpopulation weibliche Makrogametozyten und männliche Mikrogametozyten, die im Menschen keinen Krankheitswert haben, jedoch bei einem erneuten Stich von der Mücke aufgenommen werden, um dort ihren Entwicklungszyklus zu vollenden. Am Ende der sexuellen Entwicklung im Magendarmtrakt der Anophelesmücke nach etwa zwei Wochen entstehen tausende Sporozoiten, die in die Speicheldrüse wandern und beim nächsten Stich in einen neuen Wirt injiziert werden.

In der Leber persistierende Schlafstadien der Erreger, die noch nach Jahren zu einer Reaktivierung der Malaria führen können, Hypnozoiten genannt, treten im Gegensatz zu den Spezies *P. vivax* und *P. ovale* bei *P. falciparum* nicht auf [59].

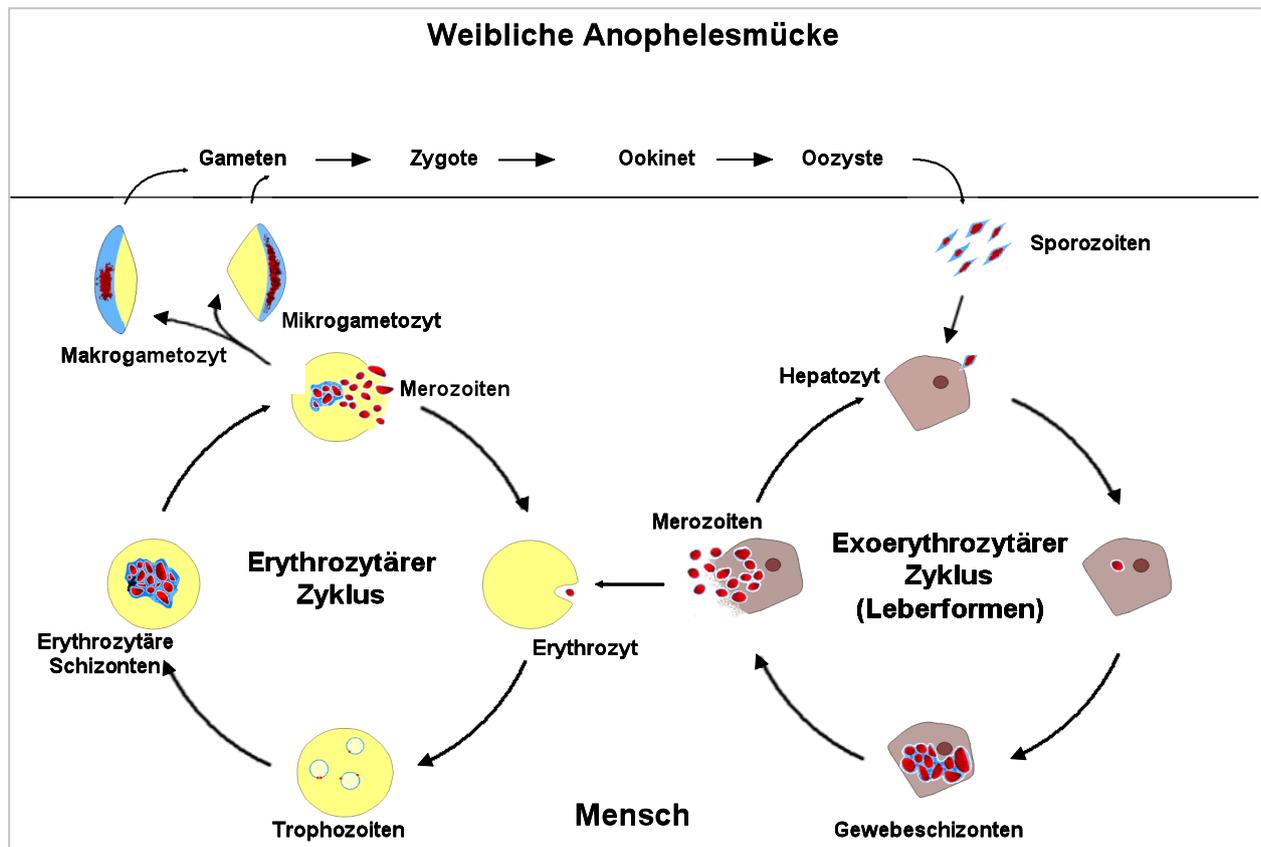


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* (modifiziert nach Knobloch [59])

1.3. DIE KLINIK DER MALARIA TROPICA

1.3.1. Unkomplizierte Malaria tropica

Vor allem bei Krankheitsbeginn kann sich die Malaria tropica durch eher unspezifische Symptome äußern. Insbesondere bei nicht-immunen Erkrankten, z. B. bei Kleinkindern und bei Reisenden, treten starkes Krankheitsgefühl mit Schwäche, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen auf, eventuell gastrointestinale Symptome, Thrombozytopenie, Splenomegalie, seltener auch Hepatomegalie und Ikterus. Leitsymptom ist jedoch das Fieber, das üblicherweise deutlich über 38°C liegt. In der Regel tritt es eine bis vier Wochen nach Infektion auf und zeigt keine Rhythmizität.

Semiimmune Infizierte dagegen (siehe 1.4) sind zu etwa 80 % oligo- oder gar asymptomatisch. Fieber tritt bei ihnen selten auf. Eher finden sich normochrome Anämie, Hepato- und Splenomegalie [59, 109].

1.3.2. Komplizierte Malaria tropica

Kinder und Schwangere in Endemiegebieten sowie Reisende tragen ein erhöhtes Risiko für einen komplizierten Verlauf der Malaria, insbesondere bei verzögertem Beginn einer suffizienten Therapie. Die Komplikationen betreffen in der Regel Nieren, Lungen, Gehirn und Hämatopoiese. Laut WHO-Definition liegt eine schwere Malaria vor, wenn neben einer Parasitämie mindestens eines der folgenden Symptome besteht: erhebliche Erschöpfung (Prostration), beeinträchtigte Bewusstseinslage, wiederholte Krampfanfälle, Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) oder Lungenödem, Kreislaufversagen, spontane Blutungen, Ikterus, Hämoglobinurie, Nierenversagen, Azidose bzw. Azidämie ($\text{pH} < 7,25$) und schwere Anämie ($\text{Hb} < 5 \text{ g/dl}$) [130].

Zerebrale Malaria geht mit einer Letalität von 15-30 % und neurologischen Residuen bei 9-12 % der Überlebenden einher [82]. Bei Kleinstkindern wird die Anämie für einen Großteil der Mortalität durch Malaria verantwortlich gemacht [59].

1.4. SEMIIMMUNITÄT

In Gebieten hoher Endemizität führen rezidivierende Infektionen mit *P. falciparum* zu einer funktionellen Immunität, welche, ohne die Infektion zu verhindern, vor Erkrankung schützt. So sinkt mit steigendem Alter die Frequenz symptomatischer Malariaepisoden, während die Häufigkeit oligo- bis asymptomatischer Infektionen steigt [59]. Die klinische Immunität scheint besonders mit der kumulativen Infektionsdauer durch Trophoziten assoziiert [105]. Ausbleiben des Erregerkontaktes führt zu einem Immunitätsverlust.

1.5. MEDIKAMENTENRESISTENZ BEI *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Bisher existiert kein wirksamer Impfstoff gegen die Malaria. Durch Expositionsprophylaxe, also durch den Schutz vor Moskitostichen durch Repellentien, lange Kleidung und Moskitonetze, lässt sich das Infektionsrisiko etwas vermindern. Daneben stehen einige Chemotherapeutika zur Malariaprophylaxe und -behandlung zur Verfügung. Zunehmende Resistenz der Parasiten gegen die gängigen Medikamente stellt jedoch ein immer ernsteres Problem bei der Kontrolle der Malaria dar.

Chinin ist eines der ältesten bekannten Malariamedikamente. Das aus der Rinde des gelben Chinarindenbaumes gewonnene Alkaloid wurde 1823 erstmals in industriellem Maßstab hergestellt. Jedoch wurde die Chinarinde schon seit dem frühen 17. Jahrhundert in Europa zur Behandlung fieberhafter Erkrankungen verwendet. Bereits

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde vereinzelt über das Auftreten von Resistenzen aus Südamerika berichtet [18]. Diese sind aber vergleichsweise unbedeutend und Chinin ist bis heute ein Reservemittel für die Behandlung der komplizierten Malaria [134].

Obwohl Chloroquin (CQ) erstmals 1934 in Deutschland synthetisiert wurde, erkannte man seinen Wert erst etwa zehn Jahre später in den Vereinigten Staaten von Amerika und wandte es fortan bei Malaria innerhalb der Streitkräfte an [134]. Gut 40 Jahre lang war Chloroquin fundamental in der Malariatherapie. Erste resistente Stämme traten in Kolumbien und in den thailändischen Grenzgebieten schon Ende der 1950er Jahre auf und verbreiteten sich in Südamerika, Südostasien und Indien. Afrika blieb immerhin bis Ende der 1970er Jahre verschont. Dann erst wurden chloroquinresistente *P. falciparum*-Stämme in Ostafrika entdeckt und breiteten sich rasch über den afrikanischen Kontinent aus [50, 124]. Mit steigender Zahl von Therapieversagen sahen viele Länder in ihren Medikamentenempfehlungen von Chloroquin ab [5, 23, 97].

Ersetzt wurde es häufig durch die Kombination der Folsäureantagonisten Sulfadoxin und Pyrimethamin (S/P, Fansidar®, Roche), eine der wenigen preiswerten und gut verträglichen Alternativen bei CQ-resistenter Malaria. Erste Resistenzen gegen Pyrimethamin traten in Ostafrika bereits in den 1950er Jahren nach breiter Verwendung zur Malariaprophylaxe auf [22]. Auch die Wirksamkeit der Kombination S/P hat sich seit ihrer Einführung in den 1960er Jahren kontinuierlich vermindert. Seit 1967 wurden sich rasch verbreitende Resistenzen aus Südostasien berichtet und auch in Afrika lässt die Wirksamkeit von S/P seit den 1980 Jahren sukzessive nach [18].

Das dem Chinin verwandte Mefloquin wird seit 1977 zur Prophylaxe und Therapie CQ-resistenter Malaria eingesetzt. Resistenzen wurden erstmals Ende der 1980er Jahre in Südostasien beobachtet, später auch in Südamerika und Afrika. In den thailändischen Grenzgebieten ist das Resistenzniveau mittlerweile inakzeptabel hoch. [18, 134].

Die Kombination aus Proguanil und Atovaquon (Malarone®, GlaxoSmithKline) hemmt durch Cytochrom b den Elektronentransport in den Mitochondrien. Zwar sind gegen beide Einzelsubstanzen Resistenzen beschrieben worden, die Kombination zeigt aber in über 98 % der Fälle Wirkung [67]. Somit ist Proguanil/Atovaquon eine wirksame und nebenwirkungsarme, jedoch relativ teure Alternative zu anderen Malariamitteln.

Die Extrakte der *Artemisia annua* (einjähriger Beifuss) sind in China seit über 1500 Jahren als Antipyretika bekannt [136]. Seit einigen Jahren finden das 1971 erstmals in

China synthetisierte Artemisinin und seine Derivate Artemether und Artesunat vermehrt Anwendung. Bei bisher nur selten beobachteten Resistenzen [135] gelten die Artemisinine in vielen Ländern Südostasiens und Afrikas bereits als Therapie der ersten Wahl, allerdings bei oft noch eingeschränkter Verfügbarkeit [129]. Die kurze Halbwertszeit von unter einer Stunde [93] erfordert die Kombination mit langwirksamen Medikamenten wie Mefloquin oder Lumefantrin. In Deutschland ist seit 2001 die Kombination aus Artemether und Lumefantrin (Riamet®, Novartis) zur Therapie der unkomplizierten Malaria tropica zugelassen.

1.6. CHARAKTERISIERUNG UND WIRKUNGSWEISE CHLOROQUINS UND DER ANTIFOLATE

1.6.1. Chloroquin

Chloroquin ist ein 4-Aminochinolin (7-chloro-4-[4'-(diethylamino)-1'-methylbutylamino]-

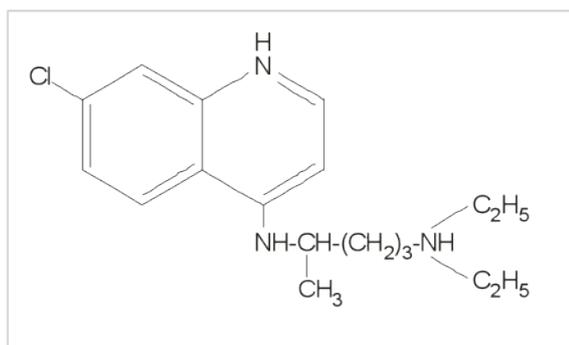


Abbildung 2: Strukturformel von Chloroquin (modifiziert nach Mutschler [78])

chinolin). Es wird in der Regel oral eingenommen, der maximale Plasmaspiegel ist nach etwa zwei Stunden erreicht [89].

Der genaue Wirkmechanismus von Chloroquin ist noch ungeklärt. Während der erythrozytären Schizogonie fällt durch die Hämoglobinmetabolisierung toxisches Ferriprotoporphyrin IX (Häm) in der Verdauungs-

vakuole an. Die Detoxifikation erfolgt durch Konversion zu Hämatin und Polymerisation zu Hämozoïn [42]. Diese wird vermutlich durch eine Komplexbildung des Häms mit Chloroquin unterbunden, so dass der Parasit dem toxischen Effekt des Ferriprotoporphyrins IX ausgeliefert ist [42, 124]. Somit wirkt Chloroquin nur auf die erythrozytären Entwicklungsstadien, insbesondere auf die frühen Ringformen [46].

In therapeutischer Dosis ist Chloroquin gut verträglich, die Nebenwirkungen sind überwiegend gastrointestinaler Art [89]. Seltener treten neurologische Symptome wie Schwindel, Kopfschmerzen, Parästhesien und Krampfanfälle, psychiatrische und auch dermatologische Symptome wie Exantheme, Pruritus und Photosensibilisierung auf [125]. Reversible Chloroquineinlagerungen in die Kornea sowie sehr selten meist irreversible Retinopathien nach langjähriger Chloroquineinnahme werden beschrieben [98]. In Überdosierung kann Chloroquin zum Leberzellzerfall führen.

1.6.2. Sulfadoxin/Pyrimethamin

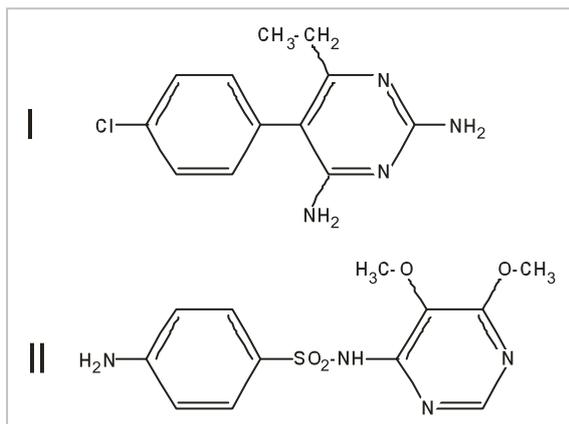


Abbildung 3: Strukturformeln von Pyrimethamin (I) und Sulfadoxin (II) (modifiziert nach Mutschler [78])

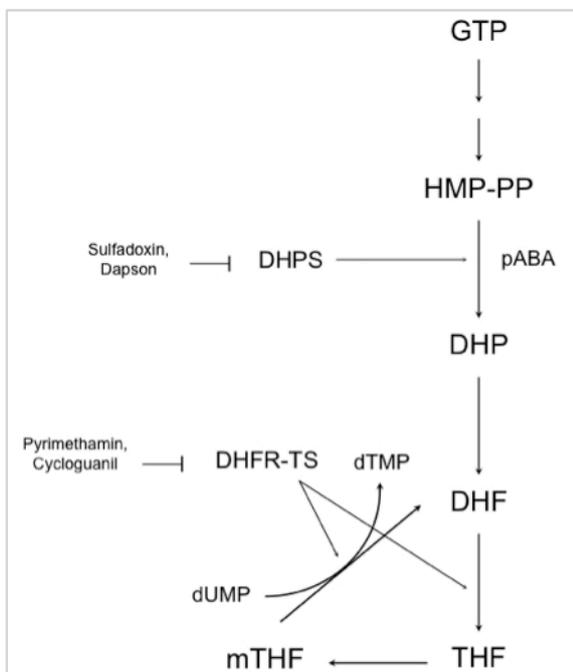


Abbildung 4: Folsäurezyklus von *Plasmodium falciparum*. Abkürzungen: GTP: Guanositriphosphat, HMP-PP: 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterinpyrophosphat, DHP: Dihydropteroat, DHF: Dihydrofolat, THF: Tetrahydrofolat, mTHF: Methyltetrahydrofolat, pABA: para-Aminobenzoessäure, dUMP: Desoxyuridinmonophosphat, dTMP: Desoxythymidinmonophosphat, DHPS: Dihydropteroatsynthase, DHFR-TS: Dihydrofolatreduktase – Thymidylatsynthase (modifiziert nach Nzila [85])

Plasmodien können exogene Folsäure nicht verwerten. Sie sind bei ihrer Vermehrung auf die *de novo*-Synthese durch einen intakten Folsäurezyklus angewiesen. Die Folsäureantagonisten Pyrimethamin und Sulfadoxin hemmen synergistisch zwei wichtige Enzyme des Folsäurezyklus der Malariaerreger [40].

Das Sulfonamid Sulfadoxin hemmt die Bildung von 7,8-Dihydropteroat aus p-Aminobenzoessäure und 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterinpyrophosphat durch die Dihydropteroatsynthase (DHPS) [46]. Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) ist ein Schlüsselenzym der Nucleotidbiosynthese. Sie katalysiert die Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat. Analog zu anderen Protozoen bildet sie mit der Thymidylatsynthase (*ts*) ein bifunktionales Protein (*dhfr-ts*). Dieses wird unter anderem durch Pyrimethamin gehemmt [46].

Für Plasmodien resultiert aus der Inhibierung von DHFR und DHPS eine gestörte DNA-Synthese durch einen Mangel an biologisch aktiver Tetrahydrofolsäure und an dem Nucleotid dTMP. Daher ist die Toxizität von S/P am stärksten ausgeprägt, wenn die DNA-Replikation in der späten erythrozytären Schizogonie ihren Höhepunkt erreicht [46].

Als Nebenwirkungen werden unter S/P besonders gastrointestinale und hämatopoietische Störungen, Nephrotoxizität sowie allergische Reaktionen beschrieben [59]. Selten treten schwere Hautreaktionen wie das Lyell- und das Steven-Johnson-Syndrom auf [89].

1.7. DIE BEDEUTUNG VON DHPS UND DHFR FÜR DIE ENTWICKLUNG VON ANTIFOLATRESISTENZ

Die Antifolatresistenz ist die bisher am besten untersuchte Medikamentenresistenz. Mutationen an zwei Genen, deren Produkte wesentlich an der Folsäurebiosynthese beteiligt sind, werden für verminderte S/P-Sensitivität verantwortlich gemacht [91].

Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung definierter „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) bzw. Mutationen des Dihydrofolatreduktase-Gens (*dhfr*) in der Entwicklung der Pyrimethaminresistenz, besonders der Codons 108, 59 und 51.

Der Austausch der Aminosäure Serin durch Asparagin an Codon 108 (108S→108N), scheint eine Schlüsselrolle in der Resistenzentwicklung zu spielen [25, 90]. Zusätzliche Mutationen führen zur sukzessiven Verminderung der Sensitivität gegenüber Pyrimethamin. Von Bedeutung sind der Austausch von Cystein durch Arginin an Codon 59 (59C→59R) und der Ersatz von Asparagin durch Isoleucin an Codon 51 (51N→51I) [91, 92, 122]. Erreger mit der *dhfr*-Tripelmutation, also der Kombination aus 108N, 59R und 51I, zeigen *in vitro* Unempfindlichkeit gegenüber Pyrimethamin. Ein zusätzlicher Austausch von Isoleucin durch Leucin an Codon 164 (164I→164L) wird für hochgradige Resistenz sowohl gegen Pyrimethamin als auch gegen Cycloguanil verantwortlich gemacht [61]. 164L wurde im Studienzeitraum in Afrika nur vereinzelt beschrieben [5, 38], scheint sich in jüngster Zeit jedoch insbesondere in Ostafrika zu verbreiten [48]. Etabliert ist 164L in den Gebieten hochgradiger S/P-Resistenz in Südamerika und Südostasien [91]. Der Ersatz von Serin durch Threonin an Codon 108 (108S→108T) scheint nur selten vorzukommen und mit Cycloguanilresistenz assoziiert zu sein [43].

Weniger klar ist die Datenlage bezüglich der Sulfadoxinresistenz. Verschiedene Punktmutationen des Dihydropteroatsynthase-Gens (*dhps*) wurden mit Sulfadoxinresistenz assoziiert, hauptsächlich der Codons 436, 437, 540, 581 und 613 [91, 121, 122]. Vor allem die Substitution der Aminosäure Alanin durch Glycin (437A→437G) scheint elementar für die Sulfadoxinresistenz und somit das Pendant zu *dhfr*-108N zu sein [121, 122]. Analog der Entwicklung der Pyrimethaminresistenz wird anscheinend die Empfindlichkeit gegenüber Sulfadoxin allmählich durch weitere Mutationen vermindert, insbesondere durch den Austausch von Lysin durch Glutamat an Codon 540 (540K→540E) [54, 91, 115]. Aber auch 581G, 613S und 613T (anstatt der Wildtypen 581A und 613A) werden für verminderte Sulfadoxinsensibilität verantwortlich gemacht. *In vitro* war dies besonders für 613S zu beobachten [115, 121, 122]. Die schwache

Verbreitung dieser Mutation lässt jedoch eine durch sie vermittelte Beeinträchtigung des Erregers auf anderer Ebene vermuten [84, 115]. An Codon 436 wurden neben dem Wildtypen 436S zwei SNPs beschrieben, 436A und 436F. *In vitro* konnte 436F mit verminderter Sulfadoxinempfindlichkeit assoziiert werden [115, 121], nicht aber 436A. Eine mögliche Interpretation ist, dass 436A eher eine Normvariante des Wildtyps als eine Mutation im eigentlichen Sinne darstellt [84].

Trotz der *in vitro* vielfach nachgewiesenen Bedeutung der genannten *dhps*-Mutationen für die S/P-Resistenz konnten *in vivo* nicht alle Studien einen signifikanten Zusammenhang mit S/P-Therapieversagen zeigen [8, 75]. Zahlreiche Studien allerdings assoziierten bestimmte Kombinationen von Mutationen in den *dhfr*- und *dhps*-Genen mit verminderter S/P-Sensibilität auch *in vivo*. Insbesondere wurde dies für die *dhfr*-Triplemutation gezeigt, vornehmlich mit *dhps*-437G als *dhfr/dhps*-Quadrupelmultation sowie mit 437G und 540E als *dhfr/dhps*-Quintupelmultation [61, 77, 84].

Als Überwachungsmittel für S/P-Resistenz wird überwiegend die *dhfr*-Triplemutation befürwortet [8, 75, 77, 84]. Kublin *et al.* dagegen favorisierten die *dhfr/dhps*-Quintupelmultation aufgrund der geringeren Prävalenz als den spezifischeren Marker und beschränkten diesen sogar auf die Kombination aus *dhfr*-59R und *dhps*-540E, durch die das Vorliegen der Quintupelmultation sicher angezeigt würde [61].

1.8. DIE BEDEUTUNG VON PFCRT FÜR DIE ENTWICKLUNG VON CHLOROQUINRESISTENZ

Im Wesentlichen wurden bisher Mutationen an zwei Genen mit verminderter Chloroquinsensitivität assoziiert. Am eindeutigsten ist die Datenlage zu dem im Jahre 2000 erstbeschriebenen *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (Pfcrt) [41]. Das durch das *pfcr*-Gen codierte Protein befindet sich in der Membran der parasitären Verdauungsvakuole. Durch welchen Mechanismus die Mutation eine CQ-Resistenz bedingt, ist bisher nicht vollständig geklärt. Es wurde allerdings beobachtet, dass die CQ-Konzentration in den Verdauungsvakuolen resistenter Parasiten vier bis zehn Mal geringer ist als in denen sensibler *P. falciparum*-Klone. Durch Mutation veränderter Pfcrt führt vermutlich zu einem verstärkten CQ-Efflux aus der Verdauungsvakuole und somit zu verminderter Toxizität für die Plasmodien [100].

Besonders die Substitution von Lysin durch Threonin an Codon 76 des *pfcr*-Gens (76K→76T) ist bei nahezu allen CQ-resistenten Plasmodien zu finden und wird als

Schlüsselmutation angesehen [27, 41, 71, 104]. Darüber hinaus wurden Mutationen der Codons 72, 74 und 75 beschrieben, die meist in Kombination mit 76T auftreten. Aus definierten Mutationskombinationen resultierende Haplotypen sind interessanterweise regionaltypisch. In Afrika und Südostasien findet man neben 76T häufig einen Austausch von Methionin durch Isoleucin an Codon 74 (74M→74I) und von Asparagin durch Glutamat an Codon 75 (75N→75E). Dies führt zur Ausbildung des Aminosäure-Haplotyps CVIET der Codons 72-76 im Gegensatz zum Wildtyp CVMNK. Der bei Austausch von Cystein durch Serin an Codon 72 entstehende Haplotyp SVMNT wurde ursprünglich als charakteristisch für südamerikanische Parasiten gehalten [41]. Es zeigte sich aber, dass er auch in Papua-Neuguinea weit verbreitet ist [71] und in Indien und Indonesien ähnlich häufig wie der CVIET-Haplotyp vorkommt [52, 120]. Weitere Haplotypen wurden beschrieben, jedoch deutlich seltener als SVMNT und CVIET [79].

Das *Plasmodium falciparum multidrug resistance* Gen 1 (*pfmdr1*) codiert ein in der Lysosomenmembran lokalisiertes P-Glycoprotein-Homologon (Pgh1). Diverse Mutationen, insbesondere der Codons 86, 1034, 1042 und 1246, wurden beschrieben. Die Datenlage bezüglich dieses Gens ist uneinheitlich. Einige Studien belegen eine Assoziation mit CQ-Resistenz [27, 31, 95, 113], andere widerlegen sie [15, 30, 33]. Vermutlich haben Mutationen von *pfmdr1* in Anwesenheit von *pfcr1*-76T einen modulierenden Einfluss auf CQ-Resistenz [95, 113].

Die weitgehend ungeklärte Bedeutung von Mutationen des *pfmdr*-Gens befähigt diese (noch) nicht als Marker für potentielle CQ-Resistenz. Als solcher ist bislang nur die *pfcr1*-76T allgemein anerkannt, auch wenn CQ-Resistenz nicht ausschließlich durch diese einzelne Mutation zufrieden stellend erklärt werden kann [10, 15, 27, 123].

1.9. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Malaria tropica ist nicht nur eine der bedeutendsten tropischen Infektionskrankheiten. Durch hohe und weiter steigende Reise- und Migrationsaktivität besteht auch eine hohe klinische Relevanz für Deutschland und Europa. [96] Jedes Jahr wird eine Vielzahl von *Plasmodium falciparum*-Klonen durch infizierte Reisende und Immigranten aus endemischen Malariagebieten nach Europa importiert.

Die zunehmende Resistenz gegenüber zwei der ältesten und preisgünstigsten Medikamente, Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin, stellt für diese Erkrankten selbst keine direkte Bedrohung dar, werden sie in den Krankenhäusern der

Industrienationen mit hocheffektiven Medikamenten behandelt, welche in Endemiegebieten häufig nur begrenzt erhältlich sind [55]. In einer Vielzahl von Endemiegebieten finden jedoch sowohl Chloroquin als auch Sulfadoxin/Pyrimethamin noch breite Verwendung - trotz des Wissens um die abnehmende Wirksamkeit. Als wesentliche Gründe hierfür sind langjährige Erfahrungen mit diesen Medikamenten anzusehen sowie die häufig noch fehlende breite Verfügbarkeit neuerer, wirksamerer Medikamente, insbesondere der Artemisininbasierten Kombinationstherapien [129].

Verschiedene Studien zeigen dennoch ein hohes Potential der Sammlung von Daten und Parasitenmaterial aus dem Patientenkollektiv der Reisenden und Immigranten, insbesondere hinsichtlich der Bewertung der Wirksamkeit von CQ und S/P [45, 55, 64]. Die Untersuchung definierter Codons resistenzassoziierter Gene bietet die Möglichkeit einer kontinuierlichen, zeitnahen Überwachung der Mutationsraten von Parasiten aus den unterschiedlichsten endemischen Gebieten. So kann entstehende Resistenz entdeckt und bestehende Resistenz weiter verfolgt werden.

Die Validität der Überwachung molekularer Resistenzmarker durch Untersuchung einer großen Anzahl nach Europa importierter *Plasmodium falciparum*-Isolate soll in dieser Arbeit geprüft werden. Für die vorliegende Arbeit waren folgende Aspekte von besonderem Interesse:

- Die 2005 publizierte Methode des SSOP-ELISAS [3] für die schnelle Ermittlung von Mutationen sollte an einer großen Probenanzahl evaluiert werden
- Die Prävalenz von Punktmutationen in den mit Chloroquin- und S/P-Resistenz assoziierten Genen sollte aufgezeichnet werden
- Es sollte geprüft werden, ob sich Änderungen im Medikamentenregime in Form von Veränderungen der Mutationsprävalenz innerhalb des Untersuchungszeitraumes nachvollziehen lassen
- Untersucht wurde auch, ob die medikamentöse Prophylaxe als individueller Faktor den molekularen Resistenzstatus der infizierenden Parasiten beeinflussten

Unter Berücksichtigung dieser Zielsetzung wurden insgesamt neun Codons der *dhfr*- und *dhps*-Gene als Marker für S/P-Resistenz sowie fünf Codons des bis zum Zeitpunkt der Untersuchung einzigen allgemein akzeptierten Markers für Chloroquinresistenz, des *pfcr*-Gens, an *P. falciparum*-Klonen untersucht, die zwischen 1999 und 2004 nach Europa importiert wurden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Proben

Die Blutproben wurden zwischen 1999 und 2004 im Rahmen des European Network on Imported Infectious Disease Surveillance (TropNetEurop) gesammelt. TropNetEurop umfasst aktuell 57 Zentren aus 17 europäischen Ländern [116]. Die Initiierung erfolgte 1998 zur Überwachung quantitativ bedeutsamer, nach Europa importierter infektiöser Erkrankungen. Die Mitgliedszentren nutzen ein standardisiertes und anonymisiertes Meldeverfahren zur Meldung importierter Krankheitsfälle, welche in der zentralen Datenbank gesammelt werden. Neben der Registrierung von Erkrankungen an Schistosomiasis und Dengue [0], war die Überwachung importierter Malariafälle von Anfang an eines der Hauptanliegen von TropNetEurop [55, 56]. Die Proben wurden von Reisenden und Migranten gewonnen, die sich mit Symptomen einer Malaria in den Mitgliedszentren vorstellten und bei denen eine Malaria tropica mikroskopisch durch Ausstrich und Dicken Tropfen gesichert wurde. 10 µl Vollblut wurden auf Filterpapier luftgetrocknet und ins Institut für Tropenmedizin nach Berlin gesendet.

Die Untersuchung war als fortlaufende Qualitätskontrolle bestehender Untersuchungsprozesse angelegt. Sie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Zusätzlich dazu holten viele der Mitgliedszentren Voten der für sie zuständigen Ethikkommissionen ein.

2.1.2. Chemikalien, Enzyme und Nukleotide

Tabelle 1: Chemikalien, Enzyme und Nukleotide, die im Labor verwendet wurden.

Chelex: InstaGene™ Matrix	BioRad Laboratories GmbH, München
Extraktionskit: QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
HotStarTaq DNA Polymerase, mit 10x PCR Buffer und 25mM MgCl ₂	Qiagen GmbH, Hilden
100 mM dNTP Set, PCR Grade	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Oligonukleotidprimer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Restriktionsendonukleasen, BSA, NE-Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
sequenzspez. Oligonukleotidprobes (SSOPs)	MWG Biotech AG, Ebersberg
100bp-DNA-ladder	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

Ethidiumbromid 10 mg/ml	BioRad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Mineralöl: light oil for molecular biology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Streptavidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Sodium(Natrium-)dodecylsulfat (SDS) 10 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
o-Phenyldiamin-Dihydrochlorid-Tbl. (OPD), 10mg/Tablette	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Anti-Digoxigenin-POD Fab-Fragments 150U	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AlfaAesar, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe
Tris-Base (Hydroxymethyl-aminomethan)	Applichem GmbH, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure, 97 %	Ferak GmbH, Berlin
NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NaCl	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.3. Puffer, Lösungen und Gele

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Gele

TBE-Puffer 10x, pH 8,0, pro Liter:

108 g Tris-Base (=0,89M), 55 g Borsäure (=0,89M), 40 ml 0,5molare EDTA (20mM), 960 ml Aqua bidest zur Verwendung TBE-Puffer 0,5x: Verdünnung mit Aqua bidest 1:20

PBS-Puffer, pH 7,2, pro Liter:

7,2 g Natriumchlorid (NaCl, =0,12M), 1,48 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄, =10mM), 0,43 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄=3mM), 1000 ml Aqua bidest

Waschpuffer, pro Liter:

999 ml PBS-Puffer, 1 ml Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)

TMAC-Lösung, pro Liter:

600 ml 5molare TMAC-Lösung (=3M), 50 ml 1molare Tris-Base, pH8 (=50mM), 10 ml 10 % SDS, 4 ml 0,5molare EDTA, pH8 (=2mM), 336 ml Aqua bidest

Substratstammlösung I (SL-I):

23 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄, =60mM), 2500 ml Aqua bidest

Substratstammlösung II (SL-II):

9,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄, =20mM), 2500 ml Aqua bidest

Gebrauchssubstratlösung:

1000 ml SL-I, 10-40 ml SL-II, auf pH 5,0 einstellen

Achtmolare Schwefelsäure (H₂SO₄):

56 ml Aqua bidest, 44 ml 97 %-H₂SO₄

Agarosegel 1,5 %:

40 ml TBE-Puffer 0,5x, 0,6 g Agarose, 7µl Ethidiumbromid (1 mg/ml)

2.1.4. Gebrauchsgegenstände und Geräte

Tabelle 3: Während der Laborarbeit verwendete Geräte

Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge: Mikro 24-48R	Hettrich Zentrifugen GmbH&Co.KG, Tuttlingen
Vakuumzentrifuge: CON-1000	Fröbel Labortechnik, Lindau
Wasserbad, julabo 12b	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Heizblock	Firma Liebisch, Bielefeld
Horizontale Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen
Elektroden 200/2.0 Power supply	BioRad Laboratories GmbH, München
Reagenzglasschüttler	Fröbel Labortechnik, Lindau
Wippe	Biometra GmbH, Göttingen
Hybridisierungsöfen	LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg
Mikrowelle	Firma Bifinett
Fotoapparat: MP-4 land camera	Polaroid Corp., Waltham, MA, USA
UV-Transilluminator (312 nm)	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
pH-Meter Calimatic 761	Knick GmbH & CoKG, Berlin
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 4: Während der Laborarbeit verwendete Gebrauchsgegenstände

Sofortbildfilm 667, ISO3000/DIN36	Polaroid Corp., Waltham, MA, USA
Reaktionsgefäße (500, 1000 & 1500 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Standardtips (10, 100 & 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Firma Saarestedt, Nümbrecht
96 Well PCR Platten	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
96 Well Mikroplatten, ELISA, microlon 200	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Microseal F Sealing Foil	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

2.2. METHODEN

2.2.1. DNA-Präparation

2.2.1.1. DNA-Extraktion nach der Chelex-Methode

Die Extraktion der *P. falciparum*-DNA erfolgte nach der von Kain und Lanar beschriebenen Methode [57] mithilfe eines chelatbildenden Harzes (Chelex). Dafür wurde die Hälfte eines auf Filterpapier getrockneten Blutstropfens (entsprechend 5 µl Vollblut) in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. 200 µl Chelex-Lösung wurden in jedes Gefäß pipettiert, das Gefäß verschlossen, 30 Sekunden geschüttelt und 15 Minuten bei 100°C im Wasserbad gekocht. Nach dem Kochen wurde jede Probe erneut

geschüttelt und zum Trennen der DNA vom Chelex fünf Minuten bei 12000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand, etwa 100 µl, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und nochmals bei 12000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. 80 µl des Überstandes wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.1.2. DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit

Bei einigen der Blutproben mit geringer Parasitenlast ließ sich nicht ausreichend DNA mit der Chelex-Methode extrahieren. Sie zeigten in der folgenden Gelelektrophorese oder im SSOP-ELISA ein negatives Ergebnis. Diese Proben wurden erneut mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) nach dem im zugehörigen Handbuch, Ausgabe Februar 2003, beschriebenen „Dried Blood Spot Protocol“ extrahiert:

Ein halber Blutstropfen, entsprechend fünf Mikroliter, wurde in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben und mit 180 µl des zum Extraktionskit gehörigen Gewebelysepuffers (ATL) zehn Minuten bei 85°C inkubiert. Jeder Inkubation und jedem Schütteln folgte eine kurze Zentrifugation, um Tropfen vom Deckel zu entfernen. 20 µl Proteinase K-Stammlösung wurden dazu gegeben, geschüttelt und bei 56°C eine Stunde inkubiert. Dann wurde die Probe mit 200 µl eines weiteren Lysepuffers (AL) versetzt. Es erfolgte eine erneute Inkubation von zehn Minuten bei 70°C. 200 µl Ethanol (96 %) wurden ins Reaktionsgefäß gegeben und geschüttelt. Der Inhalt wurde in die „QIAamp spin column“ gegeben, eine nach unten trichterförmig geöffnete Zentrifugationssäule mit am unteren Pol gelegener Membran, welche wiederum in einem Reaktionsgefäß (2 ml) stand. Die Probe wurde eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, das Filtrat verworfen.

Die „spin column“ mit der in der Membran haftenden DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Die Säule wurde mit 500 µl Waschpuffer 1 (AW1) gefüllt, bei 8000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß gestellt. Dieser Schritt wurde mit Waschpuffer 2 (AW2) wiederholt, die „spin column“ in Reaktionsgefäß gestellt und mit 150 µl Elutionspuffer (AE) gefüllt, der die DNA aus der Membran der Säule löste. Einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine erneute einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm. Die gelöste DNA befand sich nun im Filtrat, die „spin column“ wurde verworfen.

Zur weiteren Konzentrierung der DNA wurden die Proben etwa eine Stunde unter Vakuum zentrifugiert, bis das Probenvolumen auf etwa 50-100 µl reduziert war. Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion

2.2.2.1. Grundprinzipien der Polymerasekettenreaktion

Die 1983 von Kary B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) stellte einen Durchbruch für die Gentechnologie dar [99]. Die zyklische Wiederholung dreier Reaktionsschritte imitiert den Replikationsmechanismus der DNA in der Zelle. Durch jeden Zyklus wird ein definierter DNA-Abschnitt verdoppelt, so wird eine exponentielle Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte erreicht.

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf 94°C denaturiert, die beiden zueinander komplementären DNA-Einzelstränge werden also voneinander getrennt. Nach raschem Abkühlen auf etwa 50°C werden spezifische synthetische Oligonukleotide (Primer) angelagert, die der Sequenz am 5'Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes komplementär sind (Hybridisierung). Bei einer Temperatur von etwa 70°C werden schließlich die Einzelstränge ausgehend von dem Primer vervollständigt, sodass wieder zwei Doppelstränge vorhanden sind (Extension). Dafür wird eine thermostabile DNA-Polymerase (meist *Taq*-Polymerase) zugegeben. Durch 40 Reaktionszyklen wird die Zielsequenz auf das etwa 10¹²-fache amplifiziert.

2.2.2.2. Durchführung der nested-PCR

In der Studie kam ein geschachteltes PCR-Verfahren (nested-PCR) zum Einsatz, bei welchem zur Sensitivitätssteigerung ein Abschnitt des Produkts der ersten PCR (nested I) in einer zweiten PCR (nested II) erneut amplifiziert wird. Die Durchführung folgte publizierten Protokollen. Eine nested-PCR, wie von Pearce *et al.* beschrieben, wurde zur Amplifikation der *dhfr*- und *dhps*-Fragmente verwendet [87]. Die Vervielfältigung des *pfcr*-Fragments erfolgte nach Djimde *et al.* [27]. Wie von Alifrangis *et al.* beschrieben [3] erfolgte eine Kopplung des 5'-Endes der Primer M9, R/ und TCRD2 mit Biotin.

In der PCR nested I wurden 650 Basenpaare (bp) lange Abschnitte des *dhfr*-Gens, 770 bp lange Abschnitte des *dhps*-Gens und 537 bp lange Abschnitte des *pfcr*-Gens amplifiziert. Kleinere Abschnitte innerhalb der ersten Amplifikate wurden in der nested II vervielfältigt. Deren Längen betragen 594 bp (*dhfr*), 711 bp (*dhps*) bzw. 145 bp (*pfcr*).

1 µl DNA (nested I) oder PCR-Produkt (nested II) wurden mit 19 µl Reaktionslösung, dem Mastermix, in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt. Vor der *dhfr*-nested II wurde das Produkt der nested I im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt.

Der Mastermix unterschied sich für die nested I bzw. II für *dhfr* und *dhps* lediglich in den Primern. 19 µl Mastermix enthielten 16,14 µl Wasser, 2 µl PCR-Puffer, 0,16 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 0,2 mM je Base), jeweils 0,25 µl der entsprechenden Primer (0,25 µM je Primer) und 0,2 µl HotStarTaq Polymerase (1U). Auch der Mastermix der nested I und II für *pfcr1* unterschied sich nur in den Primern. 19 µl Mastermix enthielten 13,79 µl Wasser, 0,8 µl MgCl₂ (1 mM), 2 µl PCR-Puffer, 1 µl je Primer (1 µM), 0,16 µl dNTPs (je 0,2 mM) und 0,25 µl HotStar-Taq (1,25 U). Die Primer der verschiedenen PCRs werden unter 2.2.2.4 näher charakterisiert.

Die verschiedenen PCR-Programme sind in der folgenden Tabelle beschrieben:

Tabelle 5: Aufschlüsselung der PCR-Programme: Bei Programm *dhfr* nested II erfolgen 5 Zyklen mit zwei Minuten Hybridisierung bei 44°C, danach 35 Zyklen mit einer Minute Hybridisierung bei 44°C. Programm *dhps* ist für nested I&II gleich.

PCR-Programm	<i>dhps</i> nested I+II	<i>dhfr</i> nested I	nested II	<i>pfcr1</i> nested I	nested II
Denaturierung I	94°C, 15 min	94°C, 15 min	94°C, 15 min	94°C, 15 min	94°C, 15 min
Denaturierung	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 1 min	95°C, 30 s	92°C, 30 s
Hybridisierung	51°C, 2 min	52°C, 2 min	44°C, 2 (1) min	56°C, 30 s	48°C, 30 s
Extension	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min	60°C, 1 min	65°C, 30 s
Zyklen	40	39	5 (35)	45	30
abschließende Extension	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	60°C, 3 min	65°C, 3 min
Abkühlung	4°C	4°C	4°C	10°C	10°C

Die Amplifikation fand in 96-Loch-PCR-Platten statt. Bei jeder PCR wurden als Erfolgskontrolle mindestens zwei Positivkontrollen (meist 3D7 und Dd2) sowie 2-3 Negativkontrollen (reiner Mastermix) zum Ausschluss einer Kontamination verwendet.

2.2.2.3. Erfolgskontrolle der PCR

Zur Erfolgskontrolle der PCR sowie zum Ausschluss einer Kontamination wurden 22 Stichproben jeder 96-Loch-PCR-Platte auf ein Agarosegel (1,5 %) aufgetragen. Agarose und 0,5xTBE(TRIS-Borat-EDTA)-Puffer wurden in den unter 2.1.3. genannten Mengen für zwei Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht, mit Ethidiumbromid versetzt, in eine Gelform gegossen und bis zum Erstarren im Kühlschrank gelagert. Mittels Elektrophorese wurden die Proben bei 80 V und einer Laufzeit von 30-40 Minuten in 0,5xTBE-Puffer aufgetrennt. Ein 100bp-Größenstandard wurde zusätzlich zu den Proben auf das Gel gegeben. Durch Interkalation des Ethidiumbromids im Gel mit

der DNA konnten die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Neben den Stichproben wurden immer Positiv- und Negativkontrollen mit auf das Gel aufgetragen.

2.2.2.4. Charakterisierung verwendeter Oligonukleotidprimer

Tabelle 6: Namen und Basensequenzen verwendeter Primer, sowie die Länge der zugehörigen PCR-Produkte

PCR	Primer	Basensequenz	Produktlänge	
<i>dhfr</i>	nested I	M1	5' TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC	650 bp
		M7	5' CTA GTA TAT ACA TCG CTA ACA	
	nested II	M9 *	5' CTG GAA AAA ATA CAT CAC ATT CAT ATG	594bp
		M3b	5' TGA TGG AAC AAG TCT GCG ACG TT	
<i>dhps</i>	nested I	N1	5' GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	770bp
		N2	5' TTC CCTC ATG TAA TTC ATC TGA	
	nested II	R2	5' AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	711bp
		R/ *	5' AAT TGT GTG ATT TCT CCA CAA	
<i>pfcr1</i>	nested I	TCRP1	5' CCG TTA ATA ATA AAT ACA CGC AG	537bp
		TCRP2	5' CGG ATG TTA CAA AAC TAT AGT TAC G	
	nested II	TCRD1	5' TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT	145bp
		TCRD2 *	5' CAA AAC TAT AGT TAC CAA TTT TG	

* Primer mit Biotinrest am 5'-Ende

2.2.3. SSOP-ELISA

2.2.3.1. Durchführung des SSOP-ELISAs

Der SSOP-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurde mit leichten Modifikationen von Alifrangis *et al.* übernommen [3]. Auf jeder Mikrotiterplatte waren acht Löcher für die unter 2.2.3.4 aufgeführten Positivkontrollen sowie für zwei bis drei Negativkontrollen (100 µl Waschpuffer) vorbehalten.

2.2.3.1.1. Coating

100 µl Streptavidin, in PBS(phosphate buffered saline)-Puffer gelöst (1mg/ml), wurde in jedes Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gefüllt und sechs Stunden zur Beschichtung im Kühlschrank belassen. Mit Streptavidin beschichtete Platten waren im Kühlschrank bis zu 14 Tagen haltbar. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden die Mikrotiterplatten dreimal sorgfältig mit Waschpuffer gespült, um nicht gebundenes Streptavidin zu entfernen und getrocknet.

2.2.3.1.2. Inkubation I

Das Produkt der nested-PCR wurde mit destilliertem Wasser verdünnt (1:10), fünf Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf 4°C abgekühlt. Jedes Loch der Platte wurde mit 100 µl Waschpuffer (4°C) gefüllt. Dazu wurden jeweils zwei Mikroliter des PCR-Produktes gegeben, bei Untersuchung der Codons 50/51 des *dhfr*-Gens waren 4 µl PCR-Produkt pro Loch notwendig. Die Platten wurden bei Raumtemperatur unter Wippen eine Stunde inkubiert. Dabei sollte das PCR-Produkt mit dem Biotinrest an das Streptavidin auf dem Plattenboden binden. Dieser Schritt konnte auch über Nacht im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt werden. Der Inkubation folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, um nicht gebundenes PCR-Produkt zu entfernen.

2.2.3.1.3. Inkubation II

TMAC(Tetramethylammoniumchlorid)-Lösung wurde auf 53°C erwärmt und auf 50 ml fassende Reaktionsgefäße verteilt. Zu 12 ml TMAC-Lösung wurden 24 µl des jeweiligen SSOPs (zwei µM/ml) gegeben, die vom Hersteller am 3'-Ende mit Digoxigenin konjugiert waren, im Falle der Codons 50/51 des *dhfr*-Gens 120 µl. Diese Lösung wurde bis zur Weiterverwendung bei 53°C im Wasserbad belassen.

Jedes Loch wurde mit je 100 µl der jeweiligen SSOP-Lösung gefüllt und unter Schütteln eine Stunde bei 53°C im Hybridisierungssofen zur Inkubation belassen. Hierbei handelte es sich um den zentralen Versuchsschritt, bei welchem sich die passenden SSOPs an die komplementären Basen des PCR-Produkts binden sollten. Danach wurde die SSOP-Lösung im Abzug entfernt und die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Unter Schütteln folgte zweimal eine zehnminütige Inkubation mit 100 µl TMAC-Lösung zur Entfernung unspezifisch gebundener SSOPs. Die idealen Waschttemperaturen waren für jedes SSOP verschieden (siehe 2.2.3.2). Zur Entfernung letzter TMAC-Reste wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

2.2.3.1.4. Inkubation III

150 Units Peroxidase-konjugierte Anti-Digoxigenin(DIG)-Antikörper in einem Milliliter PBS-Puffer wurden mit Waschpuffer im Verhältnis 1:1000 verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden in jedes Plattenloch gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Wippen inkubiert. Die Antikörper sollten hierbei an die Digoxigeninreste eventuell gebundener SSOPs binden. Wieder folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer.

2.2.3.1.5. Enzymreaktion

Zwei Tabletten o-Phenyldiamin-Dihydrochlorid (OPD) wurden in 50 ml Gebrauchssubstratlösung gelöst (c[OPD]=0,4mg/ml) und unmittelbar vor Gebrauch mit 20 µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) versetzt. Jedes Loch wurde mit 100 µl dieser Lösung gefüllt und die Platten für 15-30 Minuten im Dunkeln inkubiert, bis sich eine deutliche Färbung einstellte. Eine positive (orange-braune) Farbreaktion zeigte eine Bindung des jeweiligen SSOPs an DNA an. Die Reaktion wurde mit 20 µl achtmolarer Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt und die optische Dichte (OD) jedes Loches bei 492 nm gemessen.

2.2.3.2. Sequenzen und Reaktionsbedingungen der SSOPs

Tabelle 7: verwendete SSOPs und deren Nukleotidsequenzen mit jeweiliger Reaktionskonzentration und optimaler Waschttemperatur. Polymorphismen sind fett markiert.

SSOP	SSOP-Sequenz	Konzentration in nM/ml	Waschttemperatur in °C
<i>Dhfr</i>			
50/51 CN	TGG AAA TGT AAT TCC CTA	20	58
50/51 CI	TGG AAA TGT ATT TCC CTA		
59 C	TAA CTG CAC AAA AAT ATT	4	60
59 R	TAA CTG CAC GAA AAT ATT		
108 S	A AGA ACA AGC TGG GAA AG	4	62
108 N	A AGA ACA AAC TGG GAA AG		
108 T	A AGA ACA ACC TGG GAA AG		
164 I	GT TTT ATT ATA GGA GGT T	4	62
164 L	GT TTT ATT TTA GGA GGT T		
<i>dhps</i>			
436/437 AA	GAA TCC GCT GCT CCT TTT	4	62
436/437 AG	GAA TCC GCT GGT CCT TTT		
436/437 SA	GAA TCC TCT GCT CCT TTT		
436/437 SG	GAA TCC TCT GGT CCT TTT		
436/437 FA	GAA TCC TTT GCT CCT TTT		
436/437 FG	GAA TCC TTT GGT CCT TTT		
436/437 CA	GAA TCC TGT GCT CCT TTT		
540 K	ACA ATG GAT AAA CTA ACA		
540 E	ACA ATG GAT GAA CTA ACA		
581 A	A GGA TTT GCG AAG AAA CA	4	60
581 G	A GGA TTT GGG AAG AAA CA		
613 A	GA TTT ATT GCC CAT TGC	4	60
613 S	GA TTT ATT TCC CAT TGC		
613 T	GA TTT ATT ACC CAT TGC		
<i>pfcr1 c72-76</i>			
CVMNK	TA TGT GTA ATG AAT AAA A	4	60
CVIET	TA TGT GTA ATT GAA ACA A		
SVMNT	TA AGT GTA ATG AAT ACA A		

Für die meisten der untersuchten Codons des *dhfr*- und *dhps*-Gens gab es ein einzelnes SSOP. Auf dem Gen unmittelbar benachbarte Codons wurden jedoch gemeinsam getestet. So gab es je ein gemeinsames SSOP für Wildtyp und Mutation der Codons 50 und 51 des *dhfr*-Gens sowie sieben gemeinsame SSOPs für die Codons 436 und 437 des *dhps*-Gens, eines für den Wildtyp und sechs für die Mutationen.

Für die Untersuchung des *pfcr*-Gens wurden SSOPs verwendet, welche die fünf nebeneinander liegenden Codons 72-76 prüften. Somit wurden verschiedene Haplotypen untersucht. Ein SSOP untersuchte die Wildtypsequenz während zwei die beiden gängigsten Mutationskombinationen in diesen Codons anzeigten.

2.2.3.3. Interpretation des ELISAs

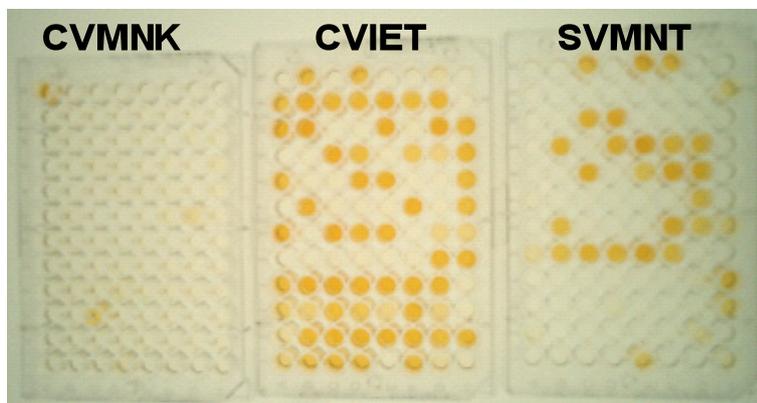


Abbildung 5: Mikrotiterplatten mit einem abgeschlossenen SSOP-ELISA für *pfcr* (Bild mit freundlicher Genehmigung von Frau Sabine Dittrich)

Beim SSOP-ELISA zeigte sich auch bei den Negativkontrollen stets eine Grundfärbung von 0,1-1,0 OD. Für jeden Versuch wurde entsprechend dem höchsten OD-Wert der Negativkontrollen ein Hintergrundwert bestimmt. Nur Proben, die eine höhere optische Dichte zeigten als

dieser Hintergrundwert wurden als positiv gewertet. In der Regel lagen diese OD-Werte zwischen 1,0 und 3,5.

2.2.3.4. *Plasmodium falciparum*-Stämme

Die Laborstämme 3D7 und Dd2 dienten als Positivkontrollen für die PCR. Als Positivkontrollen für den SSOP-ELISA wurden mehrere bekannte Laborstämme verwendet. Neben den Stämmen 3D7 aus Südamerika und Dd2 aus Indochina waren dies die Stämme FCR3 aus Gambia, 7g8 aus Brasilien und K1 aus Thailand. Die DNA-Extraktion der Kontrollstämme erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (siehe 2.2.1.2). Die extrahierte DNA wurde bei -20°C gelagert und bei Bedarf weiter verwendet.

Bei der Untersuchung von *dhfr* wurden die Stämme 3D7 als Wildtypkontrolle, Dd2 als Kontrolle für 51I, 59R und 108N sowie FCR3 als Kontrolle für 108T und 7g8 als

Kontrolle für 51I und 108N verwendet. Die aus Thailand stammende Blutprobe Nr. 518 des eigenen Probenpools zeigte im SSOP-ELISA ein positives Ergebnis für 164L. Nach deren Bestätigung im Restriktionsverdau nach Duraisingh *et al.* [32] wurde diese Probe (T518) als zusätzliche Positivkontrolle verwendet.

Tabelle 8: Aminosäuresequenzen des *dhfr*-Wildtyps und der verwendeten Kontrollstämme in den untersuchten Codons. Mutationen sind fett markiert.

Codon	50	51	59	108	164	Haplotyp
Wildtyp	Cys	Asn	Cys	Ser	Ile	CNCSI
3D7	Cys	Asn	Cys	Ser	Ile	CNCSI
Dd2	Cys	Ile	Arg	Asn	Ile	CIRNI
FCR3	Cys	Asn	Cys	Thr	Ile	CNCTI
7g8	Cys	Ile	Cys	Asn	Ile	CICNI
T518	Cys	Ile	Arg	Asn	Leu	CIRNL

Für *dhps* diene FCR3 als Wildtypkontrolle, 3D7 und 7g8 wurden als Kontrolle für 437G, Dd2 als Kontrolle für 436F, 437G und 613S sowie K1 als Kontrolle für 437G und 581G verwendet. Der einzige Nachweis von 613T wurde mittels Enzymverdau [32] bestätigt.

Tabelle 9: Aminosäuresequenzen des *dhps*-Wildtyps und der verwendeten Kontrollstämme in den untersuchten Codons. Mutationen sind fett gedruckt.

Codon	436	437	540	581	613	Haplotyp
Wildtyp	Ser	Ala	Lys	Ala	Ala	SAKAA
3D7	Ser	Gly	Lys	Ala	Ala	SGKAA
Dd2	Phe	Gly	Lys	Ala	Ser	FGKAS
FCR3	Ser	Ala	Lys	Ala	Ala	SAKAA
7g8	Ser	Gly	Lys	Ala	Ala	SGKAA
K1	Ser	Gly	Lys	Gly	Ala	SGKGA

Für die Untersuchung des *pfcr*-Gens wurden die Laborstämme 3D7, Dd2, FCR3 und 7g8 als Positivkontrollen verwendet. 3D7 diene als Kontrolle der Wildtypsequenz CVMNK in den Codons 72-76, Dd2 und FCR3 als Kontrollen für den vor allem in Afrika verbreiteten Haplotypen CVIET und 7g8 für die besonders in Südamerika und Papua-Neuguinea vorkommende Sequenz SVMNT der entsprechenden Codons.

Tabelle 10: Aminosäuresequenzen des *pfcr*-Wildtyps und der verwendeten Kontrollstämme in den untersuchten Codons. Mutationen sind fett gedruckt.

Codon	72	73	74	75	76	Haplotyp
Wildtyp	Cys	Val	Met	Asn	Lys	CVMNK
3D7	Cys	Val	Met	Asn	Lys	CVMNK
Dd2	Cys	Val	Ile	Glu	Thr	CVIET
FCR3	Cys	Val	Ile	Glu	Thr	CVIET
7g8	Ser	Val	Met	Asn	Thr	SVMNT

2.2.4. Restriktionsverdau

Bei einigen Isolaten konnte durch den SSOP-ELISA kein eindeutiges Ergebnis für die Codons 108 und 164 des *dhfr*- und 581 und 613 des *dhps*-Gens ermittelt werden. In diesen Fällen wurde ein Restriktionsverdau angeschlossen. Diese bislang gängigste Methode bei der Untersuchung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) wurde nach dem vom Duraisingh *et al.* publiziertem Protokoll [32] durchgeführt.

2.2.4.1. Nested-PCR

Ähnlich dem SSOP-ELISA wurde ein geschachteltes (nested) PCR-Verfahren verwendet. Auch hier bestand das Reaktionsgemisch aus DNA (nested I) bzw. PCR-Produkt (nested II) und dem PCR-Ansatz, dem Mastermix.

Tabelle 11: Zusammensetzung der jeweiligen PCR-Ansätze für die verschiedenen PCR-Programme. Mengenangaben jeweils für ein Reaktionsgefäß.

PCR-Programm	Wasser	Puffer	dNTPs	Primer	Taq	Besonderheiten
<i>dhfr</i> nested I	37,86 µl	5 µl	0,2 µl	je 0,62 µl	0,3 µl	—
<i>dhfr</i> nested II	37,86 µl	5 µl	0,2 µl	je 0,62 µl	0,3 µl	—
<i>dhps</i> nested I	41,06 µl	5 µl	0,4 µl	je 0,62 µl	0,3 µl	HotStarTaq
<i>dhps</i> nested II	39,56 µl	5 µl	0,4 µl	je 0,62 µl	0,3 µl	+2,5 µl DMSO, HotStarTaq

Taq – Taq-Polymerase mit c[Polymerase]=5 U/l, DMSO – Dimethylsulfoxid

Für die PCRs *dhfr* und *dhps* nested I und für *dhfr* nested II wurden dem Mastermix jeweils 2 µl DNA zugefügt und für *dhps* nested II 1 µl PCR-Produkt.

Tabelle 12: Aufschlüsselung der PCR-Programme. Bei Programm *dhps* nested I erfolgen 5 Zyklen mit je zwei Minuten Hybridisierung bei 45°C, danach 35 Zyklen mit je einer Minute bei 45°C (in Klammern).

PCR-Programm	<i>dhfr</i> nested I	<i>dhfr</i> nested II	<i>dhps</i> nested I	<i>dhps</i> nested II
Denaturierung I	94°C, 3 min	94°C, 3 min	95°C, 15 min	95°C, 15 min
Denaturierung	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 1 min
Hybridisierung	45°C, 1,5 min	45°C, 1 min	45°C, 2 (1) min	45°C, 1 min
Extension	72°C, 1,5 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min
Zyklen	45	35	5 (35)	35
abschließende Extension	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min
Abkühlung	4°C	4°C	4°C	4°C

Tabelle 13: Namen und Basensequenzen der verwendeten Primer sowie die Länge der jeweiligen PCR-Produkte für den Restriktionsverdau.

PCR	Primer	Sequenz	Produktlänge	
<i>dhfr</i>	nested I	M1	5' TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC	642 bp
		M5	5' AGT ATA TAC ATC GCT AAC AGA	
	nested II	M3	5' TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT	522 bp
		F/	5' AAA TTC TTG ATA AAC AAC GGA ACC TTT TA	
<i>dhps</i>	nested I	R2	5' AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	710 bp
		R/	5' AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	
	nested II	L	5' ATA GGA TAC TAT TTG ATA TTG GAC CAG GAT TCG	161 bp
		L/	5' TAT TAC AAC ATT TTG ATC ATT CGC GCA ACC GG	

2.2.4.2. Durchführung des Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte wurden über Nacht mit spezifischen Restriktionsendonukleasen inkubiert, welche die amplifizierte DNA in definierte Restriktionsfragmente zerlegte.

Tabelle 14: Übersicht über die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und die optimalen Inkubationstemperaturen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen.

Codon	108			164	581	613	
Enzymname	<i>Bst</i> NI	<i>Bsr</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Bst</i> UI	<i>Mwo</i> I	<i>Age</i> I
Ansatz:							
NE-Puffer (µl)	2,5	2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
BSA (µl)	0,25	—	—	—	—	—	—
H ₂ O (µl)	16,75	12,6	17	17	17,1	17,1	17,1
Enzym (µl)	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
PCR-Produkt (µl)	5	5	5	5	5	5	5
Inkubationstemperatur	60°C	65°C	37°C	37°C	60°C	60°C	60°C

BSA- Bovines Serumalbumin

Diese wurden dann in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei Mutation eines Codons änderten sich die Schnittstellen und damit die Längen der Restriktionsfragmente.

Tabelle 15: Interpretation des Restriktionsverdau: Zuordnung der möglichen Restriktionsfragmentlängen zu Wildtypsequenz und Mutationen.

	Enzymname	Fragmentlängen	Aminosäure
<i>dhfr</i> Codon108	<i>Bst</i> NI	320 bp + 196 bp + 6 bp	Threonin
		522 bp (ungeschnitten)	Asparagin, Serin (WT)
	<i>Bsr</i> I	332 bp + 190 bp	Asparagin
		522 bp (ungeschnitten)	Serin, Threonin
	<i>Alu</i> I	320 bp + 196 bp + 6 bp	Serin
		522 bp (ungeschnitten)	Asparagin, Threonin
Codon 164	<i>Dra</i> I	245 bp + 171 bp + 107 bp	Isoleucin (WT)
		245 bp + 143 bp + 107 bp + 27 bp	Leucin

dhps Codon 581	<i>Bst</i> UI	105 bp + 56 bp	Alanin (WT)
		138 bp + 23 bp	Glycin
Codon 613	<i>Mwo</i> I	128 bp+ 33 bp	Alanin (WT)
	<i>Age</i> I	161 bp (ungeschnitten)	Serin, Threonin
		128 bp+ 33 bp	Threonin
		161 bp (ungeschnitten)	Alanin, Serin

WT - Wildtyp

2.2.5. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse des SSOP-ELISAs wurden zunächst in der zentralen Datenbank von TropNetEurop gesammelt. Nach Auszählung erfolgte die statistische Auswertung mit dem Programm EpiInfo Version 6. Für alle statistischen Auswertungen wurde ein 5 % α -Fehler toleriert.

Für die Auswertung dichotom kategorialer Daten wurde der two-tailed Fisher's exact Test verwendet. Hierbei ging es vor allem um die Ermittlung einer signifikanten Änderung der Mutationshäufigkeit im Zeitraum von 2002 bis 2004 im Vergleich zum Zeitraum von 1999 bis 2001. Zum anderen sollte überprüft werden, ob die Änderungen der Mutationshäufigkeiten einer linearen Abhängigkeit von der Zeit bzw. einem linearen Trend in den Jahren 1999 bis einschließlich 2004 unterlagen. Dies wurde mit dem χ^2 for slope (χ^2 für Steigung) getestet. Nullhypothese des Tests ist das Fehlen einer linearen Steigung, ein p-Wert von kleiner als 0,05 belegt also das Vorhandensein eines linearen Trends. Zuvor wurde mit einem vorgeschalteten Test (χ^2 -Test for linearity) auf Abweichung der Beziehung von der Linearität geprüft, da die Prüfung auf einen Trend nur bei gegebener Linearität einen Sinn ergibt. Nullhypothese des χ^2 -Tests auf Linearität ist das Vorhandensein eines linearen Zusammenhangs, so dass ein p-Wert von kleiner als 0,05 eine Linearität widerlegt. Von einem signifikanten Trend kann also nur gesprochen werden wenn $p(\text{linearity})$ größer als 0,05 ist und gleichzeitig $p(\text{slope})$ kleiner als 0,05.

Diese beiden Tests waren im Trendtest für quantitative Daten des EpiTable-Programms zusammengefasst.

2.2.6. Ermittlung der Haplotypen

Bei der Untersuchung des *pfcr*-Gens mittels SSOP-ELISA wurden mit einem SSOP ganze Haplotypen untersucht, also die Kombination verschiedener Polymorphismen in mehreren Codons.

Dies war nicht möglich für die *dhps*- und *dhfr*-Gene, da die hierfür verwendeten SSOPs in der Regel nur ein, maximal zwei Codons untersuchten. Die Ermittlung von Haplotypen war aber notwendig, um das Vorkommen von Wildtypsequenz und bestimmten Kombinationen von Mutationen in den untersuchten Genen zu quantifizieren. So wurden für alle Blutproben die ermittelten Polymorphismen der untersuchten Codons für *dhps* und *dhfr* zu Haplotypen zusammengefasst. Nur wenn Ergebnisse für jedes Codon des untersuchten Gens vorlagen, wurden Haplotypen bestimmt und weiter ausgewertet.

Lieferte der SSOP-ELISA in mindestens einem Codon mehr als ein Ergebnis, so musste von einer Infektion des Individuums mit mehr als einem Parasitenklon ausgegangen werden. Fanden sich beispielsweise für lediglich ein Codon eines Gens zwei verschiedene Ergebnisse, so ließen sich zwei Haplotypen bilden, die sich nur in diesem Codon unterschieden. Bei mehreren Ergebnissen in mehr als einem Codon eines Gens stieg jedoch die Anzahl der theoretisch möglichen Haplotypen drastisch an. Dies wurde dadurch begrenzt, dass nur die wahrscheinlichsten Haplotypen gewertet wurden. Lagen beispielsweise in zwei Codons eines Gens jeweils einmal die Wildtypsequenz und einmal die Mutation vor, so wurden zwei Haplotypen definiert, einer in dem in beiden Codons die Wildtypsequenz vorlag und einer, in dem beide Codons die Mutation trugen. Vergleichbare Vorgehensweisen werden bei der Genotypisierung der Merozoiten-Oberflächenproteine *m**sp*-1 und *m**sp*-2 beschrieben [37].

3. ERGEBNISSE

3.1. PATIENTENCHARAKTERISTIKA

Insgesamt 922 Proben aus den Jahren 1999 bis einschließlich 2004 wurden untersucht. Von diesen wurden 858 in die weitere Auswertung einbezogen.

Diejenigen Proben, deren Herkunftsregion oder Akquirierungsdatum unklar waren sowie die, welche für keines der Gene Ergebnisse im SSOP-ELISA brachten, wurden nicht weiter ausgewertet.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Studienpopulation

Alter	in Jahren	Median:	Verteilung:
		36	0-83
Geschlecht	männlich	487	56,8 %
	weiblich	235	27,4 %
	ohne Angabe	136	15,9 %
Patienten- klassifikation	ausländischer Einwanderer/Flüchtling	350	40,8 %
	ausländischer Besucher	38	4,4 %
	Einheimischer, lebt/arbeitet im Inland	269	31,4 %
	Einheimischer, lebt/arbeitet im Ausland:		
	in urbanem Gebiet	16	1,9 %
	in ländlichem Gebiet	25	2,9 %
	ohne Angabe	160	18,6 %
Reisegrund	Tourismus	163	19,0 %
	Besuch von Freunden/Verwandten	307	35,8 %
	Geschäftsreise	67	7,8 %
	Immigration/Flucht	53	6,2 %
	Wissenschaft/Ausbildung	24	2,8 %
	Missionar/humanitäre Hilfe	35	4,1 %
	sonstiges	12	1,4 %
	ohne Angabe	197	23,0 %
Reisedauer	in Tagen	Median:	Verteilung:
		30	2-5475
Prophylaxe	nein	512	59,7 %
	Chloroquin	34	4,0 %
	Proguanil	3	0,3 %
	Proguanil/Chloroquin	32	3,7 %
	Mefloquin	46	5,4 %
	Doxycyclin	3	0,3 %
	Proguanil/Atovaquon	2	0,2 %
	sonstige	14	1,6 %
	ohne Angabe	212	24,7 %

Versorgung	ambulant	103	12,0 %
	stationär	582	67,8 %
	ohne Angabe	173	20,2 %
Klinikdauer	in Tagen	Median: 4	Verteilung: 0-221
Vorstellungsland und Anzahl der Zentren	* Dänemark (ein Zentrum)	2	0,2 %
	* Deutschland (acht Zentren)	437	50,9 %
	‡ Italien (zwei Zentren)	123	14,3 %
	+ Österreich (zwei Zentren)	83	9,7 %
	# Portugal (ein Zentrum)	17	2,0 %
	§ Schweiz (ein Zentrum)	16	1,9 %
	† Spanien (zwei Zentren)	142	16,6 %
	§ Tschechische Republik (ein Zentrum)	20	2,3 %
	± Großbritannien (ein Zentrum)	18	2,1 %
Infektionsregion	Zentralafrika	158	18,4 %
	Ostafrika	90	10,5 %
	Nordafrika	2	0,2 %
	südliches Afrika	42	4,9 %
	Westafrika	514	59,9 %
	Zentralamerika	3	0,3 %
	Südamerika	5	0,6 %
	Karibik	2	0,2 %
	Europa	2	0,2 %
	Indischer Subkontinent	13	1,5 %
	Indonesien	18	2,1 %
	Madagaskar	6	0,7 %
	Südostasien	3	0,3 %

° Prophylaxe compliant durchgeführt

^ in einem Fall in Kombination mit Dapson

Zentren in den einzelnen Vorstellungsländern:

* Rigshospitalet Copenhagen, University of Copenhagen

* Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie, Charité/Campus Virchow-Klinikum, Berlin; Institut für Tropenmedizin, Berlin; Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg; Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Universität München; 2. Innere Klinik, Städtische Klinik „St. Georg“, Leipzig; Sektion Infektionskrankheiten, Universität Ulm; Missionsärztliche Klinik, Würzburg

‡ Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Brescia; Centro per le Malattie Tropicali, Ospedale S. Cuore, Negrar (Verona)

+ 4. Medizinische Abteilung mit Infektions- und Tropenmedizin, Kaiser Franz-Josef-Spital, Wien; Abteilung für spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin am Institut für Pathophysiologie, Universität Wien

Consulta de Medicina do Viajante, Departamento de Doenças Infecciosas, Hospital Universitario, Coimbra

§ Schweizerisches Tropeninstitut, Basel

† Sección de Medicina Tropical, Hospital Clinic, Barcelona; Hospital Principe de Asturias, Departamento de Microbiología y Parasitología, Madrid

§ University Hospital, Department of Infectious Diseases, Hradec Králové

‡ Department of Infection and Tropical Medicine, Bradford Royal Infirmary, Bradford

Der überwiegende Anteil der Patienten war männlichen Geschlechts, das mittlere Alter betrug 36 Jahre. Es stellten sich hauptsächlich Einheimische des Vorstellungslandes und aus dem Infektionsort stammende Immigranten und Flüchtlinge vor. Häufigster

Reisegrund war der Besuch von Verwandten oder Freunden, die mittlere Reisedauer betrug 30 Tage. Die meisten Patienten hatten keine suffiziente Medikamentenprophylaxe durchgeführt. Mehr als die Hälfte der Zentren, in denen die Patienten vorstellig wurden, lagen in Deutschland. Die Infektionen wurden überwiegend aus Afrika, insbesondere aus Westafrika, importiert.

3.2. EINTEILUNG IN REGIONEN

Da die Probenanzahl pro Jahr und Land in der Regel nicht ausreichte, um ein aussagekräftiges Resultat bezüglich der Entwicklung der Mutationshäufigkeit innerhalb eines definierten Zeitraums zu erzielen, wurden Länder in Regionen zusammengefasst:

Tabelle 17: Geographische Regionen, wie von der „United Nations Statistics Division“ definiert [118]

Regionsname	Regionscode	zugehörige Länder
Zentralafrika	AFC	Angola, Äquatorialguinea, Gabun, Kamerun, Republik Kongo Demokratische Republik Kongo (Zaire), S. Helena Sao Tome und Principe, Tschad, Zentralafrikanische Republik
Ostafrika	AFE	Äthiopien, Burundi, Dschibuti, Eritrea, Kenia, Ruanda Somalia, Sudan, Tansania, Uganda
Nordafrika*	AFN	Marokko
Südliches Afrika	AFS	Botswana, Bouvet Insel, Lesotho, Malawi, Mosambique, Namibia, Sambia, Südafrika, Swasiland, Zimbabwe
Westafrika	AFW	Benin, Burkina Faso, Elfenbeinküste, Gambia, Ghana, Guinea Guinea-Bissau, Kap Verde, Liberia, Mali, Mauretanien, Niger Nigeria, Senegal, Sierra Leone, Togo
Zentralamerika*	AMC	Guatemala, Honduras
Südamerika*	AMS	Brasilien, Ecuador
Karibik*	CAR	Dominikanische Republik
Europa*	EUR	Spanien, Türkei
Ind. Subkontinent*	IND	Indien, Pakistan, Sri Lanka
Indonesien*	INS	Indonesien
Madagaskar*	MAD	Madagaskar, Komoren
Südostasien*	SEA	Philippinen, Thailand

* Nennung ausschließlich der Länder, aus denen Blutproben untersucht wurden.

Die Proben aus Zentral-, Ost-, West- und südlichem Afrika machten 93,7 % (n=804) der Gesamtprobenanzahl aus. In der Ergebnisdarstellung werden sie unter „Afrika“ (3.4.1, 3.4.2, 3.5.1, 3.5.2, 3.6.1, 3.6.2, 3.7.1) ausgeführt. Diese vier Regionen werden sowohl einzeln als auch zusammengefasst unter "Gesamtafrika" betrachtet, die restlichen Proben (n=54) unter „Endemiegebiete außerhalb Afrikas“ (3.4.3, 3.5.3, 3.6.3, 3.7.2).

3.3. POLYKLONALITÄT

Innerhalb der 858 ausgewerteten Blutproben konnten 1411 verschiedene Parasitenklone nachgewiesen werden. In 51,05 % der Blutproben wurden mehr als ein Klon gefunden (n=438). Im Mittel enthielt jede Blutprobe zwei Parasitenklone.

3.4. POLYMORPHISMEN DER *DHFR*-SEQUENZ

3.4.1. Die *dhfr*-Sequenz in Afrika

3.4.1.1. Codon 51

Wie unter 2.2.3.2. beschrieben wurden Codon 50 und 51 des *dhfr*-Gens im SSOP-ELISA gemeinsam untersucht. Beide verwendeten SSOPs ergänzten an Codon 50 jeweils die Wildtypsequenz (50C) und unterschieden sich lediglich in den zu Codon 51 komplementären Anteilen. So wurde de facto nur die Sequenz dieses Codons bestimmt. 50/51CN entsprach hierbei dem Wildtypen, 50/51CI der Mutation.

Zwischen 1999-2001 und 2002-2004 zeigte sich in allen Regionen bis auf Ostafrika ein Prävalenzanstieg von 50/51CI. Bezogen auf Gesamtafrika war dieser Anstieg statistisch signifikant ($p=0,019192$), in Zentralafrika und im südlichen Afrika gerade nicht mehr. ($p=0,051274$ bzw. $p=0,097430$).

Tabelle 18: Prävalenz der Mutation *dhfr* 50/51CI zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	46	30	65,2	206	164	79,6
AFE	47	35	74,5	75	52	69,3
AFS	22	9	40,9	32	21	65,6
AFW	282	151	53,5	462	257	55,6
AG*	397	225	56,7	775	494	63,7

* signifikanter Anstieg der Mutationsprävalenz für Gesamtafrika, $p=0,019192$

Ebenso zeigte für Gesamtafrika der Anstieg der Mutationsprävalenz eine signifikante lineare Abhängigkeit von der Zeit mit einer Steigung von durchschnittlich 3 % jährlich. ($p(\text{linearity})=0,256168$, $p(\text{slope})=0,002941$) In Zentralafrika stieg die Anzahl der Mutationen an diesem Codon durchschnittlich um 4 % pro Jahr an. Dieser Trend war jedoch bei $p(\text{slope})=0,077857$ nicht signifikant.

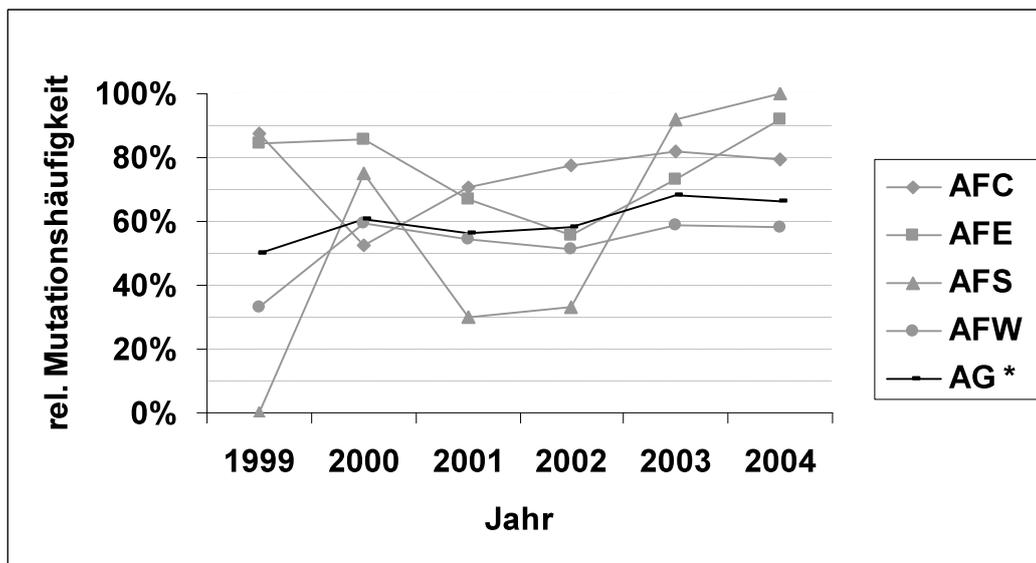


Abbildung 6: Die Prävalenz von *dhfr* 50/51CI in den Jahren 1999-2004
 *signifikant linearer Trend bezogen auf Gesamtafrika

3.4.1.2. Codon 59

Tabelle 19: Prävalenz der Mutation *dhfr* 59R zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	46	36	78,3	206	137	66,5
AFE	47	31	66,0	75	48	64,0
AFS	22	13	59,1	32	20	62,5
AFW	282	181	64,2	462	297	64,3
AG	397	261	65,7	775	502	64,8

Die Prävalenz der Mutation 59R war mit Werten von über 60 % sehr hoch und zeigte, ausgenommen in Zentralafrika, in keiner der Regionen wesentliche Änderungen. In Zentralafrika war eine Abnahme der Mutationsprävalenz zwischen 1999-2001 und 2002-2004 zu beobachten, welche jedoch statistisch nicht signifikant war.

3.4.1.3. Codon 108

Bei der Untersuchung dieses Codons wurden drei verschiedene SSOPs verwendet. Eines, das die Wildtypsequenz anzeigte (108S) und zwei für die untersuchten Mutationen, die einen Austausch von Serin durch Asparagin (108N) oder Threonin (108T) bewirken. 108T wurde in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen.

Außer im südlichen Afrika war die Prävalenz von 108N in allen Regionen zwischen 1999-2001 und 2002-2004 steigend. In Westafrika und für Gesamtafrika waren die Anstiege statistisch signifikant ($p=0,009531$ bzw. $0,000215$).

Tabelle 20: Prävalenz der Mutation *dhfr* 108N zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	46	29	63,0	219	160	73,1
AFE	48	32	66,7	77	59	76,6
AFS	23	15	65,2	32	21	65,6
AFW*	282	144	51,1	487	291	59,8
AG*	399	220	51,1	815	531	65,2

* signifikanter Anstieg der Mutationshäufigkeit in Westafrika und bezogen auf Gesamtafrika ($p=0,009531$ bzw. $0,000215$)

Für Gesamtafrika ließ sich für die mittlere jährliche Prävalenzzunahme von 3 % eine Linearität nachweisen ($p(\text{linearity})= 0,666935$, $p(\text{slope})= 0,011282$).

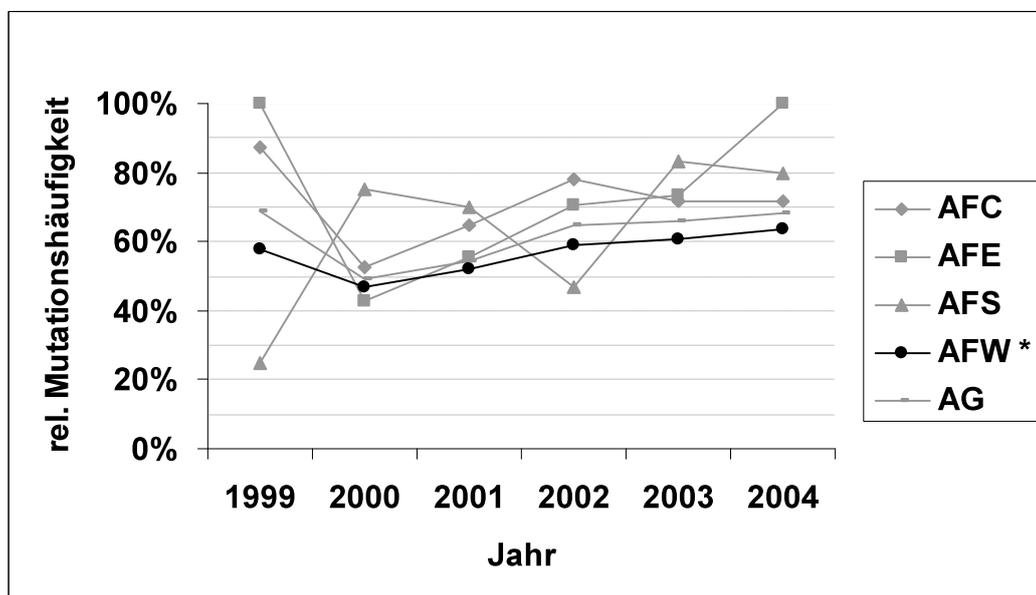


Abbildung 7: Die Prävalenz von *dhfr* 108N in den Jahren 1999-2004
*signifikant linearer Trend in Westafrika

3.4.1.4. Codon 164

Die Untersuchung aller aus Afrika importierten Blutproben ergab ausschließlich die Wildtypsequenz des Codons 164, welche Isoleucin codiert (164I). Die Leucin codierende Mutation (164L) wurde in keiner dieser Blutproben nachgewiesen.

3.4.2. Zeitlicher Verlauf der Prävalenz bedeutender *dhfr*-Haplotypen in Afrika

In den 804 afrikanischen Proben konnte für 1172 Parasitenklone die Sequenz aller untersuchter Codons des *dhfr*-Gens bestimmt werden. Im Folgenden sollen der Wildtyp, die Doppelmutation (wie unter 3.4.2.2 definiert) und die Tripelmutation näher dargestellt werden.

Tabelle 21: Anteil relevanter *dhfr*-Haplotypen an der Gesamtanzahl der Parasitenklone in den verschiedenen afrikanischen Regionen während des gesamten Untersuchungszeitraums

Region	Klone absolut	Wildtyp		Doppelmutation*		Tripelmutation		andere*	
		absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
AFC	252	25	9,9 %	51	20,2 %	124	49,2 %	52	20,6 %
AFE	122	15	12,3 %	33	27,0 %	53	43,4 %	21	17,2 %
AFS	54	13	24,1 %	11	20,4 %	24	44,4 %	6	11,1 %
AFW	744	194	26,1 %	101	13,6 %	290	39,0 %	159	21,4 %

* Doppelmutation wie unter 3.4.2.2 definiert

* andere: Einzelmutationen und Doppelmutationen, außer den unter 3.4.2.2 Definierten

Die Wildtypsequenz war in Westafrika signifikant häufiger als in Zentral- und Ostafrika ($p < 0,000001$ bzw. $0,000598$), die Doppelmutation signifikant seltener ($p = 0,014709$ bzw. $0,000370$). Die Prävalenz der Tripelmutation war in Westafrika signifikant niedriger als in Zentralafrika ($p = 0,004941$). Zentralafrika wiederum zeigte eine signifikant niedrigere Prävalenz des *dhfr*-Wildtyps als das südliche Afrika ($p = 0,010357$).

3.4.2.1. *dhfr*-Wildtyp

In allen Regionen Afrikas nahm die Prävalenz der *dhfr*-Wildtypsequenz zwischen den Zeiträumen 1999-2001 und 2002-2004 ab. Bezogen auf Gesamtafrika war diese Abnahme statistisch signifikant ($p = 0,010009$), in Zentralafrika gerade nicht mehr ($p = 0,095138$). In keiner Region Afrikas unterlag die Abnahme einer Linearität.

Tabelle 22: Prävalenz der *dhfr*-Wildtypsequenz zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	<i>dhfr</i> -WT (n)	<i>dhfr</i> -WT (%)	Klone (n)	<i>dhfr</i> -WT (n)	<i>dhfr</i> -WT (%)
AFC	46	8	17,4	206	17	8,3
AFE	47	6	12,8	75	9	12,0
AFS	22	6	27,3	32	7	21,9
AFW	282	81	28,7	462	113	24,5
AG*	397	101	25,4	775	146	18,8

dhfr-WT – *dhfr*-Wildtypsequenz

* signifikante Verminderung der *dhfr*-Wildtyphäufigkeit bezogen auf Gesamtafrika ($p = 0,010009$)

3.4.2.2. *dhfr*-Doppelmutation

Als *dhfr*-Doppelmutation wurden in dieser Arbeit diejenigen Haplotypen definiert, welche die Mutation 108N in Kombination mit 51I oder 59R trugen. Die Prävalenz der *dhfr*-Doppelmutation nahm im südlichen Afrika stark ab, in Zentral- und insbesondere in Westafrika zu ($p = 0,077439$). Keine dieser Entwicklungen zeigte jedoch statistische Signifikanz oder unterlag einer linearen zeitlichen Abhängigkeit.

Tabelle 23: Prävalenz der *dhfr*-Doppelmutation zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	<i>dhfr</i> -DM (n)	<i>dhfr</i> -DM (%)	Klone (n)	<i>dhfr</i> -DM (n)	<i>dhfr</i> -DM (%)
AFC	46	7	15,2	206	44	21,4
AFE	47	13	27,7	75	20	26,7
AFS	22	6	27,3	32	5	15,6
AFW	282	30	10,6	462	71	15,4
AG	397	56	14,1	775	140	18,1

dhfr-DM – *dhfr*-Doppelmutation

3.4.2.3. *dhfr*-Tripelmutation

Tabelle 24: Prävalenz der *dhfr*-Tripelmutation zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	<i>dhfr</i> -TM (n)	<i>dhfr</i> -TM (%)	Klone (n)	<i>dhfr</i> -TM (n)	<i>dhfr</i> -TM (%)
AFC	46	22	47,8	206	102	49,5
AFE	47	17	36,2	75	36	48,0
AFS	22	7	31,8	32	17	53,1
AFW	282	103	36,5	462	187	40,5
AG*	397	149	37,5	775	342	44,1

dhfr-TM – *dhfr*-Tripelmutation

* signifikanter Anstieg der *dhfr*-Tripelmutationshäufigkeit bezogen auf Gesamtafrika (p=0,033423)

Die Prävalenz der Parasitenklone mit Mutationen der Codons 108, 51 und 59 des *dhfr*-Gens war in allen Regionen von Beginn des Beobachtungszeitraums an hoch und weiterhin ansteigend. Statistische Signifikanz erreichte lediglich die auf Gesamtafrika bezogene Zunahme (p=0,033423).

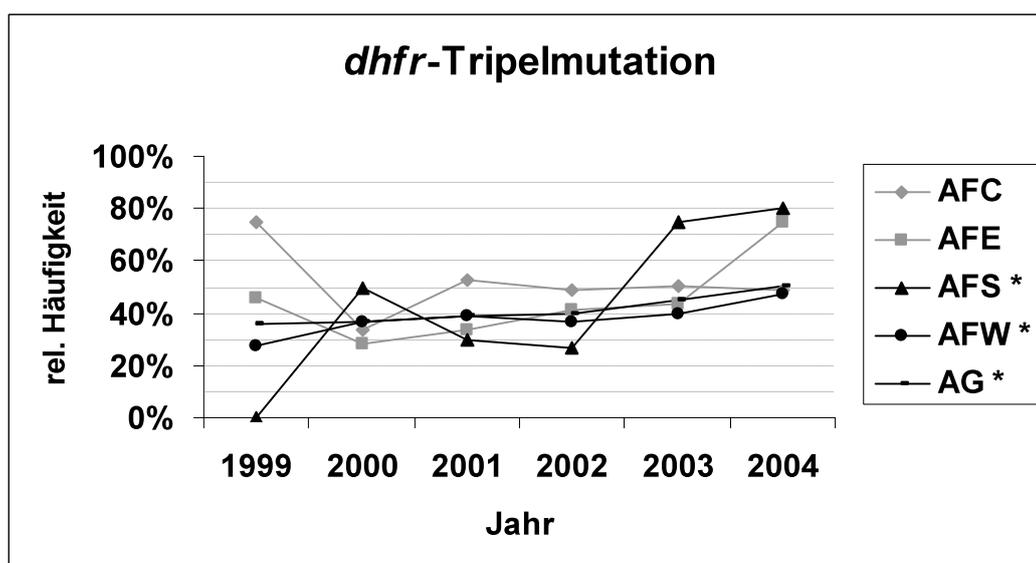


Abbildung 8: Die Prävalenz der *dhfr*-Tripelmutation in den Jahren 1999-2004

* signifikanter linearer Trend in Gesamt- und Westafrika sowie im südlichen Afrika

Einer Linearität unterlag die Prävalenzzunahme im südlichen Afrika, in Westafrika und in Gesamtafrika. Der Zuwachs betrug im südlichen Afrika durchschnittlich 12 % jährlich ($p(\text{slope})=0,010117$, $p(\text{linearity})= 0,161769$) und in Westafrika 3 % ($p(\text{slope})=0,041558$, $p(\text{linearity})= 0,761276$). Bezogen auf Gesamtafrika nahm die Tripelmutationsprävalenz bei $p(\text{slope})=0,003198$ und $p(\text{linearity})= 0,888718$ um durchschnittlich 3 % pro Jahr zu.

3.4.3. Die *dhfr*-Sequenz in Endemiegebieten außerhalb Afrikas

Innerhalb der Jahre 1999 bis 2004 wurden nur 54 Proben mit Parasiten akquiriert, die aus den neun nicht unter „Afrika“ zusammengefassten Regionen importierten wurden (entsprechend 6,3 %). Aus diesen wenigen vorhandenen Proben einen Trend bezüglich Änderungen der Mutationshäufigkeit zu ermitteln, war nicht möglich. Somit sind hier die Mutationsprävalenzen für den gesamten Beobachtungszeitraum angegeben.

Nordafrika. Bei beiden Parasitenklonen wurden die Mutationen 51I und 59R nachgewiesen. Einer trug zusätzlich 108N und somit die Tripelmutation.

Madagaskar und umliegende Inseln. Bei allen sechs erfolgreich analysierten Klonen lag die Wildtypsequenz der getesteten Codons des *dhfr*-Gens vor.

Zentralamerika. Bei keinem der drei Parasitenklone wurde 108N gefunden, einer trug sowohl 51I als auch 59R. Bei zwei Klonen lag der Wildtyp vor.

Südamerika. Für fünf Klone konnte der gesamte Haplotyp bestimmt werden. Nur ein Klon lag als Wildtyp im *dhfr*-Gen vor, vier trugen 108N, einer zusätzlich 51I und 164L.

Karibik. In beiden Klonen lag die Wildtypsequenz in den getesteten Codons vor.

Europa. Beide erfolgreich analysierten Klone trugen eine einzelne 59R-Mutation.

Indischer Subkontinent. Keiner der 13 Klone, für den der Haplotyp bestimmt werden konnte, lag als Wildtyp im *dhfr*-Gen vor. Neun Klone trugen eine Doppelmutation mit 108N und 59R, zwei weitere zusätzlich 51I und somit die Tripelmutation.

Indonesien. Für 26 Parasitenklone konnte der gesamte Haplotyp bestimmt werden. Neun davon lagen als Wildtypsequenz vor, einer als *dhfr*-Tripelmutation. Bei neun Klonen konnte die Doppelmutation aus 108N und 59R, bei einem die aus 51I und 108N nachgewiesen werden. Fünf Klone trugen nur 59R, ein weiterer lediglich 108N.

Südostasien. Beide vollständig analysierten Klone trugen die Tripelmutation des *dhfr*-Gens, einer zusätzlich 164L.

3.5. POLYMORPHISMEN DER *DHPS*-SEQUENZ

3.5.1. Die *dhps*-Sequenz in Afrika

3.5.1.1. Codon 436

Tabelle 25: Prävalenz der Mutationen *dhps* 436A und 436F zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	52	18	34,6	205	83	40,5
AFE	48	5	10,4	78	14	17,9
AFS	29	7	24,1	33	5	15,2
AFW*	289	104	36,0	475	218	45,9
AG*	418	134	32,1	791	320	40,5

* signifikanter Anstieg der Mutationshäufigkeit in Westafrika ($p=0,008160$) und bezogen auf Gesamtafrika ($p=0,004109$)

Die Wildtypsequenz des Codons 436 codiert Serin (436S), die Mutationen Alanin (436A) und Phenylalanin (436F). Beide Mutationen wurden zusammengefasst, vornehmlich wurde 436A nachgewiesen (420 von 454, 92,5 %). 26 der 34 Klone mit 436F stammten aus Westafrika (76,5 %), vier aus Zentral-, drei aus Ost- und einer aus dem südlichen Afrika. Außer im südlichen Afrika zeigte sich zwischen 1999-2001 und 2002-2004 in allen Regionen ein Anstieg der Prävalenz von 436A und 436F. Statistisch signifikant war die Zunahme in Westafrika und für Gesamtafrika ($p=0,008160$ bzw. $0,004109$). Für letzteres war der Anstieg von 4 % linear ($p(\text{slope})=0,000365$, $p(\text{linearity})=0,092275$).

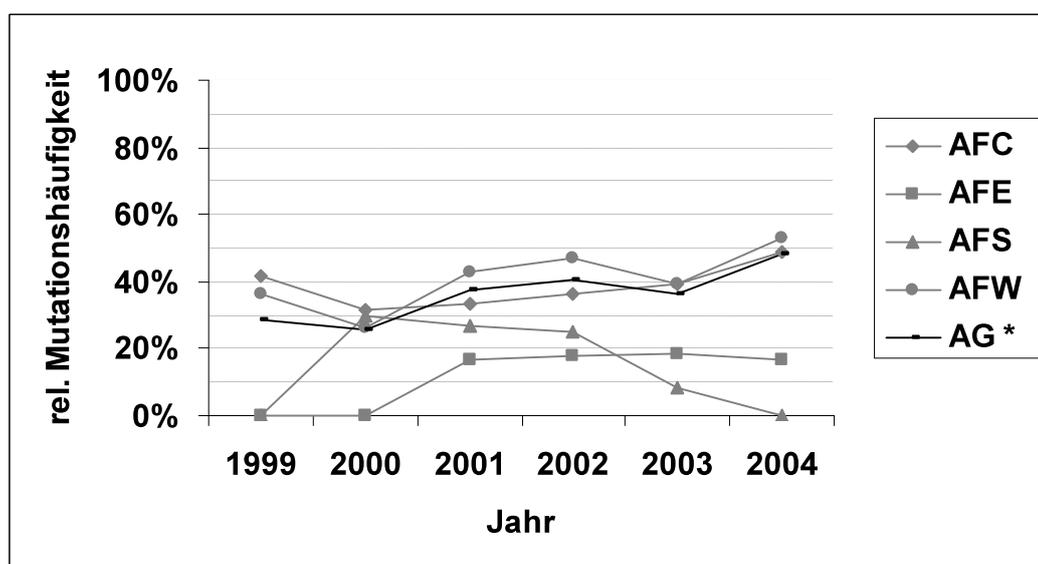


Abbildung 9: Die Prävalenz von *dhps* 436A und 436F in den Jahren 1999-2004
*signifikanter linearer Trend bezogen auf Gesamtafrika

3.5.1.2. Codon 437

Tabelle 26: Prävalenz der Mutation *dhps* 437G zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	52	36	69,2	205	149	72,7
AFE	48	25	52,1	78	54	69,2
AFS	29	9	31,0	33	18	54,5
AFW*	289	168	58,1	475	384	80,8
AG*	418	238	56,9	791	605	76,5

* signifikanter Anstieg der Mutationshäufigkeit in Westafrika und bezogen auf Gesamtafrika ($p < 0,000001$ in beiden Fällen)

Die Prävalenz der Mutation 437G stieg zwischen 1999-2001 und 2002-2004 in allen Regionen Afrikas an. Statistisch signifikant war dies in Westafrika und bezogen auf Gesamtafrika ($p < 0,000001$), nicht jedoch im südlichen Afrika und in Ostafrika ($p = 0,060261$ bzw. $0,076705$). Bezogen auf Gesamtafrika und in Ostafrika unterlag die Prävalenzzunahme von jährlich 5 % bzw. 8 % einer Linearität ($p(\text{linearity}) = 0,129809$, $p(\text{slope}) < 0,000001$ bzw. $p(\text{linearity}) = 0,263950$, $p(\text{slope}) = 0,009496$).

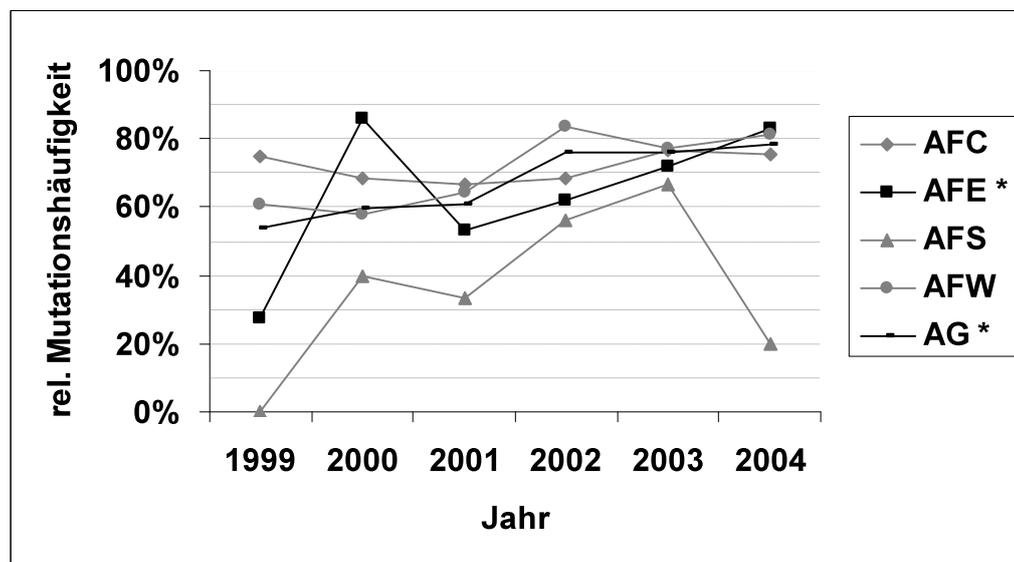


Abbildung 10: Die Prävalenz von 437G in den Jahren 1999-2004
* signifikanter linearer Trend in Ostafrika und bezogen auf Gesamtafrika

3.5.1.3. Codon 540

Die Prävalenz der Glutaminsäure codierenden 540E-Mutation war in Ostafrika und im südlichen Afrika hoch. In den anderen Regionen wurde fast ausschließlich die Lysin codierende Wildtypsequenz nachgewiesen. Bis auf Zentralafrika zeigten alle Regionen,

insbesondere das südliche Afrika und Ostafrika, einen nicht signifikanten Anstieg der Mutationshäufigkeit zwischen 1999-2001 und 2002-2004.

Tabelle 27: Prävalenz der Mutation *dhps* 540E zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	52	2	3,8	205	4	2,0
AFE	48	23	47,9	78	43	55,1
AFS	29	7	24,1	33	12	36,4
AFW	289	1	0,3	475	8	1,7
AG	418	33	7,9	791	67	8,5

3.5.1.4. Codon 581

In allen Regionen überwog die Wildtypsequenz 581A, während die Glycin codierende Mutation (581G) verhältnismäßig selten gefunden wurde.

Tabelle 28: Prävalenz der Mutation *dhps* 581G zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	52	2	3,8	205	26	12,7
AFE	48	3	6,3	78	8	10,3
AFS	29	3	10,3	33	2	6,1
AFW	289	16	5,5	475	42	8,8
AG*	418	24	5,7	791	78	9,9

* signifikanter Anstieg der Mutationshäufigkeit bezogen auf Gesamtafrika ($p=0,016308$)

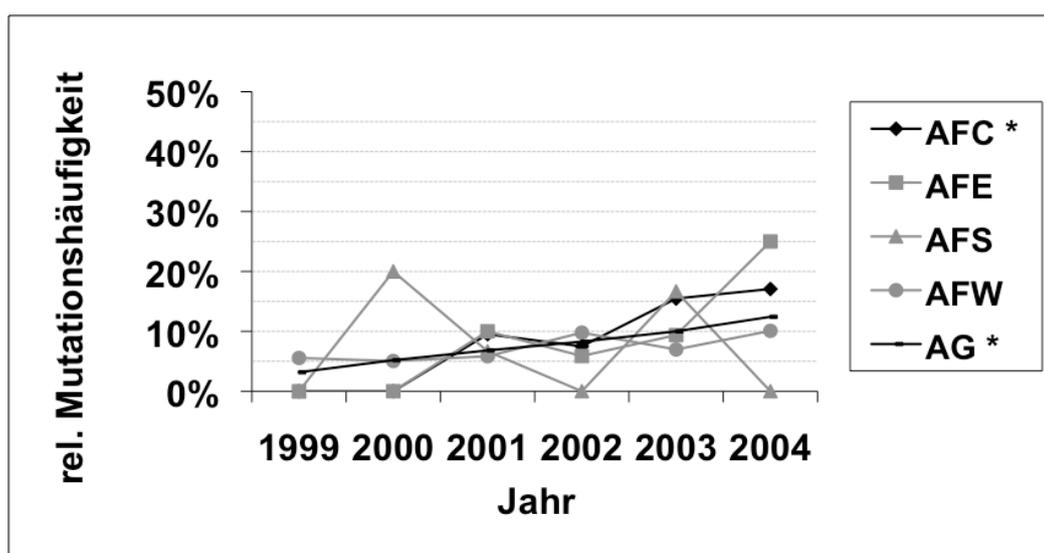


Abbildung 11: Die Prävalenz von 581G in den Jahren 1999-2004

* signifikanter linearer Trend in Zentralafrika und bezogen auf Gesamtafrika

Außer im südlichen Afrika zeigte die Prävalenz von 581G in allen Regionen zwischen den Zeiträumen 1999-2001 und 2002-2004 einen Anstieg. Statistische Signifikanz erreichte er nur bezogen auf Gesamtafrika ($p=0,016308$). Für Gesamtafrika und Zentralafrika, wo der Anstieg besonders deutlich war ($p=0,081365$), unterlag die Prävalenzzunahme von durchschnittlich 4 % bzw. 2 % / Jahr einer Linearität. ($p(\text{slope})=0,007775$, $p(\text{linearity})=0,890381$ bzw. $p(\text{slope})=0,002204$, $p(\text{linearity})=0,998965$)

3.5.1.5. Codon 613

Untersucht wurden die Alanin codierende Wildtypsequenz (613A) und zwei Mutationen, die eine Substitution durch Serin (613S) bzw. Threonin (613T) bewirken. 613T wurde in einem einzigen Klon aus dem südlichen Afrika gefunden, bei den anderen Mutationen handelte es sich um 613S. Die Mutationen werden daher zusammengefasst.

Tabelle 29: Prävalenz der Mutationen *dhps* 613S und 613T zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	52	2	3,8	205	9	4,4
AFE	48	0	0,0	78	1	1,3
AFS	29	0	0,0	33	1	3,0
AFW	289	13	4,5	475	37	7,8
AG	418	15	3,6	791	48	6,1

Die Prävalenz von 613S und 613 war zwischen den Zeiträumen 1999-2001 und 2002-2004 in allen Regionen Afrikas sehr niedrig und allenfalls gering ansteigend.

3.5.2. Zeitlicher Verlauf der Prävalenz bedeutender *dhps*-Haplotypen in Afrika

Für 1209 Parasitenklone konnte innerhalb der aus Afrika importierten Proben der gesamte Haplotyp des *dhps*-Gens bestimmt werden. Von diesen Haplotypen werden hier der Wildtyp und die Kombination der Mutationen 437G und 540E näher betrachtet.

Tabelle 30: Anteil relevanter *dhps*-Haplotypen an der Gesamtanzahl der Parasitenklone in den verschiedenen afrikanischen Regionen

Region	Klone absolut	Wildtyp		437G + 540E		andere*	
		absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
AFC	257	25	9,7 %	5	1,9 %	227	88,3 %
AFE	126	35	27,8 %	67	53,2 %	24	19,0 %
AFS	62	28	45,2 %	19	30,6 %	15	24,2 %
AFW	764	98	12,8 %	9	1,2 %	657	86,0 %

* andere: Einzelmutationen und Mutationskombinationen außer der in 3.5.2.2 Beschriebenen

Das südliche Afrika zeigte im gesamten Untersuchungszeitraum eine signifikant höhere Prävalenz des *dhps*-Wildtypen als jede andere afrikanische Region ($p=0,021611$ für Ostafrika, $<0,000001$ für Zentral- und Westafrika). Die Wildtypprävalenz in Ostafrika war signifikant höher als in Zentral- und Westafrika ($p=0,000011$ bzw. $0,000068$). Auch die Prävalenz der Mutationen 437G und 540E war in Ostafrika höher als in den anderen Regionen ($p=0,004888$ für das südliche, $p<0,000001$ für West- und Zentralafrika) und im südlichen Afrika signifikant höher als in Zentral- und Westafrika (beide $p<0,000001$).

3.5.2.1. *dhps*-Wildtyp

Tabelle 31: Prävalenz der *dhps*-Wildtypsequenz zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	<i>dhps</i> -WT (n)	<i>dhps</i> -WT (%)	Klone (n)	<i>dhps</i> -WT (n)	<i>dhps</i> -WT (%)
AFC*	52	11	21,2	205	14	6,8
AFE*	48	19	39,6	78	16	20,5
AFS	29	15	51,7	33	13	39,4
AFW*	289	60	20,8	475	38	8,0
AG*	418	105	25,1	791	81	10,2

dhps-WT – *dhps*-Wildtypsequenz

*signifikante Verminderung der *dhps*-Wildtyphäufigkeit in Zentral- ($p=0,006495$), Ost- ($p=0,025057$) und Westafrika ($p=0,000001$) sowie bezogen auf Gesamtafrika ($p<0,000001$)

In allen Regionen Afrikas war eine Abnahme der Häufigkeit von Parasitenklonen mit der *dhps*-Wildtypsequenz zwischen 1999-2001 und 2002-2004 zu beobachten. Diese erreichte statistische Signifikanz in Zentral- ($p=0,006495$), in Ost- ($p=0,025057$) und in Westafrika ($p=0,000001$) sowie bezogen auf Gesamtafrika ($p<0,000001$).

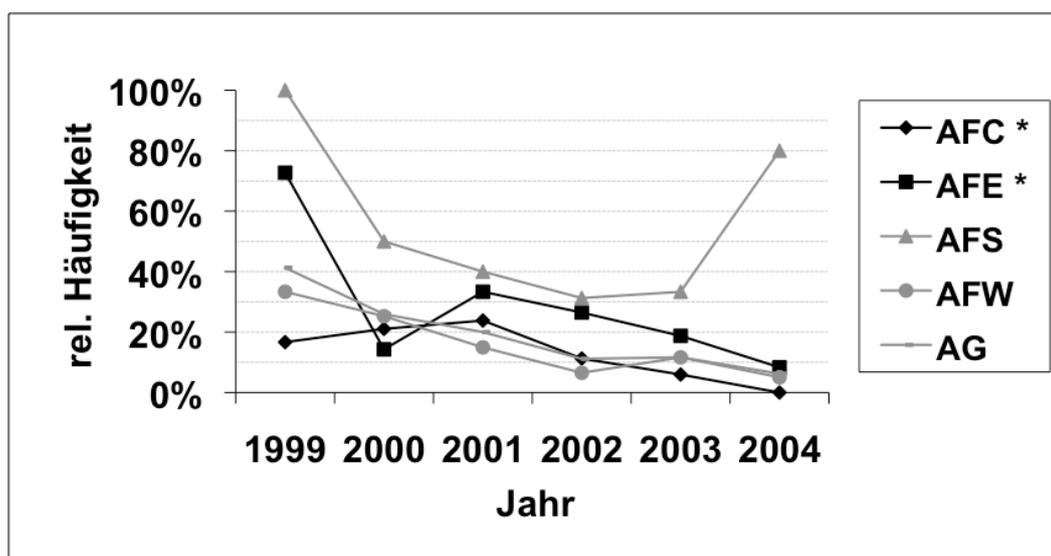


Abbildung 12: Die Prävalenz des *dhps*-Wildtyps in den Jahren 1999-2004 in Afrika

* signifikant linearer Trend in Zentralafrika und in Ostafrika

In Zentral- und Ostafrika unterlag die Abnahme der Wildtypprävalenz von im Mittel 5 % bzw. 9 % einem signifikant linearen Trend. ($p(\text{slope})=0,000702$, $p(\text{linearity})=0,612227$ bzw. $P(\text{slope})=0,001201$, $p(\text{linearity})=0,260109$)

3.5.2.2. Mutation an Codon 437 und an Codon 540 des *dhps*-Gens

Unter dieser Rubrik wurden alle Klone zusammengefasst, die sowohl die 437G- als auch die 540E-Mutation des *dhps*-Gens trugen. Mutationen dieser Codons scheinen elementar für die Entwicklung der Sulfadoxinresistenz bei *P. falciparum* zu sein [61, 84].

Tabelle 32: Prävalenz der Mutationen *dhps* 437G und 540E zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	437G/540E (n)	437G/540E (%)	Klone (n)	437G/540E (n)	437G/540E (%)
AFC	52	2	3,8	205	3	1,5
AFE	48	23	47,9	78	43	55,1
AFS	29	7	24,1	33	12	36,4
AFW	289	1	0,3	475	8	1,7
AG	418	33	7,9	791	67	8,5

Die Kombination der Mutationen 437G und 540E nahm zwischen 1999-2001 und 2002-2004 in Ostafrika und im südlichen Afrika deutlich, wenn auch nicht signifikant an Häufigkeit zu, während in den anderen Regionen die Prävalenz weitgehend konstant blieb. Eine Linearität der Prävalenzentwicklung ließ sich für keine der Regionen zeigen.

3.5.3. Die *dhps*-Sequenz in Endemiegebieten außerhalb Afrikas

Nordafrika. Jeder der drei nordafrikanischen Parasitenklone trug 437G im *dhps*-Gen, zwei davon zusätzlich die 436F-Mutation.

Madagaskar und umliegende Inseln. Es wurden neun Klone nachgewiesen, wovon sechs die *dhps*-Wildtypsequenz trugen, zwei Klone 436A und einer 437G.

Zentralamerika. In keinem der vier Klone fand sich eine Mutation des *dhps*-Gens.

Südamerika. Für vier Klone konnte der Haplotyp bestimmt werden. Zwei davon lagen als Wildtyp in allen untersuchten Codons vor. Ein Klon trug eine einzelne 437G-Mutation, einer zusätzlich dazu 540E und 581G.

Karibik. Beide Klone lagen als Wildtypen im *dhps*-Gen vor.

Europa. Keiner der vier Parasitenklone lag als *dhps*-Wildtyp vor. Zwei der Klone trugen 436A, einer zusätzlich 437G und zwei trugen 581G, einer davon dazu noch 437G.

Indischer Subkontinent. Bei zehn der 18 Klone lag im *dhps*-Gen die Wildtypsequenz vor. Zwei Klone trugen 436A, einer davon zusätzlich 437G. Fünf weitere Klone trugen 437G, einer davon zusätzlich 613S. Ein einziger Klon trug lediglich 581G.

Indonesien. Für 30 Parasitenklone konnte der vollständige Haplotyp bestimmt werden, in 13 davon lag die Wildtypsequenz vor. Zwölf Klone trugen 437G, vier davon isoliert, drei in Kombination mit 436A, zwei in Kombination mit 540E und drei in Kombination mit 581G. In vier Klonen wurde ausschließlich 436A, in einem nur 581G nachgewiesen.

Südostasien. Beide Klone trugen die 437G-Mutation, einer davon isoliert, der andere in Kombination mit 436A und 540E.

3.6. DIE *DHFR/DHPS*-QUADRUPELMUTATION UND –QUINTUPELMUTATION

Als *dhfr/dhps*-Quadrupelmutteration galten diejenigen Parasitenklone, die zusätzlich zu der *dhfr*-Tripelemutteration *dhps* 437G trugen. Klone, die in *dhps* dazu noch 540E aufwiesen, wurden als *dhfr-dhps*-Quintupelmutteration klassifiziert. Für 1070 Parasitenklone konnte der vollständige Haplotyp sowohl des *dhfr*- als auch des *dhps*-Gens bestimmt werden.

Tabelle 33: Anteil der *dhfr-dhps*-Quadrupel- und Quintupelmutteration an der Gesamtanzahl der Parasitenklone in den verschiedenen afrikanischen Regionen

Region	Klone	Quadrupelmutteration		Quintupelmutteration	
	absolut	absolut	relativ	absolut	relativ
AFC	230	92	40,0 %	2	0,9 %
AFE	115	4	3,5 %	34	29,6 %
AFS	52	2	3,8 %	9	17,3 %
AFW	673	197	29,3 %	4	0,6 %

Die Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutteration war in West- und Zentralafrika signifikant höher als in Ostafrika (beide $p < 0,000001$) und im südlichen Afrika ($p = 0,000014$ bzw. $p < 0,000001$). Auch war die Quadrupelmutteration in Zentralafrika signifikant häufiger als in Westafrika ($p = 0,003172$). Die Quintupelmutteration dagegen war in Ost- und Südafrika signifikant häufiger als in Zentral- und Westafrika ($p < 0,000001$).

3.6.1. Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutteration in Afrika

In allen Regionen außer Zentralafrika nahm die Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutteration zu. Dies war bezogen auf Gesamtafrika statistisch signifikant ($p = 0,007$), in Westafrika gerade nicht mehr ($p = 0,052395$).

Tabelle 34: Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quadrupelmultation zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Quadrupel (n)	Quadrupel (%)	Klone (n)	Quadrupel (n)	Quadrupel (%)
AFC	44	18	40,9	186	74	39,8
AFE	41	0	0,0	74	4	5,4
AFS	21	0	0,0	31	2	6,5
AFW	244	60	24,6	429	137	31,9
AG*	350	78	22,3	720	217	30,1

* signifikante Zunahme der Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quadrupelmultation bezogen auf Gesamtafrika (p=0,007)

Eine Linearität der Prävalenzzunahme der *dhfr/dhps*-Quadrupelmultation war allerdings nicht nur für Gesamtafrika (durchschnittlich 4 % jährlich, p(slope)=0,000293, p(linearity)=0,79581), sondern mit einem mittleren jährlichen Anstieg von 2 % bzw. 4 % auch für Ost- und Westafrika nachweisbar. (p(slope)=0,043608, p(linearity)=0,524585, bzw. p(slope)=0,002904, p(linearity)=0,829403)

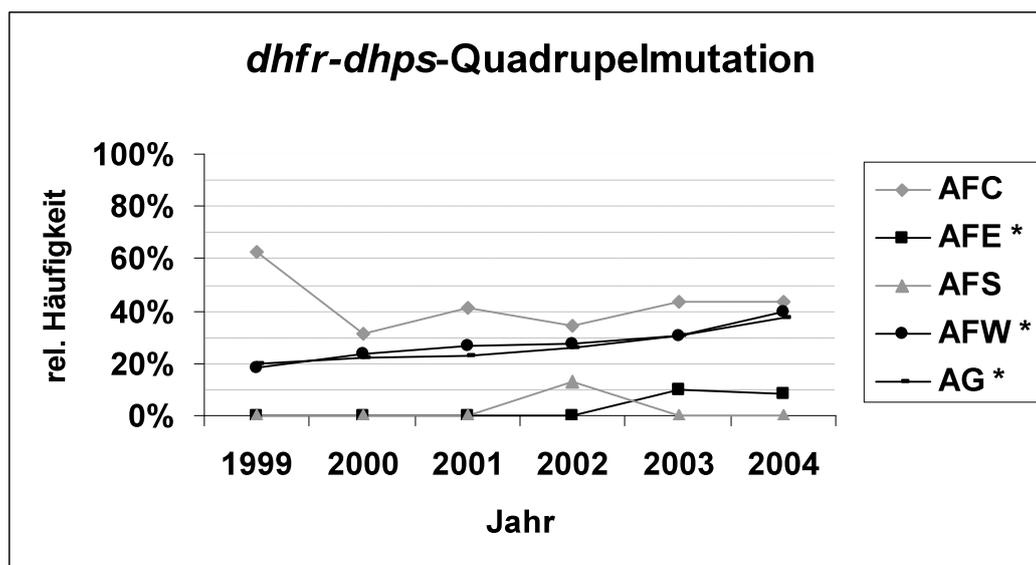


Abbildung 13: Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quadrupelmultation in den Jahren 1999-2004
* signifikanter linearer Trend in Ost- und Westafrika sowie bezogen auf Gesamtafrika

3.6.2. Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quintupelmultation in Afrika

Die Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quintupelmultation stieg zwischen 1999-2001 und 2002-2004 in Ostafrika und im südlichen Afrika deutlich, jedoch nicht signifikant an. Der Anstieg der Mutationsprävalenz in Ostafrika von durchschnittlich 5 % jährlich deutete bei p(linearity)= 0,633363 und p(slope)=0,093379 in Richtung eines linearen Trends.

Tabelle 35: Prävalenz der *dhfr/dhps*-Quintupelmutation zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Quintupel (n)	Quintupel (%)	Klone (n)	Quintupel (n)	Quintupel (%)
AFC	44	1	2,3	186	1	0,5
AFE	41	9	22,0	74	25	33,8
AFS	21	2	9,5	31	7	22,6
AFW	244	1	0,4	429	3	0,7
AG	350	13	3,7	720	36	5,0

3.6.3. Die *dhfr/dhps*-Quadrupelmutation und die *dhfr/dhps*-Quintupelmutation in den Endmiegebierten außerhalb Afrikas

Die Prävalenz der Quadrupel- und der Quintupelmutation war außerhalb Afrikas sehr gering. Drei Klone wurden im Jahr 2003 nach Europa importiert. Die Quintupelmutation fand sich in einem thailändischen Parasitenklon, der zusätzlich *dhfr* 164L und *dhps* 436A trug. Die einzige Quadrupelmutation fand sich in einem nordafrikanischen Klon, der zusätzlich *dhps* 436F trug. Außerdem wurde die Kombination von *dhfr* 51I, 108N und 164L mit *dhps* 437G, 540E und 581G in einem brasilianischen Klon entdeckt.

3.7. POLYMORPHISMEN DER *PFCRT*-SEQUENZ

3.7.1. Die *pfcr*t-Sequenz in Afrika

Innerhalb der 804 aus Afrika importierten Blutproben konnte die *pfcr*t-Sequenz von 1264 Parasitenklonen analysiert werden. Die drei verwendeten SSOPs deckten die Codons 72-76 ab. Eines war der Wildtypsequenz dieses Genabschnitts komplementär (CVMNK-Haplotyp) und jeweils ein SSOP dem CVIET- und dem SVMNT-Haplotyp. In der Auswertung wurden CVIET und SVMNT als „Mutation“ zusammengefasst. Bei 99,1 % der Klone mit einer Mutation ließ sich CVIET nachweisen, nur sieben Klone trugen den SVMNT-Haplotyp. Drei Klone wurden 2000 aus Westafrika importiert, zwei aus Zentralafrika (2002), einer aus dem südlichen Afrika (2003) und einer aus Ostafrika (2001). Im Untersuchungszeitraum war die Prävalenz des *pfcr*t-Wildtyps in Westafrika signifikant höher als in Zentral- und in Ostafrika ($p=0,005241$ bzw. $0,000046$).

Während die Mutationsprävalenz in Zentral- und in Ostafrika zwischen 1999-2001 und 2002-2004 rückläufig war, in Ostafrika sogar statistisch signifikant ($p=0,012326$), zeigte sich in Westafrika sehr deutlich ($p=0,050858$) und etwas geringer im südlichen Afrika eine Prävalenzzunahme. Keine der Entwicklungen unterlag einem linearen Trend.

Tabelle 36: Prävalenz von Mutationen der Codons 72-76 zwischen 1999-2001 und zwischen 2002-2004 in Afrika

Region	1999-2001			2002-2004		
	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)	Klone (n)	Mutation (n)	Mutation (%)
AFC	49	36	73,5	216	149	69,0
AFE*	54	44	81,5	77	46	59,7
AFS	30	20	66,7	29	23	79,3
AFW	323	167	51,7	486	286	58,8
AG	456	267	58,6	808	504	62,4

CVIET und SVMNT sind unter Mutation zusammengefasst

* signifikante Abnahme der Mutationsprävalenz in Ostafrika ($p=0,012326$)

3.7.2. Die *pfcr*t-Sequenz in den Endemiegebieten außerhalb Afrikas

Nordafrika. Der einzige erfolgreich analysierte Parasitenklon trug die CVIET-Mutation.

Madagaskar und umliegende Inseln. Alle sechs Klone trugen die Wildtypsequenz.

Zentralamerika. Auch in dieser Region lag bei allen Klonen die Wildtypsequenz vor.

Südamerika. Einer der zwei Klone trug die Wildtypsequenz, einer die SVMNT-Mutation.

Karibik. Keiner der beiden Klone trug eine Mutation im untersuchten Genabschnitt.

Europa. Der einzige Parasitenklon lag als Wildtyp im *pfcr*t-Gen vor.

Indischer Subkontinent. Zehn der elf Klone trugen Mutationen der Codons 72-76. Drei davon lagen als CVIET-, sieben als SVMNT-Haplotyp vor.

Indonesien. Keiner der 16 Klone lag als Wildtyp in den untersuchten Codons vor. Zwei davon trugen die CVIET-, 14 die SVMNT-Mutation.

Südostasien. Der einzige Parasitenklon lag als CVIET-Haplotyp vor.

3.8. EINFLUSS DER MEDIKAMENTÖSEN PROPHYLAXE AUF DIE PRÄVALENZ VON MUTATIONEN

Bisher wurde lediglich die Prävalenz von Wildtypsequenz und definierten Mutationen der Gene *dhfr*, *dhps* und *pfcr*t sowie deren zeitlicher Verlauf betrachtet. Darüber hinaus war jedoch auch von Interesse, ob diese Entwicklungen durch individuelle Faktoren, insbesondere durch die medikamentöse Prophylaxe, beeinflusst wurden.

Daten über die medikamentöse Prophylaxe ließen sich lediglich von 644 der 858 Patienten eruieren. Von 644 Patienten hatten 50 (7,7 %) eine regelrechte Prophylaxe durchgeführt. Der Anteil nicht suffizienter Medikamentenprophylaxen war unabhängig

von dem betrachteten Gen signifikant erhöht (stets $p < 0,000001$). Somit wird im Folgenden nur auf regelrecht durchgeführte Medikamentenprophylaxen eingegangen. Insgesamt war eine medikamentöse Prophylaxe mit Chloroquin ($p = 0,000150$), Chloroquin/Proguanil ($p < 0,000001$) oder Mefloquin ($p = 0,000114$) signifikant häufiger als mit Proguanil als Monotherapie, Doxycyclin, Pyrimethamin oder Pyrimethamin/Dapson.

3.8.1. Einfluss der medikamentösen Prophylaxe auf Mutationen der *dhfr*- und *dhps*-Gene

Personen, in denen Klone mit Wildtypsequenz der *dhfr*- und *dhps*-Gene nachgewiesen wurden, hatten öfter Mefloquin als ein anderes Medikament eingenommen. Eine Mefloquinprophylaxe war signifikant häufiger in den *dhfr*- und *dhps*-Wildtyp-Gruppen als in der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutations-Gruppe ($p = 0,001746$ bzw. $p = 0,002520$) und in der *dhfr*-Wildtyp-Gruppe als in der *dhfr*-Tripelmutations-Gruppe ($p = 0,000753$).

In den Gruppen der *dhfr*-Tripelmutation und der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutation wurde dagegen signifikant häufiger prophylaktisch Chloroquin/Proguanil eingenommen als Mefloquin ($p = 0,001349$ bzw. $p = 0,007320$), als Proguanil als Monotherapie ($p = 0,000257$ bzw. $p = 0,001033$), als Pyrimethamin/Dapson ($p = 0,000257$ bzw. $p = 0,001033$) oder als Doxycyclin ($p = 0,000019$ bzw. $p = 0,001932$). Auch Chloroquin als Prophylaxe war in beiden Gruppen signifikant häufiger als Doxycyclin ($p = 0,000026$ bzw. $p = 0,001033$). In der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutations-Gruppe wurde signifikant öfter eine medikamentöse Prophylaxe mit Chloroquin betrieben als mit Mefloquin oder Pyrimethamin/Dapson ($p = 0,040792$), Doxycyclin oder mit Proguanil als Monotherapie ($p = 0,007625$).

3.8.2. Einfluss der medikamentösen Prophylaxe auf Mutationen des *pfcr*t-Gens

Patienten der *pfcr*t-Wildtyp-Gruppe hatten signifikant häufiger Mefloquin eingenommen als Chloroquin/Proguanil ($p = 0,000019$), als Chloroquin ($p = 0,030536$) oder Proguanil ($p = 0,001062$), Pyrimethamin oder Doxycyclin ($p = 0,000196$). Dagegen hatten Patienten, in denen Parasiten mit der CVIET-Mutation des *pfcr*t-Gens nachgewiesen wurden, signifikant häufiger Chloroquin oder Chloroquin/Proguanil eingenommen als Mefloquin ($p = 0,000273$ bzw. $p = 0,000119$), Pyrimethamin/Dapson ($p = 0,000025$ bzw. $p = 0,000060$) und als Doxycyclin oder Proguanil als Monotherapie ($p < 0,000001$).

In der CVIET-Gruppe hatte ein signifikant höherer Anteil an Patienten prophylaktisch Chloroquin/Proguanil eingenommen als in der *pfcr*t-Wildtypgruppe ($p = 0,000085$), ein signifikant geringerer Anteil hatte eine Mefloquinprophylaxe betrieben ($p = 0,000012$).

4. DISKUSSION

Die Malaria tropica ist nach wie vor eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Ausgeprägte Resistenz des Erregers *Plasmodium falciparum* gegen zwei der in Endemiegebieten am häufigsten verwendeten Substanzen zur Behandlung der Malaria tropica, Chloroquin und das Kombinationspräparat Sulfadoxin/Pyrimethamin, stellt mangels allgemein verfügbarer Alternativen weiterhin eine enorme Schwierigkeit bei der Eindämmung dieser Erkrankung dar [131]. Eine Vielzahl von *in-vitro* und *in-vivo*-Studien zur Resistenzentwicklung in verschiedenen Endemiegebieten tragen dieser Problematik Rechnung. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Genen identifiziert, deren Mutationen an spezifischen Codons für verminderte Empfindlichkeit von *P. falciparum* gegen verbreitete Medikamente verantwortlich gemacht werden und die seither als molekulare Resistenzmarker für bestimmte Therapeutika genutzt werden. Dies sind insbesondere das *pfcr*-Gen im Falle von Chloroquin (CQ) [27, 41, 71, 104] und für Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P) die *dhps*- und *dhfr*-Gene [25, 61, 91, 121, 122].

Neben den Studien zur Verbreitung dieser Resistenzmarker in den Endemiegebieten selbst zeigten einige Studien, dass auch durch Reisende nach Europa und Nordamerika importierte Malariaerreger zur Überwachung dieser Marker genutzt werden können [13, 33, 45, 55, 64]. Sowohl die Studien in den Endemiegebieten als auch die Studien an importierten Malariafällen betrachten jedoch meist entweder eine geringe Probenanzahl oder Proben, die in kurzem Zeitraum akquiriert wurden.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der verhältnismäßig großen Anzahl von 922 nach Europa importierten Blutproben aus sechs Jahren die Prävalenz molekularer Marker für CQ- und S/P-Resistenz aufzuzeichnen, deren Entwicklung in verschiedenen Endemiegebieten und die Abhängigkeit der Prävalenz von individuellen Faktoren der Erkrankten zu ermitteln. Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Die Prävalenz der als S/P-sensitiv klassifizierten *dhfr*- und *dhps*-Wildtypen nahm in allen Regionen Afrikas ab, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Die Abnahme des *dhps*-Wildtyps war stets stärker ausgeprägt als die des *dhfr*-Wildtyps.
- Die Prävalenz der mutmaßlich pyrimethaminresistenten *dhfr*-Tripelmutation nahm in allen Regionen Afrikas zu. Ebenso waren die Prävalenzen der mit S/P-Resistenz assoziierten *dhfr*-/*dhps*-Quadrupel- bzw. -Quintupelmutation in allen Regionen Afrikas außer Zentralafrika ansteigend.

- Mutationen des *pfcr*-Gens wurden in afrikanischen Proben fast ausschließlich im Rahmen des CVIET-Haplotyps nachgewiesen, in Proben aus anderen Endemiegebieten fand sich auch häufig der SVMNT-Haplotyp.
- Während die Prävalenz von Mutationen des *pfcr*-Gens in Westafrika und im südlichen Afrika anstieg, nahm sie in Zentralafrika und insbesondere in Ostafrika ab.
- In mehr als der Hälfte der akquirierten Blutproben konnte mehr als ein *P. falciparum*-Genotyp nachgewiesen werden, so dass in diesen Fällen von einer polyklonalen Infektion ausgegangen werden musste.
- Der höchste Anteil aller Patienten hatte keine oder keine vollständige medikamentöse Malariaphylaxe durchgeführt ($p < 0,000001$). Unabhängig vom betrachteten Gen hatten Patienten, die durch Parasiten mit Wildtypsequenz des entsprechenden Gens infiziert waren, signifikant häufiger eine vollständige Prophylaxe mit Mefloquin durchgeführt als mit einem anderen Medikament. Dagegen waren Infektionen durch Parasiten mit der *dhfr*-Tripelmutation, der *dhfr/dhps*-Quadrupelmutation oder einer *pfcr*-Mutation signifikant mit einer Chloroquinprophylaxe, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Proguanil, assoziiert.

4.1. DISKUSSION DER METHODEN

4.1.1. Studienaufbau und Probengewinnung

Die Blutproben wurden von 1999 bis einschließlich 2004 im Rahmen des Überwachungsprogramms TropNetEurop's „Surveillance of Malaria Drug Resistance“ akquiriert.

Diese Art der Probenbeschaffung ermöglicht die Untersuchung einer insgesamt großen Anzahl von Blutproben aus der Mehrheit der Endemiegebiete weltweit mit einer Vielzahl unterschiedlicher Parasitenstämme, bei allerdings relativ geringer Probenanzahl bezogen auf die einzelnen Endemiegebiete [13, 33, 45, 55, 64]. Die Sammlung der Blutproben von Reisenden ist unkomplizierter und kostengünstiger als die Durchführung multipler Feldstudien in verschiedenen Endemiegebieten [55, 64].

Schließlich ist auch die Heterogenität des Patientenkollektivs von Vorteil. In dieser Arbeit umfasste es sowohl nach Europa reisende, jedoch in Endemiegebieten lebende, als auch dauerhaft in Europa lebende, in Endemiegebiete reisende Personen.

Der deutlich überwiegende Anteil dieser Population aus Reisenden und im Vorstellungsland ansässigen Immigranten verfügt über keine Semiimmunität gegen *Plasmodium falciparum*. Ein dadurch eventuell beeinflusstes Erregerspektrum im Sinne einer „Vorselektion“ der Parasiten durch den Wirtsorganismus kann so weitgehend ausgeschlossen werden [64].

4.1.1.1. Limitierungen des Studienaufbaus

Der Studienaufbau zielte darauf, Prävalenzen molekularer Marker für Medikamentenresistenz innerhalb durch Reisende und Immigranten importierter *P. falciparum*-Isolate zu ermitteln. Das Patientenkollektiv entsprach aber nur einem begrenzten Anteil aller Reisenden und Immigranten. Genaue Zahlen zu Reiseaktivität und Immigration in den jeweiligen endemischen Regionen fehlten. Eine Beurteilung des Risikos, eine Infektion durch *P. falciparum* zu erwerben, insbesondere auch hinsichtlich der zu erwartenden CQ- und S/P-Sensibilität, war nicht zu leisten.

4.1.2. Genotypisierung

Nested-PCR und SSOP-ELISA folgten bereits etablierten Protokollen. Zur Vervielfältigung der untersuchten *dhfr*- und *dhps*-Fragmente wurde eine nested-PCR verwendet, wie von Pearce *et al.* beschrieben [87], die Amplifikation des *pfcr*-Fragments erfolgte wie von Djimde *et al.* publiziert [27]. Anders als bei Pearce *et al.* und Djimde *et al.*, die für die Genotypisierung von *P. falciparum* einen SSOP-Fluoreszenz-Assay bzw. DNA-Sequenzierung verwendeten, wurde die Genotypisierung in dieser Arbeit mit dem von Alifrangis *et al.* beschriebenen SSOP-ELISA durchgeführt. Dies machte eine Biotinylierung des 5'-Endes jeweils eines Primers in den nested-II-PCRs als Modifikation notwendig [3].

Zur Genotypisierung von *P. falciparum* werden bislang überwiegend Enzymverdau-Assays verwendet, die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) untersuchen. Alifrangis *et al.* beschreiben eine über 90-prozentige Übereinstimmung des SSOP-ELISAs mit der Standardmethode [3]

Wie auch bei Alifrangis *et al.* zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit eine erhebliche Schwankungsbreite der optischen Dichtewerte (OD-Werte) der Negativkontrollen in den unterschiedlichen Experimenten. Damit variierte auch der jeweilige Hintergrund-OD-Wert beträchtlich. Dies stellte in der Regel kein Problem dar, lagen die OD-Werte der

positiven Proben meist deutlich über dem Hintergrund-OD-Wert. Allerdings zeigte sich, dass je länger die DNA-Extraktion der untersuchten Blutprobe zurück lag, der Hintergrundwert zunahm. Insbesondere bei der Untersuchung des Codons 164 des *dhfr*-Gens und des Codons 613 des *dhps*-Gens war dieser Zusammenhang deutlich zu beobachten. Grenzwertige Ergebnisse wurden zunächst durch Wiederholung des SSOP-ELISAs kontrolliert. Bei weiterhin unklarem Ergebnis (insgesamt 34 Fälle) wurde ein RFLP-Enzymverdau notwendig. Insgesamt lieferte der SSOP-ELISA jedoch bei leichter Anwendung in kurzer Zeit reproduzierbare Ergebnisse für eine hohe Anzahl von Proben und würde den Aufwand einer Vielzahl von Feldstudien maßgeblich verringern.

Bei einigen Proben musste aufgrund von mehr als einem positiven Ergebnis für ein Codon von einer multiplen Infektion ausgegangen werden. Alifrangis *et al.* unterschieden in ihrer Studie bei diesen Proben anhand des Verhältnisses der gemessenen OD-Werte zwischen „echten“ gemischten Infektionen („mixed infection“) und gemischten Infektionen mit einer Haupt- und einer Nebeninfektion („major“ und „minor infection“). Diese Unterscheidung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gemacht. Die Differenzierung einer Haupt- und einer Nebeninfektion ist sinnvoll zur Evaluation des Einflusses einzelner Polymorphismen auf die Medikamentenempfindlichkeit von Plasmodien und damit auf den potentiellen Therapieerfolg. In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch der Einfluss verschiedener Medikamente auf die Prävalenz bestimmter Polymorphismen untersucht werden. Somit war nur der qualitative, nicht der quantitative Nachweis der Polymorphismen in den untersuchten Blutproben von Interesse.

4.2. DHFR UND DHPS ALS MARKER FÜR ANTIFOLATRESISTENZ

Eine Vielzahl von Studien weist auf eine tragende Rolle von Mutationen bestimmter Codons des *dhfr*- und des *dhps*-Gens bei der Resistenzentwicklung von *P. falciparum* gegen Folsäureantagonisten hin. Die klinische Bedeutung liegt in der seit Mitte der 1990er Jahre aufgrund steigender Chloroquinresistenz zunehmenden Verbreitung der Kombination der Antifolate Sulfadoxin und Pyrimethamin. So wurde die *dhfr*-Triplemutation, also die Mutation der Codons 51, 59 und 108 des *dhfr*-Gens, vielfach mit verminderter Pyrimethaminwirksamkeit assoziiert [8, 61, 75, 77, 84]. Analog wurden die Mutationen der Codons 437 und 540 des *dhps*-Gens mit verminderter Wirksamkeit von Sulfadoxin in Verbindung gebracht [54, 91, 115], die Kombination der *dhfr*-Triplemutation mit der Mutation von Codon 437 des *dhps*-Gens (*dhfr*-/*dhps*-

Quadrupelmutation) bzw. mit Mutationen der Codons 437 und 540 (*dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation) mit verminderter Wirksamkeit von S/P [61, 77].

Aufgrund der besonderen Bedeutung von Mutationen beider Gene für die Resistenzentwicklung gegen Folsäureantagonisten sollen die Ergebnisse der Analyse des *dhfr*- und des *dhps*-Gens gemeinsam diskutiert werden. Es soll weniger auf die Mutationen im Einzelnen, sondern hauptsächlich auf die relevanten Mutationskombinationen sowie auf die als S/P-sensitiv klassifizierten Wildtypsequenzen eingegangen werden.

4.2.1. Die *dhfr*- und die *dhps*-Sequenz in Afrika

Über die mit verminderter Cycloguanilempfindlichkeit assoziierte 164L-Mutation des *dhfr*-Gens wurde bisher nur vereinzelt aus Afrika berichtet [5, 38]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie in keinem der aus Afrika importierten *P. falciparum*-Klone nachgewiesen und findet somit keine weitere Erwähnung.

Die Prävalenz der untersuchten Haplotypen der *dhfr*- und *dhps*-Gene unterschied sich in den Regionen Afrikas erheblich. So war in Zentral- und Ostafrika die Prävalenz des *dhfr*-Wildtyps signifikant niedriger als in West- und im südlichen Afrika, die Prävalenz der *dhfr*-Tripelmutation in Zentralafrika dagegen signifikant höher als in Westafrika. Die Prävalenz der *dhps*-Wildtypsequenz war in Zentral- und Westafrika signifikant niedriger als in Ostafrika und im südlichen Afrika. Die niedrige Prävalenz des *dhfr*-Wildtyps in Ostafrika ist am ehesten im Rahmen des dortigen beständigen Antifolatgebrauchs zu sehen. Hier wurde schon früh Chloroquin als Erstlinientherapie durch S/P ersetzt.

Die *dhfr*-/*dhps*-Quadrupelmutation war in Zentral- und in Westafrika signifikant häufiger als in Ost- und im südlichen Afrika, die *dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation dagegen signifikant seltener als in den anderen beiden Regionen. In einer Vielzahl von Studien wurde diese Verteilung der *dhfr*-/*dhps*-Quadrupel- und -Quintupelmutation innerhalb Afrikas beschrieben [29, 36, 61, 75, 83, 103]. Unter der Annahme, dass der Grad der Resistenz mit steigender Mutationsanzahl ebenfalls ansteigt, müsste man von einer geringeren S/P-Wirksamkeit in Ost- und im südlichen Afrika ausgehen. Tatsächlich wurde Antifolatresistenz zunächst im Osten Afrikas beschrieben, von wo aus sie sich über den Rest Afrikas ausweitete [18, 22, 134]. Allerdings wird auch aus Zentralafrika bei weiter Verbreitung der *dhfr*-/*dhps*-Quadrupelmutation trotz fehlenden Nachweises einer zusätzlichen 540E-Mutation ein hoher Grad an S/P-Therapieversagen *in-vivo* berichtet [81]. Es ist anzunehmen, dass die 540E-Mutation weniger bedeutend für die

S/P-Resistenz ist und dass sich die *dhfr*-/*dhps*-Quadrupel- und -Quintupelmutation in der S/P-Empfindlichkeit weniger unterscheiden als bisher angenommen.

4.2.1.1. Westafrika

In der Mehrheit der aus Westafrika importierten Parasiten ließen sich Mutationen des *dhfr*-Gens nachweisen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum lag die Prävalenz der 51I-Mutation bei über 50 %, die der 59R-Mutation bei über 60 %. Beide Prävalenzen blieben zwischen 1999 und 2004 ohne wesentliche Veränderung. Lediglich die 108N-Mutation zeigte einen signifikanten, linearen Anstieg von 51,1 auf 59,8 %. Der Anteil der Parasiten mit Wildtypsequenz des *dhfr*-Gens sank leicht von 28,7 auf 24,5 % aller westafrikanischen Klone. Die Prävalenz der *dhfr*-Tripelmutation zeigte einen dezenten, jedoch linearen Anstieg von 36,5 auf 40,5 %. Diese Beobachtungen lassen sich nur teilweise in der Literatur nachvollziehen, zumal aus verschiedenen Ländern sehr unterschiedliche Mutationsprävalenzen berichtet werden. So trugen 1998 in Mauretanien nur 12,6-18,6 % der untersuchten *P. falciparum*-Klone Mutationen des *dhfr*-Gens [34] und nur 20 % der 1999 in Mali analysierten Klone wiesen die *dhfr*-Tripelmutation auf [29], in Liberia waren es im Jahr 2000 schon 84 % aller Klone [21]. Allerdings lassen sich auch Parallelen zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und anderer Studien ermitteln. 2002 wurden in Ghana der *dhfr*-Wildtyp in 25,4 % und die *dhfr*-Tripelmutation in 47 % aller untersuchten Parasitenklone nachgewiesen [76]. In Senegal trugen im Rahmen einer im Jahr 2003 durchgeführte Studie 61 % aller Klone die *dhfr*-Tripelmutation [80], in Nigeria waren es 2003 und im Folgejahr 46 % [49].

Das *dhps*-Gen betrachtend werden aus den meisten Ländern Westafrikas hohe Prävalenzen der Mutationen 436A und 436F sowie 437G berichtet, nicht aber der Mutationen der Codons 540, 581 und 613 [21, 34, 80]. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit insofern als sich hier die Prävalenzen von Mutationen der Codons 540, 581 und 613 über den gesamten Beobachtungszeitraum unter 10 % befanden und allenfalls gering anstiegen. Sowohl die Mutationen des Codons 436 als auch des Codons 437 waren stark verbreitet und zeigten zwischen 1999 und 2004 eine signifikante Zunahme von 36,4 auf 40,4 % bzw. von 61,6 auf 80,8 %. Der Anteil von Klonen mit der *dhps*-Wildtypsequenz nahm dagegen signifikant von 20,8 % auf 8 % ab. Ebenfalls fiel unter den westafrikanischen Klonen bei dieser Arbeit eine hohe, linear ansteigende Prävalenz *dhfr*-/*dhps*-Quadrupelmutation auf von 24,6 % in den Jahren 1999 bis 2001 und 31,9 % in den Jahren 2002 bis 2004, jedoch eine sehr geringe,

stabile Prävalenz der *dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation von 0,4-0,7 %. Auch dies korreliert mit Daten der meisten in Westafrika durchgeführten Studien. Während sowohl 1999 in Mali als auch 2002 in Ghana in keinem bzw. in 0,8 % der analysierten Parasiten die Quintupelmutation gefunden wurde, konnte die Quadrupelmutation 1999 in 1,8 %, im Jahr 2002 dagegen in 44 % aller analysierten *P. falciparum*-Klone nachgewiesen werden [29, 76]. Lediglich aus einer Region Westnigerias wurde 2003 und 2004 eine hohe Prävalenz der *dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation von 29 % berichtet [49].

4.2.1.2. Südliches Afrika

Die aus dem südlichen Afrika importierten *P. falciparum*-Klone wiesen über den gesamten Beobachtungszeitraum hohe Prävalenzen für Mutationen des *dhfr*-Gens auf. Während die Prävalenz von 51I von 40,9 auf 65,5 % deutlich anstieg, blieb die Prävalenz der Mutationen 59R und 108N konstant bei über 60 %. Die Prävalenz des *dhfr*-Wildtyps sank im südlichen Afrika nur leicht von 27,3 auf 21,9 %.

Das *dhps*-Gen betrachtend fiel vor allem eine Zunahme der Mutationen 437G und 540E auf, von 31,0 auf 54,5 % bzw. von 23,3 auf 35,3 %. Der Anteil der Parasitenklone mit der *dhps*-Wildtypsequenz sank von 51,7 auf 39,4 %.

Aus vielen Ländern des südlichen Afrika liegen keine Studien vor, die zum Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit herangezogen werden könnten. Aus den vorhandenen Daten lassen sich dennoch einige Analogien erkennen: Die Prävalenz der *dhps*-Doppelmutation (437G/540E) stieg zwischen den Jahren 1999 bis 2001 und 2002 bis 2004 von 24,1 auf 36,4 % an. Dies korreliert mit einer in Südafrika durchgeführten Studie, in der sich zwischen 1996 und 1999 ein Anstieg der Prävalenz der Kombination von 437G und 540E von 0 auf 41 % zeigte, so wie auch ein Prävalenzanstieg der *dhfr*-Triplemutation von 42 auf 62 % [97]. In Mosambik wurde die *dhfr*-Triplemutation im Jahr 2000 bei 50,9 % aller untersuchten Parasitenklone nachgewiesen [2]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Zunahme der Prävalenz der *dhfr*-Triplemutation von 31,8 auf 53,1 % beobachtet werden.

Aus Mosambik wurde mit Einführung von S/P als Erstlinientherapie 2002 zwischen 2001 und 2003 ein Prävalenzanstieg der *dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation von 8 auf 26 % beschrieben [36]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in welcher die Prävalenz der Quintupelmutation von 9,5 % in den Jahren 1999 bis 2001 auf 22,6 % in den Jahren 2002 bis 2004 anstieg. Tatsächlich wurden auch 53 % der untersuchten Klone aus Mosambik importiert.

In anderen Ländern des südlichen Afrikas war die Prävalenz der Quintupelmutation noch weit höher. In Malawi beschrieben mehrere Studien einen Prävalenzanstieg der *dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation von 64-78 % in den Jahren 1999 bis 2000 [19, 61] bis auf 97 % in den Jahren 2001 bis 2003 [5].

4.2.1.3. Zentralafrika

Bei der Analyse der aus Zentralafrika importierten Parasiten fiel über den gesamten Beobachtungszeitraum ein sehr hoher Anteil an Klonen auf, die Mutationen des *dhfr*- und des *dhps*-Gens trugen. Die Mutationsprävalenz für die Codons 51, 59 und 108 des *dhfr*-Gens und für Codon 437 des *dhps*-Gens lag stets über 60 %. Zwischen den Jahren 1999 bis 2001 und 2002 bis 2004 konnte eine deutliche Verminderung von 17,4 auf 8,3 % bzw. von 21,2 auf 6,8 % des Anteils von Klonen beobachtet werden, welche die Wildtypsequenz des *dhfr*- bzw. des *dhps*-Gens trugen. Im Falle des *dhps*-Wildtyps war dieser Rückgang statistisch signifikant und zeigte eine lineare zeitliche Abhängigkeit. Im Gegensatz zur deutlichen Abnahme der Wildtypprävalenz war die Prävalenz der *dhfr*-Triplemutation und der *dhfr*-/*dhps*-Quadrupelmutation mit 47,8-49,5 % bzw. 40,9-39,8 % auf hohem Niveau konstant. Diese hohe Mutationsprävalenz wird von multiplen in Zentralafrika durchgeführten Studien berichtet. Im Jahr 2000 trugen in Gabun 71,8 % der Parasitenklone die *dhfr*-Triplemutation und 43,7 % die Quadrupelmutation [6]. In der Republik Kongo wurde zwischen 1999 und 2002 die *dhfr*-Triplemutation an 69,2 %, die Quadrupelmutation an bis zu 54,8 % aller Klone nachgewiesen [83], in der Zentralafrikanischen Republik wurde kürzlich die *dhfr*-Triplemutation an 50,3 % aller untersuchten Parasiten dokumentiert [72]. Auch die Abnahme des Anteils an Klonen, in welchen die Wildtypsequenz der untersuchten Gene vorliegt, lässt sich in der Literatur nachvollziehen: War 1998 in Kamerun der *dhfr*-Wildtyp noch in 41,3 % aller untersuchten Parasitenklone zu finden [8], fiel die Prävalenz auf 22,3 % im Jahr 1999 [11] und auf 7,2 % in den Jahren 2000 und 2001 [12]. Allerdings würde man aufgrund dieser Studien auch einen deutlichen Anstieg der Prävalenz der *dhfr*-Triplemutation erwarten, die in Kamerun 1998 in 52 %, 1999 in 58,3 % und 2000 bis 2001 in 74,1 % der Klone nachgewiesen wurde [8, 11, 12]. Dass dies in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden konnte, ist am ehesten durch die Tatsache zu erklären, dass sämtliche Studien von Basco *et al.* in urbanen Gebieten Kameruns durchgeführt wurden. Die Blutproben der vorliegenden Arbeit dagegen wurden aus diversen urbanen und ruralen Gebieten verschiedener zentralafrikanischer Länder importiert, in denen die

Prävalenz der *dhfr*-Triplemutation womöglich stabiler war. Aus Äquatorialguinea, aus dem der größte Anteil zentralafrikanischer Parasitenklone importiert wurde, konnten keine Daten zu den hier untersuchten Resistenzmarkern eruiert werden.

Die Quintupelmutation konnte in dieser Arbeit an zentralafrikanischen Klonen nur vereinzelt nachgewiesen werden, vornehmlich da die Prävalenz der 540E-Mutation sehr niedrig war. Dies wird von den meisten in Zentralafrika durchgeführten Studien bestätigt [6, 8, 72, 83]. Erst in den Jahren 2003 und 2004 konnte die Quintupelmutation in der Republik Kongo erstmals mit einer erwähnenswerten Prävalenz von bis zu 12,8 % dokumentiert werden [23]. Für die in dieser Arbeit ermittelte lineare Prävalenzzunahme von 581G von 3,8 % auf 12,3 % zwischen 1999 und 2004 lassen sich in der Literatur keine Analogien finden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass sich nur wenige der in Zentralafrika durchgeführten Studien mit diesem Codon beschäftigt haben [6].

4.2.1.4. Ostafrika

Die aus Ostafrika importierten *P. falciparum*-Klone zeigten, ähnlich den Klonen aus Zentralafrika, während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine hohe Prävalenz an Mutationen des *dhfr*- und, wenn auch etwas geringer ausgeprägt, des *dhps*-Gens. Während der Anteil der Parasiten mit Wildtypsequenz des *dhfr*-Gens von Beginn des Beobachtungszeitraumes an konstant niedrig bei etwa 12-13 % war, fiel die Prävalenz des *dhps*-Wildtyps zwischen 1999 und 2004 signifikant und linear von 39,6 auf 20,5 % ab. Analog stieg die Prävalenz der Mutationen 437G und 540E des *dhps*-Gens in Ostafrika linear an. Bedenkt man, dass in einem Großteil der ostafrikanischen Länder zu Beginn des Beobachtungszeitraumes S/P von der Zweit- zur Erstlinientherapie wurde [58, 102, 103], mag die konsekutive Verringerung erst des *dhfr*- und dann des *dhps*-Wildtyps für die These sprechen, dass *dhfr*-Mutationen zwingende Voraussetzung für eine S/P-Resistenz sind und erst in deren Gegenwart zusätzliche Mutationen des *dhps*-Gens eine weitere Stufe in der Entwicklung der S/P-Resistenz darstellen [61, 84]. Als Zeichen zunehmender S/P-Exposition der Parasiten in Ostafrika zeigt sich eine ansteigende Prävalenz der *dhfr*-Triplemutation von 36,2 auf 48 %, der Mutationen 437G und 540E des *dhps*-Gens von 47,9 auf 56,4 % und der *dhfr*-/*dhps*-Quintupelmutation von 22 auf 33,8 % zwischen 1999 bis 2001 und 2002 bis 2004. Dies lässt sich in der Literatur nachvollziehen. So fand eine Studie 1997 in Sudan in 79 % der untersuchten Parasiten eine Mutation der Codons 51 und 108 des *dhfr*-Gens, jedoch weder die *dhfr*-Triplemutation, noch die *dhfr*-/*dhps*-Quadrupel- oder Quintupelmutation [2, 58]. Aus

Kenia, wo S/P von 1998 bis 2004 als Erstlinientherapie der unkomplizierten Malaria tropica galt [138], wurde 1997 und 1998 in Ostkenia eine *dhfr*-Wildtypprävalenz von 19,6 % und eine *dhps*-Wildtypprävalenz von 82,4 % dokumentiert. In 31,4 % der Parasiten wurde schon die *dhfr*-Triplemutation gefunden, jedoch weder die *dhfr*/*dhps*-Quadrupel- noch die Quintupelmutation [84]. 2002 war in Ostkenia die *dhfr*-Triplemutation schon in über 70 % der Parasitenklone [20], 2005 die *dhfr*/*dhps*-Quintupelmutation in 80-87 % aller Klone aus Westkenia nachweisbar [138]. Zwischen 1997 und 1999 konnte in Tansania die *dhfr*-Wildtypsequenz abhängig vom Studienort noch in bis zu 67 % und die *dhps*-Wildtypsequenz in bis zu 94 % aller Parasitenklone nachgewiesen werden, in 20,6-60,5 % die *dhfr*-Triplemutation [2]. Nach Einführung von S/P als Erstlinientherapie im Jahr 2001 lag die Prävalenz des *dhfr*-Wildtyps nur noch maximal bei 8,3 % und des *dhps*-Wildtyps bei 28-53 %, die der *dhfr*-Triplemutation jedoch schon bei 60-84 % und der Quintupelmutation bei 22-63,5 % [87]. In den Jahren 2004 und 2005 schließlich lag die Prävalenz der *dhfr*-Triplemutation in Tansania bei 79,7-94 % bzw. der *dhfr*/*dhps*-Quintupelmutation bei 53-67,2 % [102], in Äthiopien bei 87 % bzw. bei 86 % [103]. In Uganda wurde die *dhfr*/*dhps*-Quintupelmutation zwischen 2002 und 2004 in 91 % aller Parasitenklone gefunden [44].

4.2.2. Die *dhfr*- und die *dhps*-Sequenz in Endemiegebieten außerhalb Afrikas

Die Blutproben, welche aus den nicht unter „Afrika“ zusammengefassten Regionen importiert wurden, machen nur 6,3 % der Gesamtprobenanzahl aus. Die Bewertung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Mutationsprävalenzen in diesen Regionen wird dadurch etwas erschwert. Einige Vergleiche zur Literatur lassen sich dennoch ziehen.

Der größte Anteil der aus Regionen außerhalb Afrikas importierten Blutproben stammte aus Indien und Indonesien.

Eine indische Studie identifizierte die *dhfr*-Wildtypsequenz in 10,5 % der *P. falciparum*-Klone und die *dhfr*-Triplemutation in 3,2 %. Zwei Drittel aller Klone trugen eine Kombination der Mutationen 59R und 108N des *dhfr*-Gens. Dies korreliert mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Prävalenz von 69,2 % der *dhfr*-Doppelmutation aus 59R und 108N. Allerdings war die *dhfr*-Triplemutation mit 15,4 % hier häufiger als in der Studie, der *dhfr*-Wildtyp wurde nicht nachgewiesen. Auch das *dhps*-Gen betrachtend korrelieren die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der Studie. So wurde die *dhps*-Wildtypsequenz in dieser Arbeit in 55,6 % aller Klone, bei der Studie in 52,6 %

nachgewiesen. Die Mutation 437G trugen 33,3 % der in der vorliegenden Arbeit und 21,1 % der in der Studie analysierten *P. falciparum*-Klone [1].

34,6 % der aus Indonesien importierten Parasitenklone trugen den *dhfr*-Wildtyp. Damit war dieser in der vorliegenden Arbeit deutlich häufiger als in einer indonesischen Studie aus dem Jahr 2000, in welcher der *dhfr*-Wildtyp nur bei 14,5 % aller untersuchten Parasiten nachgewiesen wurde. Auch wurde in der Studie die 108T-Mutation in 27,4 % aller Klone nachgewiesen, während sie in dieser Arbeit an keinem indonesischen Klon gefunden wurde. Die in dieser Arbeit ermittelte hohe Prävalenz der *dhfr*-Doppelmutation 59R/108N von 34,6 % und die geringe Prävalenz der *dhfr*-Tripelmutation von 3,8 % wiederum korrelieren mit den in der Studie bestimmten Prävalenzen von 30,2 % für die *dhfr*-Doppelmutation und 0 % für die *dhfr*-Tripelmutation. Auch der Anteil der Parasiten in der Studie mit der 437G-Mutation des *dhps*-Gens von 35,3 % liegt im Bereich der in dieser Arbeit ermittelten Prävalenz von 437G (40 %). Allerdings wurde die *dhps*-Doppelmutation aus 437G und 540E in der indonesischen Studie wesentlich häufiger nachgewiesen als in der vorliegenden Arbeit (26,5 % vs. 6,6 %) [110].

Aus den anderen Endemiegebieten wurden nur sehr wenige Parasitenklone importiert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Parasiten aus Gebieten geringer Endemizität wie Europa, Zentralamerika und der Karibik allenfalls wenige Mutationen der *dhfr*- und *dhps*-Gene trugen. Aus Gebieten mittlerer Endemizität wie dem tropischen Südamerika und Südostasien wurden dagegen Klone mit einer Vielzahl von Mutationen beider Gene importiert. Neben der *dhfr*-Tripelmutation wurde in diesen beiden Regionen auch die 164L-Mutation des *dhfr*-Gens und Mutationen der Codons 437, 540 und 581 des *dhps*-Gens nachgewiesen. Hochgradig mutierte Parasitenklone wurden auch in verschiedenen Studien in diesen beiden Regionen beschrieben [17, 24, 119]. Ein Vergleich der Prävalenzen scheint jedoch bei sehr geringer Probenanzahl nicht sinnvoll.

4.3. PFCRT ALS MARKER FÜR CHLOROQUINRESISTENZ

4.3.1. Die *pfcr*t-Sequenz in Afrika

Innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums lag die Prävalenz von Mutationen des *pfcr*t-Gens in allen Regionen Afrikas mit über 50 % stets auf hohem Niveau. Trotzdem befand sich in dieser Arbeit die Mutationsprävalenz oft erheblich unter den in der Literatur dokumentierten Werten. Als mögliche Erklärung hierfür soll nochmals betont werden, dass sich die Prävalenzen in dieser Arbeit aus dem Zusammenfassen von

Daten aus mehreren Jahren und aus mehreren Ländern mit unterschiedlicher Endemizität und Chloroquinverwendung ergeben. Die zum Vergleich herangezogenen Studien dagegen stammen meist aus hochendemischen Gebieten mit ausgeprägtem Chloroquinegebrauch, in denen eine hohe Mutationsprävalenz zu erwarten ist [14, 28, 29, 35, 101, 102, 111, 114, 138].

Der größte Anteil der in dieser Arbeit analysierten Parasitenklone mit *pfcr*t-Mutationen wies die CVIET-Sequenz der Codons 72 bis 76 auf. In der Literatur wurde bisher fast ausschließlich dieser Haplotyp beschrieben [9, 10, 72]. Der bisher einzige Nachweis der SVMNT-Sequenz in Afrika gelang im Jahr 2004 in Tansania [4]. Die sieben in dieser Arbeit gefundenen Klone mit dem SVMNT-Haplotyp stammen aus allen Regionen Afrikas und aus der Zeit vor Erstbeschreibung des SVMNT-Haplotyps im Rahmen einer Studie in Afrika (2000 bis 2003). Die Tatsache, dass die meisten Studien nur Codon 76 des *pfcr*t-Gens betrachten [14, 21, 29, 70, 74, 83, 101, 102, 103, 111, 114] und nur selten auch die Codons 72 bis 75 analysiert wurden [4, 9, 112], mag die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den publizierten Daten erklären.

4.3.1.1. Westafrika

In Westafrika stieg die Häufigkeit von *P. falciparum*-Klonen mit Mutationen der Codons 72-76 des *pfcr*t-Gens zwischen 1999 und 2004 von 51,7 % auf 58,8 %. Dies korreliert mit Daten, die in diversen Studien in mehreren westafrikanischen Ländern erhoben wurden. Aus Mali wurde über Mutationsprävalenzen des *pfcr*t-Gens zwischen 41 % im Jahr 1997 und 60-81 % in den Jahren 1998 und 1999 berichtet [27, 28, 29]. In Burkina Faso wurden in verschiedenen Studienorten Prävalenzen der K76T-Mutation beschrieben, die von 22-37 % im Jahr 1998 bis zu 33-65 % im Jahr 2001 reichten [114]. Im Jahr 2000 wurde in Senegal 76T in 79 % der Parasitenklone nachgewiesen [112], 2001 und 2002 in einer weiteren senegalesischen Studie bereits in 83-88 % der Parasiten [14]. Aus dem Jahr 2000 wurden aus Liberia Mutationsprävalenzen von 100 % [21], 2002 aus Ghana von 80 % berichtet [76].

4.3.1.2. Südliches Afrika

Auch im südlichen Afrika zeigte sich eine Prävalenzzunahme der K76T-Mutation des *pfcr*t-Gens von 66,7 % zwischen 1999 und 2001 auf 79,3 % zwischen 2002 bis 2004. Dies stellt eine deutliche Diskrepanz zur aktuellen Datenlage aus dem südlichen Afrika dar. Wurde in Malawi im Jahr 1992 die 76T-Mutation noch in 85 % der Parasitenklone

gefunden [62], so fiel die Mutationsprävalenz nach Umstellung der Erstlinientherapie von Chloroquin auf S/P im Jahr 1993 dramatisch ab. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen Prävalenzen der 76T-Mutation von 17 % im Jahr 1998, 2-13 % im Jahr 2000 und 0 % im Jahr 2004 nach [62, 74, 133]. Aktuell wird wieder eine gute Wirksamkeit von Chloroquin bei der Behandlung der Malaria tropica in Malawi berichtet [65].

Tatsächlich sind in der Literatur fast ausschließlich Daten über Malawi zu finden, aus dem jedoch nur ein sehr geringer Anteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Blutproben stammt. Mehr als die Hälfte aller Parasitenklone aus dem südlichen Afrika wurden aus Mosambik importiert, in welchem 1999 eine Prävalenz der Mutation 76T von 91,1 % dokumentiert wurde [70]. Auch in Zimbabwe wurde eine hohe Prävalenz von 76T von 50-70 % in den Jahren 1998 und 1999 ermittelt [73].

4.3.1.3. Zentralafrika

Anders als in den ersten beiden Regionen nahm der Anteil von Parasiten, welche *pfcr*t-76T trugen, in Zentralafrika von 73,5 % auf 69,0 % ab.

Hohe Mutationsprävalenzen des Codons 76 werden auch in mehreren Studien aus Zentralafrika beschrieben, jedoch in der Regel mit zunehmender Tendenz. In der Republik Kongo fand eine in den Jahren 1999 bis 2002 durchgeführte Studie in 97,1 % der analysierten Parasitenklone die Mutation des Codons 76 [83], zwei weitere Studien in den Jahren 2002 und 2003 in 93-98,5 % der Parasiten [68, 133]. Aus Gabun wird aus den Jahren 1996 und 2002 ausnahmslos über die 76T-Mutation berichtet [69]. In Kamerun trugen in den Jahren 2000 und 2001 90,1 % der untersuchten Parasiten 76T [11]. Auch im Bezug auf die Analyse der zentralafrikanischen Klone in dieser Arbeit muss betont werden, dass die Ergebnisse nur bedingt mit den Ergebnissen der publizierten Studien verglichen werden können. Die meisten Daten liegen für die Republik Kongo vor, aus der nur 2,8 % der in dieser Arbeit untersuchten Klone stammten. Der meisten hier untersuchten zentralafrikanischen Parasiten wurden aus Kamerun (41,6 %) und aus Äquatorialguinea (35,2 %) importiert. Doch liegen keine Daten zur Prävalenz der 76T-Mutation in Äquatorialguinea und keine neueren Daten aus Kamerun vor. Aus dem Jahr 2004 wird allerdings aus der Zentralafrikanischen Republik 76T von 61 % der Parasiten berichtet, was zumindest für Teile Zentralafrikas auf eine Verminderung der Mutationsprävalenz des *pfcr*t-Gens hinweist [72].

4.3.1.4. Ostafrika

Die einzige signifikante Entwicklung der Mutationsprävalenz von *pfcr*t 76T konnte in Ostafrika nachgewiesen werden. Der Anteil von Parasiten mit dieser Mutation sank von 81,5 % in den Jahren 1999 bis 2001 auf 59,7 % in den Jahren 2002 bis 2004 ($p=0,012$). Die Abnahme der Parasiten mit dieser Mutation lässt sich anhand einiger Studien nachvollziehen, die in Ländern durchgeführt wurden, welche im Beobachtungszeitraum die Therapieempfehlung von Chloroquin auf ein anderes Medikament umstellten. In Tansania, welches 2001 Chloroquin als Erstlinientherapie durch S/P ersetzte, wurde aus den Jahren 2002 und 2003 noch über eine Prävalenz von 76T um 92-95 % berichtet [4, 101], aus den Jahren 2004 und 2005 nur noch von 47,5-58,8 % [102]. In Uganda, wo Chloroquin noch bis 2004 als Erstlinientherapie der unkomplizierten Malaria tropica galt, trugen 100 % der untersuchten Parasiten in Jahren 1998 und 1999 [30, 63] die 76T-Mutation des *pfcr*t-Gens, 2006 waren es nur noch 61-91 % [44]. In Sudan und Äthiopien, in denen trotz abweichender Therapieempfehlung noch überwiegend Chloroquin und S/P verwendet wurde, wurde die Mutation 76T in den Jahren 2001 bzw. 2004 in allen untersuchten Klonen gefunden [103, 111]. Aus Kenia, aus dem der größte Teil der in dieser Arbeit analysierten ostafrikanischen Klone stammte, liegen nur wenig Daten über die Prävalenz von 76T vor. Obwohl jedoch in Kenia 1998 Chloroquin als Erstlinientherapie durch S/P ersetzt wurde [84], konnte 76T im Jahr 2005 in Westkenia in 80 % aller Parasitenklone nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür ist die fortbestehende Verwendung und Verbreitung von Chloroquin in Teilen Kenias [138].

4.3.2. Die *pfcr*t-Sequenz in Endemiegebieten außerhalb Afrikas

Wie auch bei der Diskussion der vorangegangenen Gene erschwert die geringe Probenanzahl aus den Regionen außerhalb Afrikas den Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für das *pfcr*t-Gen mit denen anderer Studien. Wiederum liegen aus dem indischen Subkontinent und aus Indonesien die meisten Daten vor.

Vom indischen Subkontinent wird eine hohe Prävalenz der 76T-Mutation des *pfcr*t-Gens berichtet. Zwischen 1996 und 2002 fand eine indische Studie diese Mutation an 95 % aller analysierten Klone, in 94 % davon im Rahmen des SVMNT-Haplotyps [120]. Auch in dieser Arbeit wurde 76T in 10 von 11 (91 %) aus Indien importierten Klonen gefunden, drei davon als Teil des CVIET-, sieben als Teil des SVMNT-Haplotyps.

Aus Indonesien wurden in dieser Arbeit ausschließlich Parasiten mit 76T importiert. 14 der 16 Klone (87,5 %) lagen als SVMNT-Haplotyp vor, 2 der 16 Klone (12,5 %) als CVIET-Haplotyp. Hohe Mutationsprävalenzen des *pfcr*-Gens wurden auch in der Literatur berichtet. In zwei indonesischen Studien lag die Prävalenz von 76T bei 91-99,1 %, in 87,5 % der Fälle als Teil des SVMNT-Haplotyps [52, 110].

Aus den restlichen Regionen lagen in dieser Arbeit kaum Parasiten vor, trotzdem lassen sich einige Aussagen treffen. So fand sich in allen Klonen, die aus Madagaskar importiert wurden, die Wildtypsequenz des *pfcr*-Gens. Dies ist insofern konkordant mit der aktuellen Datenlage, als die 76T-Mutation erstmalig im Jahr 2003 und seither nur sporadisch an *P. falciparum*-Klonen in Madagaskar nachgewiesen wurde [94].

Einer der beiden südamerikanischen Klone trug die 76T-Mutation als Teil des SVMNT-Haplotyps. Sowohl aus Brasilien als auch aus Surinam und Venezuela wird überwiegend der SVMNT-Haplotyp berichtet [24, 71, 88].

Der einzige südostasiatische Parasitenklon lag im *pfcr*-Gen als CVIET-Haplotyp vor, welcher dem überwiegend in Südostasien dokumentierten Haplotypen entspricht [26, 66].

4.4. POLYKLONALE INFEKTIONEN DURCH *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Polyklonale oder auch multiple Infektionen durch *P. falciparum* sind im Rahmen vieler Studien beschrieben worden. Insbesondere in holoendemischen Gebieten mit hoher Parasitentransmission sind regelmäßig mehrere Parasitenklone in infizierten Personen zu finden [37, 39, 53, 60]. Es wird davon ausgegangen, dass sich in diesen Gebieten durch die regelmäßige Aufnahme neuer Parasiten durch die Vektoren mehrere, genetisch unterschiedliche *P. falciparum*-Klone in einem Mosquito befinden und auf den Menschen übertragen werden [60]. Allerdings werden polyklonale *P. falciparum*-Infektionen ebenso aus Gebieten mit geringer Transmissionsintensität berichtet, wenn auch in diesen Gegenden die Anzahl der Klone geringer ist. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit wiederholter *P. falciparum*-Infektionen eines Individuums innerhalb kurzer Zeit wird auch hier die Infektionsmultiplizität eher durch Übertragung mehrerer Klone durch einen infektiösen Vektor als durch Superinfektion erklärt [47, 86].

Das Ausmaß der Multiplizität der *P. falciparum*-Infektion in holoendemischen Gebieten wurde häufig mit dem Alter assoziiert, bedingt durch Akkumulation verschiedener Parasitenklone aufgrund wiederholter infektiöser Stiche. So ist die Anzahl der

nachweisbaren Parasitenklone im Säuglingsalter noch gering [39] und steigt ab dem zweiten Lebensjahr kontinuierlich an, um zwischen dem dritten bis siebten Lebensjahr ihren Höhepunkt zu erreichen [106]. Während Infektionsmultiplizität bis zum zweiten Lebensjahr noch mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert ist [105], wird danach eine negative Korrelation zwischen der Anzahl nachweisbarer Klone und klinischer Manifestation der Malaria beobachtet [7, 37]. Eine Studie an asymptomatischen Kindern wies in einem Gebiet hoher Transmissionsintensität in Senegal in jedem der Kinder polyklonale Infektionen mit durchschnittlich je 6,8 *P. falciparum*-Klonen nach [53]. Die wechselnde Assoziation von Infektionsmultiplizität und Morbidität mit dem Alter wurde verschiedenen Entwicklungsstufen der Immunitätsentwicklung zugeschrieben [107].

Der Anteil polyklonaler Infektionen war unter der Studienpopulation dieser Arbeit hoch. In 51,05 % der untersuchten Blutproben konnte mehr als einen Parasitenklon nachgewiesen werden. Dies ist insofern bemerkenswert, als die Expositionsdauer des betrachteten Patientenkollektivs mit im Mittel 30 Tagen relativ gering war und nicht grundsätzlich von einer vielfach wiederholten Inokulation ausgegangen werden kann. Tatsächlich wies jedoch auch eine schwedische Arbeitsgruppe hochgradige Multiplizität der *P. falciparum*-Infektion unter Reiserückkehrern nach [38]. Diese war mit 64 % aller untersuchten Proben (68 von 107) noch ausgeprägter als in der vorliegenden Arbeit und wurde auch hier als Übertragung mehrerer, genetisch unterschiedlicher Parasitenklone durch einen infektiösen Moskito gedeutet. Zwischen den ermittelten Anteilen polyklonaler Infektionen beider Arbeiten besteht eine statistisch signifikante Diskrepanz ($p=0,019$), welche durch die Variabilität der betrachteten Gene erklärt werden könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Polyklonalität anhand Polymorphismen der vergleichsweise stabilen Gene *dhfr*, *dhps* und *pfcr1* definiert. Dagegen untersuchten Färnert *et al.* in ihrer Studie die hochpolymorphen antigencodierenden Genabschnitte *msh-1* und *-2* (Merozoiten-Oberflächenprotein) und *glurp* (glutamatreiches Protein). Insbesondere *msh-1* und *-2* werden regelmäßig betrachtet, ist die Multiplizität der *P. falciparum*-Infektion primärer Gegenstand einer Studie [39, 53, 60, 86].

4.5. DER EINFLUSS DER MEDIKAMENTÖSEN PROPHYLAXE AUF DIE MUTATIONSPRÄVALENZ

Der überwiegende Anteil der Patienten, für welche verlässliche Angaben über die Durchführung einer medikamentösen Prophylaxe vorlagen, hatte keine vollständige Malariaprophylaxe eingenommen. Lediglich bei 50 der 858 Patienten (5,8 %) ließ sich

eine suffizient durchgeführte medikamentöse Prophylaxe eruieren. Innerhalb dieser Patientengruppe entfielen 45 von 50 der Prophylaxen auf 3 der 6 erfassten Medikamentenregime, auf Chloroquin als Monotherapie (28 % aller Prophylaxen) und in Kombination mit Proguanil (36 %) sowie auf Mefloquin (26 %). Dementsprechend sind die Aussagen, die sich über den Einfluss der medikamentösen Malariaprophylaxe auf die Prävalenz verschiedener *P. falciparum*-Haplotypen treffen lassen beschränkt. Bei drei erfassten Prophylaxen mit Pyrimethamin und keiner einzigen mit Sulfadoxin kann hier insbesondere über den Einfluss dieser Medikamente auf die Mutationsprävalenz der *dhfr*- und *dhps*-Gene keine Aussage gemacht werden.

Allerdings lassen sich gewisse Tendenzen erkennen. So fällt auf, dass Patienten, die durch Parasiten mit der Wildtypsequenz jedweden betrachteten Gens infiziert waren, signifikant häufiger prophylaktisch Mefloquin eingenommen hatten als ein anderes Medikament. Ebenso waren Patienten, die Mefloquin eingenommen hatten signifikant häufiger durch Parasiten mit der Wildtypsequenz infiziert als durch Parasiten mit einer Mutation im gleichen Gen. Dagegen hatten Patienten, die durch Mutationen tragende Parasiten infiziert waren, unabhängig vom betrachteten Gen signifikant häufiger eine Prophylaxe mit Chloroquin als Monotherapie oder in Kombination mit Proguanil durchgeführt.

Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Erklärungen: Man kann darin die Bestätigung dafür sehen, dass durch die Einnahme von Chloroquin eine Selektion zugunsten von Mutationen des *pfcr*-Gens bzw. durch Verwendung des Folsäureantagonisten Proguanil zugunsten von Mutationen der *dhfr*- und *dhps*-Gene stattfindet [38]. Die Tatsache, dass nach Mefloquinprophylaxe überwiegend Infektionen durch Parasiten mit Wildtypsequenz auftreten, zeigt darüber hinaus die fehlende Assoziation von Mutationen der betrachteten Gene und Mefloquinresistenz. Auch könnte sich hierbei um einen Ausdruck der von einigen Autoren beschriebenen „Fitnessminderung“ des Erregers durch Mutationen handeln. Demnach bergen die jeweiligen Mutationen für die Parasiten in Anwesenheit des adäquaten Medikamentendruckes einen Überlebensvorteil. Der durch Mutation veränderte Metabolismus betroffener Plasmodien kann sich jedoch bei Änderung des Medikamentendruckes als Nachteil auswirken und sich in einer raschen Populationsverkleinerung äußern [51, 62, 65, 73].

4.6. SCHLUSSBETRACHTUNG

Mittlerweile wurde die offizielle Therapieempfehlung in fast allen endemischen Malariagebieten zugunsten der Artemisininbasierten Kombinationstherapien (ACT) geändert [131]. Bis zu deren endgültigen Etablierung wird jedoch noch einige Zeit vergehen und noch immer sind Chloroquin und S/P weit verbreitet [76, 102, 138]. Somit ist auch die weitere Überwachung der mit CQ- und S/P-Resistenz assoziierten molekularen Marker weiterhin wichtig. Dies gilt besonders, da bei deutlich höheren Therapiekosten durch ACTs zu erwarten ist, dass beide Medikamente weiter verwendet werden [126].

Nach wie vor werden die meisten Daten zur Verbreitung von mit Chloroquin- und Antifolatresistenz assoziierten molekularen Markern im Rahmen von *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien in endemischen Malariagebieten gewonnen. Diese geben ein recht genaues Bild von der Resistenzlage in eng begrenzten Gebieten und werden insbesondere zur Evaluation der empfehlenswertesten Medikamentenregime in diesen Regionen nicht zu ersetzen sein.

Die Sammlung und Untersuchung von durch Reisende und Migranten importierten Blutproben in Regionen außerhalb der Endemiegebiete kann jedoch wertvolle Zusatzinformationen zu diesen Feldstudien bieten [55, 64].

Diese Arbeit konnte an einer großen Anzahl importierter *P. falciparum*-Klone zeigen, dass Häufigkeit und Verbreitung molekularer Resistenzmarker in den meisten Endemiegebieten nachvollzogen werden können. Auch die Auswirkungen von Änderungen der Medikamentenregime können zeitnah registriert werden. Dies zeigte die Abnahme der Prävalenz von Mutationen des *pfcr*-Gens in Ostafrika, nachdem dort Chloroquin nicht mehr als Therapie der Malaria empfohlen wurde.

Eine derartige Überwachung könnte dazu dienen, neu entstehende Resistenz zu entdecken und die Durchführung von weiteren Studien in den jeweiligen Endemiegebieten zu veranlassen.

Zu empfehlen wäre in nachfolgenden Untersuchungen eine Ausweitung der Überwachung auf zusätzliche molekulare Marker, die mit Resistenz gegen weitere verbreitete Malariamedikamente assoziiert sind.

Die Sammlung weiterer Patientendaten zur Charakterisierung kann Aufschluss über die Auswirkung individueller Faktoren auf die Verbreitung molekularer Resistenzmarker

geben. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Medikamentenprophylaxe einen Einfluss auf den Mutationsstatus der Parasitenklone hat. Bei unvollständiger Erhebung weiterer Patientendaten wurde in der vorliegenden Arbeit von der Auswertung anderer individueller Faktoren abgesehen. Jedoch sollte in zukünftigen Studien auch eine Datenauswertung hinsichtlich der Assoziation beispielsweise von Patientenklassifikation, Reisegrund oder Reisedauer mit molekularen Resistenzmarkern erwogen werden. Ziel könnte eine individualisierte Risikostratifizierung und Therapieempfehlung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Malaria tropica, verursacht durch *Plasmodium falciparum*, ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit und hat in den Tropen und Subtropen einen wesentlichen Anteil an der Morbidität und Mortalität.

Zur Therapie dieser Erkrankung werden ständig neue Substanzen entwickelt. Deren Effektivität wird jedoch durch entstehende Resistenzen eingeschränkt. Ein Mechanismus der Resistenzentwicklung sind Punktmutationen im Genom des Erregers. Bezüglich zwei der gebräuchlichsten Malariamedikamente, Chloroquin (CQ) und Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P), wurden verschiedene Mutationen der Gene *pfcr*, bzw. *dhps* und *dhfr* mit Resistenz assoziiert.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Prävalenz dieser Punktmutationen, deren Verlauf im Untersuchungszeitraum sowie den Einfluss der medikamentösen Malariaphylaxe an 858 Blutproben mit Nachweis von *P. falciparum*. Die Erreger wurden zwischen 1999 und 2004 von Reisenden und Migranten aus Endemiegebieten nach Europa importiert und in Zentren des European Network on Imported Infectious Disease Surveillance (TropNetEurop) gesammelt. Mit nested-PCR und SSOP-ELISA werden zuverlässige, zeitsparende Untersuchungsmethoden zu analysierender Genabschnitte beschrieben.

Über 90 % der Erreger wurden aus Subsahara-Afrika importiert. Bei weiter Verbreitung von S/P im Untersuchungszeitraum zeigte sich hier in allen Regionen eine Prävalenzabnahme der S/P-sensiblen *dhfr*- und *dhps*-Wildtypsequenzen und eine Zunahme der als pyrimethaminresistent klassifizierten *dhfr*-Tripelmutation sowie ein Anstieg der Prävalenzen der mit S/P-Resistenz assoziierten *dhfr*-/*dhps*-Quadrupel- und -Quintupelmutation in allen Regionen außer Zentralafrika.

Mutationen der Codons 72 bis 76 des *pfcr*-Gens wurden in afrikanischen Proben fast ausschließlich als Teil des CVIET-Haplotyps nachgewiesen. In Westafrika und dem südlichen Afrika mit häufigem Gebrauch von CQ nahm die Prävalenz von *pfcr*-Mutationen im Untersuchungszeitraum zu. In Ostafrika, wo kaum noch CQ verwendet wird, zeigte sich eine signifikante Prävalenzabnahme von Mutationen des *pfcr*-Gens.

Polyklonale Infektionen mit mehr als einem *P. falciparum*-Genotyp konnten in über der Hälfte der Blutproben nachgewiesen werden.

Unter dem geringen Anteil der Patienten, die eine suffiziente Malariaprophylaxe durchgeführt hatten waren Infektionen durch Parasiten mit einer Wildtypsequenz jedweden Gens signifikant häufiger mit einer Mefloquineinnahme, Mutationen dagegen mit einer CQ-Prophylaxe als Monotherapie oder in Kombination mit Proguanil assoziiert. Bei anhaltend weiter Verbreitung von CQ und S/P und verzögerter Etablierung alternativer Therapien erscheint die kontinuierliche Überwachung der mit CQ- und S/P-Resistenz assoziierten molekularen Marker weiterhin wichtig. Die Probenakquirierung von Reisenden und Migranten bietet das Potential, unkompliziert die Prävalenz molekularer Resistenzmarker in Endemiegebieten nachzuvollziehen und neu entstehende Resistenz zu entdecken.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahmed A, Bararia D, Vinayak S, *et al.* *Plasmodium falciparum* isolates in India exhibit a progressive increase in mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3):879-89
2. Alifrangis M, Enosse S, Khalil IF, *et al.* Prediction of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine/pyrimethamine *in vivo* by mutations in the *dihydrofolate reductase* and *dihydropteroate synthetase* genes: a comparative study between sites of differing endemicity. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(6):601-6
3. Alifrangis M, Enosse S, Pearce R, *et al.* A simple, high-throughput method to detect *Plasmodium falciparum* single nucleotide polymorphisms in the *dihydrofolate reductase*, *dihydropteroate synthase* and *P.falciparum chloroquine resistance transporter* genes using polymerase chain reaction- and enzyme-linked immunosorbent assay-based technology. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72(2):155-62
4. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, *et al.* Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the *chloroquine-resistance transporter* gene in *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *J Infect Dis.* 2006; 193(12):1738-41
5. Alker AP, Mwapasa V, Purfield A, *et al.* Mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Blantyre, Malawi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(9):3919-21
6. Aubouy A, Jafari S, Huart V, *et al.* *Dhfr* and *dhps* genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with *in vitro* activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(1):43-9
7. Al-Yaman F, Genton B, Reeder JC, Anders RF, Smith T, Alpers MP. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc trop Med Hyg.* 1997; 91(5): 602-05
8. Basco LK, Tahar R, Keundjian A, Ringwald P. Sequence variations in the genes encoding dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase and clinical response to sulfadoxine-pyrimethamine in patients with acute uncomplicated malaria. *J Infect Dis.* 2000; 18(2):624-8

9. Basco LK. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIII. Analysis of *pfcr* mutations and *in vitro* chloroquine resistance. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(4):388-91
10. Basco LK, Ndounga M, Ngane VF, Soula G. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIV. *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*) gene sequences of isolates before and after chloroquine treatment. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(4):392-5
11. Basco LK, Ndounga M, Mathurin T, *et al.* Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XI. Geographic distribution of *Plasmodium falciparum* isolates with *dihydrofolate reductase* gene mutations in southern and central cameroon. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(4):378-82
12. Basco LK. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVI. Longitudinal surveillance of *in vitro* pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 2003; 69(2):174-8
13. Berry A, Vessiere A, Fabre R, *et al.* *Pfcr* K76T mutation and its associations in imported *Plasmodium falciparum* malaria cases. Infect Genet Evol. 2004; 4(4):361-4
14. Bertin G, Ndam NT, Jafari-Guemouri S, *et al.* High prevalence of *Plasmodium falciparum pfcr* K76T mutation in pregnant women taking chloroquine prophylaxis in Senegal. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(5):788-91
15. Best Plummer W, Pinto Pereira LM, Carrington CVF. *Pfcr* and *pfmdr1* alleles associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Guyana, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(4):389-92
16. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, *et al.* Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. PLoS Med. 2007, 4(11):e309.
17. Biswas S, Escalante A, Chaiyaroj S, Angasekwina P, Lal AA. Prevalence of point mutations in the *dihydrofolate reductase* and *dihydropteroate synthetase* genes of *Plasmodium falciparum* isolates from India and Thailand: a molecular epidemiologic study. Trop Med Int Health. 2000; 5(10):737-43

18. Björkman A, Phillips-Howard PA. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84(2):177-80
19. Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, *et al.* High prevalence of quintuple mutant *dhps/dhfr* genes in *Plasmodium falciparum* infection seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop.* 2003; 85(3):363-73
20. Certain LK, Briceño M, Kiara SM, Nzila AM, Watkins WM, Sibley CH. Characteristics of *Plasmodium falciparum dhfr* haplotypes that confer pyrimethamine resistance, Kilifi, Kenya, 1987-2006. *J Infect Dis.* 2008;197(12):1743-51.
21. Checchi F, Durand R, Balkan S, *et al.* High *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Harper, Liberia: results *in vivo* and analysis of point mutations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96(6):664-9
22. Clyde D, Shute G. Resistance of *Plasmodium falciparum* in Tanganyika to pyrimethamine administered at weekly intervals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1957; 51(6): 505-13
23. Cohuet S, Bonnet M, Van Herp M, Van Overmeier C, D'Alessandro U, Guthmann JP. Short report: molecular markers associated with *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the Democratic Republic of Congo. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75(1):152-4
24. Contreras CE, Cortese JF, Caraballo A, Plowe CV. Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolivar. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67(4):400-5
25. Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GAM, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the *dihydrofolate reductase-thymidilate synthase* gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85(23):9109-13
26. Dittrich S, Alifrangis M, Stohrer JM, *et al.* *Falciparum* malaria in the north of Laos: the occurrence and implications of the *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr1)* gene haplotype SVMNT. *Trop Med Int Health.* 2005; 10(12):1267-70

27. Djimde AA, Doumbo OK, Cortese JF, *et al.* A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. N Engl J Med. 2001; 344(4):257-63
28. Djimde AA, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. Lancet. 2001; 358(9285):890-1
29. Djimde AA, Dolo A, Quattara A, Diakité S, Plowe CV, Doumbo OK. Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. J Infect Dis. 2004; 190(4):853-5
30. Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* *pfcr1* and *pfmdr-1* genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. J Infect Dis. 2001; 183(9):1417-20
31. Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, *et al.* Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr 1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. Parasitology. 1997; 114(Pt 3):205-11
32. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. Exp Parasitol. 1998; 89(1): 1-8
33. Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre JF, Jesic Z, Le Bras J. Analysis of *pfcr1* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 2001; 114(1):95-102
34. Eberl KJ, Jelinek T, Aida AO, *et al.* Prevalence of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from southern Mauritania. Trop Med Int Health. 2001; 6(10):756-60
35. Ehrhardt S, Mockenhaupt FP, Eggelte TA, *et al.* Chloroquine blood concentrations and molecular markers of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in febrile children in northern Ghana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97(6):697-701
36. Enosse S, Magnussen P, Abacassamo F, *et al.* Rapid increase of *Plasmodium falciparum* *dhfr/dhps* resistant haplotypes, after the adoption of sulphadoxine-pyrimethamine as first line treatment in 2002, in southern Mozambique. Malar J. 2008; 7:115.

37. Färnert A, Rooth I, Svensson A, Snounou G, Björkman A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis.* 1999; 179(4):989-95
38. Färnert A, Tengstam K, Berggren Palme I, *et al.* Polyclonal *Plasmodium falciparum* malaria in travelers and selection of antifolate mutations after proguanil prophylaxis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(5):487-91
39. Felger I, Smith T, Edoh D, *et al.* Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93 Suppl 1:29-34
40. Ferone R. Folate metabolism in malaria. *Bull World Health Organ.* 1977; 55(2-3):291-8
41. Fidock DA, Nomura T, Talley AK. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* 2000; 6(4):861-71
42. Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.* 2004; 74(16):1957-72
43. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylat synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(8):3014-7
44. Francis D, Nsoby SL, Talisuna A, *et al.* Geographic differences in antimalarial drug efficacy in Uganda are explained by differences in endemicity and not by known molecular markers of drug resistance. *J Infect Dis.* 2006; 193(7):978-86
45. Gascón J, Mayor A, Mühlberger N, *et al.* Vigilancia epidemiológica mediante marcadores moleculares de resistencia frente a antimaláricos en aislados de *Plasmodium falciparum* importados a Barcelona, España. *Med Clin (Barc).* 2005; 125(8):286-9
46. Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(1):117-45
47. Haddad D, Snounou G, Mattei D, *et al.* Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(1):30-4

48. Hamel MJ, Poe A, Bloland P, *et al.* Dihydrofolate reductase I164L mutations in isolates: clinical outcome of 14 Kenyan adults infected with parasites harbouring the I164L mutation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102:338-45
49. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, *et al.* Polymorphisms in *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* genes and age related *in vivo* sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Trop.* 2005; 95(3):183-93.
50. Hastings IM, D'Alessandro U. Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today.* 2000; 16(8):340-7
51. Hastings IM, Donnelly MJ. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist Updat.* 2005; 8(1-2):43-50
52. Huaman MC, Yoshinaga K, Suryanatha A, Suarsana N, Kanbara H. Short report: polymorphisms in the *chloroquine resistance transporter* gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Lombok, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71(1):40-2
53. Jafari-Guemouri S, Boudin C, Fievet N, Ndiye P, Deloron P. *Plasmodium falciparum* genotype population dynamics in asymptomatic children from Senegal. *Microbes Infect.* 2006; 8(7):1663-70
54. Jelinek T, Ronn AM, Lemnge MM, *et al.* Polymorphisms in the *dihydrofolate reductase (DHFR)* and *dihydropteroate synthetase (DHPS)* genes of *Plasmodium falciparum* and *in vivo* resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health.* 1998; 3(8):605-9
55. Jelinek T, Peyerl-Hoffmann G, Mühlberger N, *et al.* Molecular surveillance of drug resistance through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *Malar J.* 2002; 1:11
56. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, *et al.* Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2002; 34(5):572-6
57. Kain KC & Lanar DE. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA on filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(6):1171-4

58. Khalil IF, Alifrangis M, Ronn, AM, *et al.* Pyrimethamine/Sulfadoxine combination in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria: relation between *dihydropteroate synthase/dihydrofolate reductase* genotypes, sulfadoxine plasma levels and treatment outcome. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67(3):225-9
59. Knobloch J. Parasitologie und Epidemiologie. In: Knobloch J (Hrsg.). *Malaria. Grundlagen und klinische Praxis.* UNI-MED Verlag, Bremen, 1. Auflage. 2003; 14-19
60. Kobbe R, Neuhoﬀ R, Marks F, *et al.* Seasonal variation and high multiplicity of first *Plasmodium falciparum* infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Trop Med Int Health.* 2006; 11(5):613-9
61. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, *et al.* Molecular markers for failure of sulphadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2002; 185(3):380-8
62. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, *et al.* Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis.* 2003; 187(12):1870-5
63. Kyosiimire-Lugemwa J, Nalunkuma-Kazibwe AJ, Mujuzi G, Mulindwa H, Talisuna A, Egwang TG. The Lys-76-Thr mutation in *pfcr*t and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96(1):91-5
64. Labbé AC, Patel S, Crandall I, Kain KC. Molecular Surveillance System for global patterns of drug resistance in improved malaria. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(1):33-6
65. Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, *et al.* Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med.* 2006; 355(19):1959-66
66. Lim P, Chy S, Arieu F, *et al.* *Pfcr*t polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(1):87-94
67. Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ, Hutchinson DB. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(4):533-41

68. Mayengue PI, Ndounga M, Davy MM, Tandou N, Ntoumi F. *In vivo* chloroquine resistance and prevalence of the *pfcr*t codon 76 mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Republic of Congo. *Acta trop.* 2005; 95(3):219-25
69. Mayengue PI, Kalmbach Y, Issifou S, Kremser PG, Ntoumi F. No variation in the prevalence of point mutations in the *Pfcr*t and *Pfmdr*1 genes in isolates from Gabonese Patients with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Res.* 2007; 100(3):487-93
70. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, *et al.* Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*t) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis.* 2001; 183(9):1413-6
71. Mehlotra RK, Fujioka H, Roepe PD, *et al.* Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with *pfcr*t polymorphism in Papua New Guinea and South America. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(22):12689-94
72. Menard D, Djalle D, Yapou F, Manirakiza A, Talarmin A. Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *Plasmodium falciparum* in Bangui, Central African Republic. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(2):2005-10
73. Mharakurwa S, Mutambu SL, Muyiradima R, Chimbadzwa T, Chandiwana SK, Day KP. Association of house spraying with suppressed levels of drug resistance in Zimbabwe. *Malar J.* 2004; 3:35
74. Mita T, Kaneko A, Lum JK, *et al.* Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(4):413-15
75. Mockenhaupt FP, Teun Bousema J, Eggelte TA, *et al.* *Plasmodium falciparum dhfr* but not *dhps* mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern Ghana. *Trop Med Int Health.* 2005; 10(9):901-8
76. Mockenhaupt FP, Bousema JT, Eggelte TA, *et al.* Concurrence of *Plasmodium falciparum dhfr* and *crt* mutations in northern Ghana. *Malar J.* 2005; 4:42

77. Mugittu K, Ndejambi M, Malisa A, *et al.* Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and prevalence of resistance markers in tanzania prior to revision of malaria treatment policy: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations in monitoring *in vivo* resistance. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71(6):696-702
78. Mutschler E, Schäfer-Korting M., Kapitel 9.2.3.1, Malaria. In: Mutschler E. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 7. Auflage. 1996; 715-22
79. Nagesha HS, Casey GJ, Rieckmann KH, *et al.* New haplotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*PfCRT*) gene among chloroquine-resistant parasite isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(4):398-402
80. Ndiaye D, Daily JP, Sarr O, *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop Med Int Health.* 2005; 10(11):1176-9
81. Ndounga M, Tahar R, Basco LK, Casimiro PN, Malonga DA, Ntoumi F. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and the prevalence of molecular markers of resistance in under 5-year olds in Brazzaville, Congo. *Trop Med Int Health.* 2007; 12(10):1164-71
82. Newton CR, Taylor TE, Whitten RO. Pathophysiology of fatal *falciparum* malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58(5):673-83
83. Nsimba B, Jafari-Guemouri S, Malonga DA, *et al.* Epidemiology of drug-resistant malaria in Republic of Congo: using molecular evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use. *Trop Med Int Health.* 2005; 10(10):1030-7
84. Nzila AM, Mberu EK, Sulo J, Dayo H, Winstanley PA, Sibley CH, Watkins WM. 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; 44(4):991-6
85. Nzila AM, Kokwaro G, Winstanley PA, Ward SA. Therapeutic potential of folate uptake inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Trends parasitol.* 2004; 20(3):109-12

86. Paul REL, Brockman A, Price RN, *et al.* Genetic analysis of *Plasmodium falciparum* infections on the north-western border of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93(6):587-93
87. Pearce R, Drakeley C, Chandramohan D, *et al.* Molecular determination of point mutation haplotypes in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* in three districts of northern Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1347-54
88. Peek R, Van Gool T, Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L. Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from Suriname. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(5):833-8
89. Petersen E. Malaria Chemoprophylaxis: when should we use it and what are the options? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2004; 2(1):119-32
90. Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate *reductase-thymidylate synthase* confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 86(23):9114-8
91. Plowe VC, Cortese JF, Djimde A, *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* *dihydrofolate reductase* and *dihydropteroate synthase* and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis.* 1997; 176(6):1590-6
92. Plowe CV. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol.* 2003; 206(Pt 21):3745-52
93. R ath K, Taxis K, Walz G, Gleiter CH, Li SM, Heide L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L (annual wormwood). *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(2):128-32
94. Randrianarivelojosia M, Fidock DA, Belmonte O, Valderramos SG, Mercereau-Puijalon O, Ariey F. First evidence of *pfcr1* mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(9):826-30
95. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2000; 403(6772):906-9

96. Robert-Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin. 2009; 39:385-9 (Accessed February 14, 2010 at: http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/ren4T3cctjHcA/PDF/23zMV5WzsY6g_ep39.pdf)
 97. Roper C, Pearce R, Bredekamp B, *et al.* Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*. 2003; 361(9364):1174-81
 98. Rynes RI, Bernstein HN. Ophthalmologic safety profile of antimalarial drugs. *Lupus*. 1993; 2(Suppl 1):17-9
 99. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230(4732):1350-1354
 100. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2007 Jul;23(7):332-9
 101. Schneider AG, Premji ZM, Felger I, *et al.* A point mutation in codon 76 of *pfcr*t of *P. falciparum* is positively selected for by chloroquine treatment in Tanzania. *Infect Genet Evol*. 2002; 1(3):183-9
 102. Schönfeld M, Barreto Miranda I, Schunk M, *et al.* Molecular surveillance of drug-resistance associated mutations of *Plasmodium falciparum* in south-west Tanzania. *Malar J*. 2007; 6:2
 103. Schunk M, Kumma WP, Barreto Miranda I, *et al.* High prevalence of drug-resistance mutations in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in southern Ethiopia. *Malar J*. 2006; 5:54
 104. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science*. 2002; 298(5591):210-13
 105. Smith T, Charlwood JD, Kitua AY, *et al.* Relationships of malaria morbidity with exposure to *Plasmodium falciparum* in young children in a highly endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59(2):252-7
 106. Smith T, Beck HP, Kitua A, *et al.* Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999; 93 Suppl 1:15-20
-

107. Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999b; 93 Suppl 1:59-64
108. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2005; 434(7030):214-7
109. Suh K, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *CMAJ.* 2004; 170(11):1693-702
110. Syafruddin D, Asih PS, Agarwal SL, Shankar AH. Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *Plasmodium falciparum* in Purworejo District, Central Java Province, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(6):614-20
111. Tagelsir N, Ibrahim Z, Medani A, *et al.* High frequency of *Plasmodium falciparum* *pfprt* K76T and *Pfpgt* N86Y in patients clearing infection after chloroquine treatment in Sudan. *Acta Trop.* 2006; 97(1):19-25
112. Thomas SM, Ndir O, Dieng T, *et al.* *In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of *pfprt* and *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(5):474-80
113. Tinto H, Ouédraogo JB, Erhart A, *et al.* Relationship between *Pfprt* T76 and the *Pfmdr-1* Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and *in vitro/in vivo* chloroquine resistance in Burkina Faso West Africa. *Infect Genet Evol.* 2003; 3(4):287-92
114. Tinto H, Sanou B, Dujardin JC, *et al.* Short report: usefulness of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of *in vivo* chloroquine resistance in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(1):171-3
115. Triglia T, Wang P, Sims PFG, Hyde JE, Cowman AF. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO Journal.* 1998; 17(14):3807-15
116. TropNetEurop. TropNetMembers (Accessed August 15, 2009 at: http://www.tropnet.net/members/member_index.html)

117. TropNetEurop. About TropNetEurop. (Accessed October 14, 2008 at: http://www.tropnet.net/about/about_index.html)
118. United Nations Statistics Division. Standard country and Area codes Classifications. (Accessed October 14, 2008 at : <http://unstats.un.org/unsd/methods/m49/m49regin.htm>)
119. Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(5):721-8
120. Vathsala PG, Pramanik A, Dhanasekaran S, *et al.* Widespread occurrence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*t) gene haplotype SVMNT in *P. falciparum* malaria in India. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(3):256-9
121. Wang P, Read P, Sims PFG, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiology.* 1997; 23(5):979-86
122. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, *et al.* Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of *dihydropteroate synthetase* and *dihydrofolate reductase* alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 89(2):161-177
123. Warhurst DC. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2001; 344(4):299-302
124. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis.* 2001; 184(6):770-6
125. White NJ. Current concepts: The treatment of malaria. *N Engl J Med.* 1996; 335(11):800-6
126. Whitty CJM, Rowland M, Sanderson F, Mutabingwa TK. Malaria. *BMJ.* 2002; 325(7374):1221-4
127. WHO. Malaria Control Today. Working document. March 2005 (Accessed October 14, 2008 at: http://www.who.int/malaria/docs/MCT_workingpaper.pdf)

128. WHO. Roll Back Malaria. Global malaria action plan. (Accessed October 14, 2008 at: <http://www.rollbackmalaria.org/gmap/index.html>)
129. WHO. Roll Back Malaria. Malaria Country Facts. (Accessed August 9, 2008 at: <http://www.rollbackmalaria.org/countryaction/index.html>)
130. WHO. Severe *falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94(Suppl 1):1-90
131. WHO. World Malaria Report 2008. Chapter 3: Estimated burden of malaria in 2006 and Country profiles (Accessed October 14, 2008 at: <http://www.who.int/malaria/wmr2008/>)
132. WHO. Impact of long lasting insecticidal nets (LLINs) and artemisininbased combination therapies (ACTs) measured using surveillance data in four African countries. (Accessed May 22, 2008 at: <http://www.who.int/malaria/docs/ReportGFImpactMalaria.pdf>)
133. Wilson PE, Kazadi W, Kamwendo DD, Mwapasa V, Purfield A, Meshnik SR. Prevalence of *pfcr* mutations in Congolese and Malawian *Plasmodium falciparum* isolates as determined by a new Taqman assay. Acta Trop. 2005; 93(1):97-106
134. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug resistant malaria. Lancet Infect Dis. 2002; 2(4):209-18
135. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodian-Thailand border. Emerg Infect Dis. 2008; 14(5):716-9
136. Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S. Artemisinins. Postgrad Med J. 2005; 81(952):71-8
137. Yamey G. Roll Back Malaria: a failing global health campaign. BMJ. 2004; 328(7448):1086-7
138. Zhong D, Afrane Y, Githeko A, Cui L, Menge DM, Yan G. Molecular epidemiology of drug-resistant malaria in western Kenya highlands. BMC Infect Dis. 2008; 8:105.

7. ANHANG

ABKÜRZUNGEN

ACT	–	Artemisinin-based combination therapy
ARDS	–	acute (adult) respiratory distress syndrome, Atemnotsyndrom des Erwachsenen
bp	–	Basenpaare
CQ	–	Chloroquin
Dhfr	–	Dihydrofolatreduktase
Dhps	–	Dihydropteroatsynthase
DIG	–	Digoxigenin
DM	–	Doppelmutation
DNA	–	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	–	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTMP	–	Desoxythymidinmonophosphat
EDTA	–	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	–	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	–	et alii, und andere
Glurp	–	Glutamate rich protein, Glutamatreiches Protein
GTP	–	Guanosintriphosphat
Hb	–	Hämoglobin
HIV	–	Humanes Immundefizienz-Virus
mg	–	Milligramm
µl	–	Mikroliter
ml	–	Milliliter
µM	–	Mikromol
mM	–	Millimol
msp	–	merozoite surface protein, Merozoiten Oberflächenprotein
n	–	Anzahl
NADPH	–	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
Nm	–	Nanometer
OD	–	optische Dichte
OPD	–	o-Phenyldiamin-Dihydrochlorid

P.	–	Plasmodium
pABA	–	para-Aminobenzoessäure
PBS	–	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	–	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
Pfcr1	–	<i>plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
pH	–	potentia hydrogenii
rpm	–	rounds per minute
SDS	–	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
S/P	–	Sulfadoxin/Pyrimethamin
SNP	–	single nucleotide polymorphism
SSOP	–	Sequenzspezifische Oligonukleotidprobe
Taq	–	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	–	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TM	–	Tripelmutation
TMAC	–	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	–	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts	–	Thymidilatsynthase
UNICEF	–	United Nations International Children's Emergency Fund
UNDP	–	United Nations Emergency Programme
UV	–	Ultraviolett
WHO	–	world health organization, Weltgesundheitsorganisation
WT	–	Wildtyp
°C	–	Grad Celsius

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Prof. Dr. Stefan N. Willich für die Möglichkeit der Promotion und für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Tomas Jelinek für die intensive fachliche Betreuung bis zur Fertigstellung der Arbeit sowie für seine konstruktive Kritik und Anregungen.

Frau Sabine Dittrich danke ich aufrichtig für die eingehende Unterstützung bei Erlernen und Optimierung der methodischen Prozesse und ihre fortwährende Hilfsbereitschaft.

Für seine umfassende Hilfestellung in allen statistischen Belangen möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Nikolai Mühlberger bedanken.

Der Arbeitsgruppe um Herrn PD Dr. Frank Mockenhaupt am Institut für Tropenmedizin Berlin sei für die mir zur Verfügung gestellten Gerätschaften und Räumlichkeiten gedankt. Insbesondere Frau Susanne Röwer und Frau Bärbel Jakob danke ich für ihren Einsatz bei der Lösung technischer Probleme.

Schließlich und außerordentlich danke ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und die stetige Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit; für hilfreiche fachliche Hinweise durch meine Eltern, Frau Dr. Despina Tseneklidou-Stoeter und Herrn Dr. Michael Stoeter und für wertvolle stilistische Anregungen durch meinen Mann, Herrn Harald Neuber.

ERKLÄRUNG

„Ich, Katerina Neuber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Importierte *Plasmodium falciparum* Isolate in Europa und molekulare Surveillance von Medikamentenresistenz“

selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Diese Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dar. Die Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Berlin, der 18.02.2010

Katerina Neuber

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

PUBLIKATIONSLISTE

1. Stoeter K, Dittrich S, Alifrangis M, Mühlberger N, Jelinek T, Grobusch M, Weitzel T, Zoller T, Gascón J, Schunk M, Ehrhardt S, Metteelli A, Laferl H, Cuadros J, Bisoffi Z, Gjorup I, Beran J, Harz C, da Cunha S, McWhinney P. Imported Plasmodium falciparum isolates in Europe and molecular surveillance for drug resistance: sentinel data from TropNetEurop.
Poster, vorgestellt auf dem 8. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, Hamburg, 10.06.2005
2. Stoeter K, Dittrich S, Alifrangis M, Mühlberger N, Jelinek T, Grobusch M, Weitzel T, Zoller T, Gascón J, Schunk M, Ehrhardt S, Metteelli A, Laferl H, Cuadros J, Bisoffi Z, Gjorup I, Beran J, Harz C, da Cunha S, McWhinney P. Molecular surveillance for malaria drug resistance in imported Plasmodium falciparum isolates: sentinel data from TropNetEurop.
Poster, vorgestellt auf dem 54th Annual Meeting der American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Washington DC, USA, 14.12.2005