

**Natürlich erworbene Antikörper gegen einen
Malariaimpfstoff bei Guahibo und Piaroa im
venezolanischen Amazonas**

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

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

**vorgelegt von
Baumann, Andreas Thomas**

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2.Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

AIDS and malaria and TB are national security issues. A worldwide program to get a start on dealing with these issues would cost about \$25 billion... It's, what, a few months in Iraq.

Jared Diamond

Für Catherine

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	3
1	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie und Historisches	5
1.2	Übertragung, Plasmodium spp.	6
1.3	Klinik	8
1.4	Eradikations- und Kontrollversuche	9
1.5	Studienregion	10
2	Studienziel, Projekteinbettung	11
3	Methoden	14
3.1	Studienpopulation	14
3.2	Ethikvotum, informiertes Einverständnis und medikamentöse Behandlung der Malaria	14
3.3	Extraktion von Daten aus dem regionalen Malaria-Register	15
3.4	Interviews und orientierende körperliche Untersuchung	16
3.5	Blutausstriche, dicke Tropfen und Seren	16
3.6	Rekombinante Antigene	16
3.7	Messung der Antikörperspiegel	19
3.8	Datenerfassung und Datenanalyse	22
4	Resultate	24
4.1	Studienpopulation	24
4.2	Malariainfektionen in Platanillal und Paria Grande ab 2003	25
4.3	Malariainfektionen in Platanillal und Paria Grande im Frühjahr 2009	26
4.4	Klinische Ergebnisse	27
4.5	Antikörper gegen MSP3 und GLURP	27
	Einteilung nach Alter und Geschlecht	29
	Stratifizierung nach Besitz und Nutzung von Moskitonetzen	31
	Stratifizierung nach Malariaanamnese	32
	Stratifizierung nach ethnischer Zugehörigkeit	33
4.6	Binäres logistisches und lineares Regressionsmodell	34

5	Diskussion	36
	Ethnie	37
	Alter und Netze.....	39
	Hohe Rate an positiven Proben	40
6	Zusammenfassung	44
7	Bild und Tabellenverzeichnis	45
7.1	Bilder und Graphiken.....	45
7.1	Tabellen.....	46
8	Literaturverzeichnis	47
9	Veröffentlichung	53
10	Erklärung zum Eigenanteil	53
11	Danksagung	53
12	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungen

A.	Anopheles
ADCI	Antibody Dependent Cellular Inhibition
ANOVA	Analysis of Variance
CDC	Centers for Disease Control and prevention
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F _{ab} -Teil	Antigen-Binding Fragment
F _c -Teil	Crystallisable Fragment
GLURP	Glutamate Rich Protein
GMZ	rekombinantes GLURP-MSP3-Fusionsprotein
Hb	Hämoglobinwert
i. e.	id est, lateinisch für „das heißt“
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
MSP	Merozoite Surface Protein
n	Anzahl der beobachteten Individuen
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
P.	Plasmodium
PBS	Phosphate Buffered Saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
RKI	Robert-Koch-Institut

SA CAICET	Servicio Autónomo, Centro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales
SD	Standardabweichung
spp.	Spezies
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TMB-one	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-Puffer
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
B	Regressionskoeffizient im linearen Modell

1 Einleitung

Zunächst soll das für das Verständnis der Arbeit benötigte Fundament repetiert werden, wobei auf eine kurze Zusammenfassung wichtiger epidemiologischer Daten und historischer Hintergründe eine kurze Darstellung der für diese Studie wesentlichen biologischen Grundlagen der Malaria im Allgemeinen und der *Plasmodium falciparum*-Infektion im Besonderen folgt.

Ein Teil der Daten der vorliegenden Arbeit ist in dem Artikel „Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan Amazon“, die im Frühsommer 2012 im Malaria Journal veröffentlicht wurde, publiziert [Baumann, 2012].

1.1 Epidemiologie und Historisches

Bis zum heutigen Tag zählt Malaria zu den zehn Haupttodesursachen in einkommensschwachen Ländern [WHO, 2011], wobei die letalen Verläufe zum allergrößten Teil durch *P. falciparum* verursacht werden. Sie ist in mehr als 100 Ländern endemisch und von den zirka 40 Prozent der Weltbevölkerung, die in Risikogebieten leben, erkranken jährlich rund 250 Millionen Individuen. Diese Zahlen, wie auch die Zahlen zu letalen Verläufen, beruhen auf Hochrechnungen und Schätzungen. So meldet das Robert-Koch-Institut, dass jährlich etwa eine Million Menschen dem Erreger weltweit zum Opfer fallen, davon über 90 Prozent im tropischen Afrika und mehrheitlich Kinder [RKI, 2012]. Eine Publikation in der Zeitschrift Lancet gibt für 2010 mehr als 1,2 Millionen Opfer an, wovon zirka 58 Prozent Kinder unter fünf Jahren seien [Murray, 2012]. Die Weltgesundheitsorganisation geht dahingegen von 655 000 Toten im Jahr aus [WHO 2011b].

Die Krankheit begleitet den *Homo sapiens* bereits seit langer Zeit: Im zirka 1550 vor Christus geschriebenen, zu den ältesten medizinischen Schriftstücken gehörenden „Papyrus Ebert“, findet sie Erwähnung [Fischer-Elfert, 2005] und auch aus Indien, China und dem heutigen Irak sind historische Dokumente mit Verweisen auf zyklische Fieber, bei denen es sich am ehesten um Malaria

gehandelt haben dürfte, erhalten. Vor wenigen Jahren konnte *P. falciparum*-DNS auch in rund 4000 Jahre alten ägyptischen Mumien nachgewiesen werden [Nerlich, 2008]. Auch die überzufällige Häufung von Resistenzgenen wie Sichelzellanämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel, Thalassämien und Duffy-Negativität in Endemiegebieten spricht für die lange gemeinsame Geschichte von Erreger und Mensch [López, 2010].

Die erste erhaltene detailliertere Beschreibung des Krankheitsbildes wurde von Hippokrates von Kos erstellt und stammt aus dem Jahr 400 vor Christus, wobei dieser im Rahmen des Krankheitskonzeptes der Humoralpathologie noch Sumpfwasser als auslösendes Agens vermutete. Noch heute spricht man zum Beispiel im Französischen von „Paludisme“, abgeleitet vom lateinischen „Palus“, also Sumpf.

Im antiken Rom hatte man eine andere Hypothese: Die schlechte Luft, also „mal´aria“, aus den Sümpfen sollte gemäß der Miasmenlehre die Krankheit hervorrufen.

Erst 1880 wurden *Plasmodium* Spezies als Erreger der Malaria vom französischen Militärarzt Alphonse Laveran entdeckt. Im Jahr 1897 konnte dann durch den englischen Arzt und General Ronald Ross die Übertragung der Krankheit durch Stechmückenweibchen belegt werden, aus deren Speicheldrüsen ihm die Isolierung des Erregers gelang [CDC, 2004]. Dem italienischen Zoologen und Anatom Giovanni Battista Grassi gelang 1898 dann der Nachweis, dass nur die Gattung *Anopheles* humanpathogene Varianten der Malaria überträgt. Er stellte zudem den Lebenszyklus des Erregers dar und differenzierte auch erstmals Unterformen der auslösenden Plasmodienstämme [Capanna, 2006]. Während lange Zeit *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* als einzige relevante humanpathogene Spezies galten, kam in jüngerer Vergangenheit *P. knowlesi* dazu, das wie *P. malariae* neben dem Menschen auch andere Primaten befällt [Pain, 2008].

1.2 Übertragung, Plasmodium spp.

Der komplexe Lebenszyklus der humanpathologischen Variante des Parasiten beinhaltet neben einer asexuellen, Schizogonie genannten Phase im

menschlichen Zwischenwirt sexuelle, Sporogonie genannte Stadien, die nur in *Anopheles spp.* als Endwirt, die zur *Culicida*-Gruppe, also den Stechmücken gehören, ablaufen:

Mit dem Stich sondern infizierte *Anopheles*-Weibchen neben gerinnungshemmenden und durchblutungsfördernden Enzymen in ihrem Speichel auch zwischen 10 und 100 Sporozoiten in den Zwischenwirt ab [Mehlhorn, 2002]. Diese wandern binnen Stunden im venösen Blutstrom zur Leber, in deren Parenchym sie eindringen, um sich dort als Leberschizonten in einer Vakuole in asexueller Vermehrung – im Falle von *P. falciparum* in sechs bis 16 Tagen – zu jeweils zirka 30.000 Merozoiten umzuwandeln [Frank, 1986]. Gegen Ende dieses „exoerythrozytäre Schizogonie“ genannten Prozesses werden die Merozoiten schrittweise in Vesikeln in die Blutbahn abgegeben, wo sie Erythrozyten befallen [Lindner, 2012]. *P. falciparum* kann im Gegensatz zu anderen Plasmodienspezies alle Altersstufen der roten Blutkörperchen befallen [Lucius, 1997]. In den Erythrozyten verwandeln die Erreger sich zu Ringformen, aus denen Trophozoiten hervorgehen, die wiederum zu Schizonten heranreifen. Aus diesen erythrozytären Schizonten bilden sich im Falle von *P. falciparum* bis zu 32 Merozoiten, die durch Ruptur des roten Blutkörperchens freigesetzt werden und erneut Erythrozyten befallen können. Ein geringer Anteil der Merozoiten entwickelt sich zu geschlechtlich differenzierten Gametozyten, die bei einem erneuten Stich in den Darm der *Anopheles spp.*-Weibchen gelangen, wo sie sich zu Gameten wandeln. Aus diesen entsteht in sexueller Vermehrung die Zygote, aus der sich der motile Ookinet entwickelt, der sich nach Adhäsion an die Darmwand zur Oozyste umwandelt, aus der jeweils hunderte von Sporozoiten entstehen, die nach ihrer Freisetzung die Speicheldrüse befallen, um beim nächsten Stich wieder in den Zwischenwirt injiziert zu werden [Lindner, 2012] (Eine vereinfachende Darstellung findet sich in Abbildung 3).

Anopheles spp. stechen vor allem nachts sowie in der Dämmerung und sind die einzigen Vektoren (Überträger) der Malaria beim Menschen. Von den rund 430 heute bekannten *Anopheles*-Unterarten kommen nur zirka 35 Spezies für die Malariaübertragung in Frage. Nur die Weibchen von *Anopheles* stechen; als wesentlichen Schritt ihres Vermehrungszyklus brauchen sie nach der

Befruchtung zur Reifung ihrer Eier eine Blutmahlzeit. Zudem müssen bestimmte Umweltbedingungen gegeben sein. Vor allem Luftfeuchtigkeit und Temperatur müssen hinreichend hoch sein, um die Replikation und das Überleben des Parasiten in den Organen des Moskitos zu gewährleisten. Daher deckt sich das Verbreitungsgebiet der Erkrankung heutzutage im Wesentlichen mit den tropischen und subtropischen Zonen unter 2000 Höhenmetern (siehe Karte Abbildung 1). Bestimmte *Anopheles*-Arten, die potentielle Vektoren darstellen, kommen auch heute noch in gemäßigten Zonen vor, die malariafrei geworden sind. In Deutschland ist dies zum Beispiel *Anopheles plumbeus* [Kruger, 2001]. Deshalb können malariafrei gewordene Zonen aufgrund der Anwesenheit des Vektors wieder Endemiegebiete werden [CDC, 2010].

Raritäten sind Fälle sogenannter „Flughafen-“ oder „*Baggage*-Malaria“, bei denen aufgrund der Anamnese des Erkrankten eine Einschleppung infizierter Mücken im Gepäck Flugreisender als wahrscheinliche Ursache angenommen werden kann. Die Vektoren, so wird angenommen, können nach Öffnen des Koffers Personen infizieren, die zwar nicht im tropischen Ausland waren, aber mit dem Gepäck zu schaffen hatten oder Flughafenbesucher beziehungsweise -anrainer waren. Als weitere seltene Übertragungsmodi gelten die parenterale – zum Beispiel durch Transfusionen oder Nadelstichverletzung hervorgerufene – und die diaplazentare Infektion [RKI, 2012].

1.3 Klinik

Die durch *P. falciparum* ausgelöste Malaria tropica zeigt die schwersten Krankheitsverläufe: Bei Nichtimmunen ist ohne Behandlung mit einer Letalität von rund 20 Prozent zu rechnen [RKI, 2012]. Neben – bei dieser Unterart der Malaria typischerweise nicht regelmäßigen – Fieberschüben, Abgeschlagenheit, Durchfall, Kopf- und Gliederschmerzen treten bei zirka 60 Prozent der Patienten Thrombozytopenien, bei etwa einem Viertel Spleno- und bei rund einem Siebtel Hepatomegalien auf [RKI, 2012]. Schwere Komplikationen der *P. falciparum*-Infektion sind die „zerebrale Malaria“ mit ZNS-Durchblutungsstörungen sowie

Anämie, akutes Nierenversagen, die disseminierte intravasale Koagulopathie, pulmonale Verlaufsformen und Multiorganversagen [RKI, 2012].

1.4 Eradikations- und Kontrollversuche

Zur Bekämpfung der Malaria erwiesen sich früh neben der medikamentösen Behandlung auch strukturelle Maßnahmen, wie das Trockenlegen von Sumpfgebieten in Verbindung mit dem Einsatz von Insektiziden, als wirksam, so dass in den 1950er und 1960er Jahren unter Regie der WHO – im Rahmen des „Global Eradication of Malaria Program“ – die Ausrottung der Krankheit möglich schien.

In moderaten Klimazonen war das Programm erfolgreich, aber die im Lauf der Kampagne auftretende Arzneimittelresistenzen der Plasmodien sowie Insektizidresistenzen bei *Anopheles*-Mücken als auch die mancherorts inkonsequente Umsetzung der Maßnahmen [Oaks, 1991], führten zum Scheitern des Vorhabens der weltweiten Ausrottung der Krankheit und der Einstellung des Programms im Jahr 1972.

Die Grundpfeiler heutiger Malariakontrollprogramme sind die von der „Roll Back Malaria“-Initiative herausgegebenen Richtlinien des „Global Malaria Action Plan“¹ mit den folgenden Schwerpunkten:

- Schnelle Diagnose und effektive Therapie zur Reduktion des Parasitenreservoirs in der Bevölkerung (heute v. a. Artemisininbasierte Kombinationstherapien, ACT).
- Beseitigung von Brutplätzen in Verbindung mit dem Einsatz von Larviziden und Insektiziden als Maßnahme gegen die Vektoren.

¹ Die „Roll Back Malaria“-Initiative wurde 1998 von der Weltbank, dem Kinderhilfswerk der Vereinten Nationen, dem Entwicklungsprogramm der Vereinten Nationen und der WHO mit dem Ziel gegründet die Bemühungen im Kampf gegen Malaria zu bündeln und hat heute mehr als 500 Partner [Roll Back Malaria, 2013].

- Verwendung von insektizidbeschichteten Moskitonetzen und Gebrauch von sog. Repellents sowie bauliche Maßnahmen zur Reduzierung der Kontakte mit dem Vektor.

Die Grundlage jeder effektiven Malariakontrolle ist dabei ein funktionierendes Überwachungssystem (surveillance) und die Aufklärung der Bevölkerung über die Übertragungsbedingungen der Krankheit [RKI, 2012].

1.5 Studienregion

In Lateinamerika wurde der Parasit vermutlich erst im 16. Jahrhundert eingeschleppt [Yalcindag, 2012]. Seine Verbreitungsgebiete sind heute hauptsächlich die tropischen Regenwälder des Amazonas- und Orinocogebietes und Teile der Pazifikküste. In Venezuela sind heute vor allem die südlichen Bundesstaaten Bolivar und Amazonas betroffen. Mit 6,2 beziehungsweise 0,8 Einwohnern pro Quadratkilometer im Vergleich zu rund 30 pro Quadratkilometer im gesamten Staatsgebiet sind sie relativ dünn besiedelt.

Die Mortalität der Malaria ist sehr niedrig bzw. nicht vorhanden, weshalb die Infektionskrankheit als kontrolliert angesehen werden kann [Metzger, 2009].

Der Bundesstaat Amazonas, mit 180.145 Quadratkilometer etwa doppelt so groß wie Portugal, hat zirka 150.000 Einwohner, von denen mehr als die Hälfte aus indigenen Völkern stammt. Wenngleich die absolute Anzahl an Malariafällen gering ist, hat der Bundesstaat Amazonas aufgrund der niedrigen Bevölkerungszahl die höchste Malariainzidenz in Venezuela (2007: 68,4 Fälle/1.000 Einwohner), wobei *P. vivax* (ca. 80 Prozent) die am häufigsten gefundene Spezies ist, gefolgt von *P. falciparum* (ca. 20 Prozent, mit sinkender Tendenz). *P. malariae* wird nur sehr selten diagnostiziert [Metzger 2008/2011]. Auch in den venezolanischen Endemiegebieten besteht die Gefahr, dass sich durch Selektion arzneimittelresistente Plasmodienspezies vermehren [Contreras, 2002].

Der Verwaltungsbezirk Atures, mit der Bezirkshauptstadt Puerto Ayacucho, liegt im Nordwesten des Bundesstaates Amazonas. Obwohl Atures von der Fläche her der kleinste der sieben Bezirke dieses Bundesstaates ist, hat er die höchste

Zahl an Malariafällen, da er mit 20,3 Einwohnern pro Quadratkilometer am dichtesten besiedelt ist. Die Transmission der Plasmodien erfolgt in Atures hauptsächlich durch *A. darlingi* [Magris 2007]. Im Unterschied zu den anderen sechs Bezirken findet die Malariasaison hier saisonal, im Durchschnitt zwei bis fünf Monate nach den stärksten Niederschlägen der Regen-, also in der Trockenzeit, statt [Metzger, 2009]. Die hier vorgestellte Studie fand während der Regenzeit statt, da in dieser zu erwarten war, dass die Antikörpertiter nicht durch akute Infektionen angehoben („geboostert“) werden, sondern sich auf einem konstanten Grundniveau befinden.

2 Studienziel, Projekteinbettung

Da die Resistenzentwicklung von Plasmodien weiterhin eine große Bedrohung für die gängigen Therapieansätze darstellt, wäre eine wirksame Vakzine gegen *P. falciparum* als Primärprophylaxe ein äußerst nützliches Werkzeug zur Malariakontrolle [Smith, 2010; Mordmüller 2010]. Das Impfantigen GMZ2 ist ein Fusionsprotein aus den *P. falciparum*-Oberflächenantigenen „*Merozoite Surface Protein 3*“ (MSP3) und „*Glutamate Rich Protein*“ (GLURP) und wurde bereits in Deutschland und Gabun in Phase I Studien als Impfantigen evaluiert und zeigte dass GMZ2 sicher, gut verträglich und immunogen ist [Esen, 2009; Mordmüller, 2010]. Bei *Saimiri sciureus* Affen konnte mit GMZ2 ein partieller Schutz gegen Belastungsinfektionen erreicht werden [Carvalho, 2004]. Auch beim Menschen konnte ein Zusammenhang mit dem Schutz vor klinischen Verläufen der Malaria nachgewiesen werden [Barry, 2009]. Allerdings gab es bis 2009 keine verfügbaren Daten zur natürlich erworbenen Immunität gegen MSP3 und GLURP aus Lateinamerika. [Fowkes, 2010]. Da GMZ2 auch auf anderen Kontinenten als in Afrika eingesetzt werden könnte und sich die Parasitenpopulationen in Südamerika von den afrikanischen genetisch unterscheiden [Anderson, 2000], sind diese Informationen von großem Interesse für die Impfstoffentwicklung. Die Erhebung dieser Daten ist der Gegenstand dieser Dissertationsschrift.

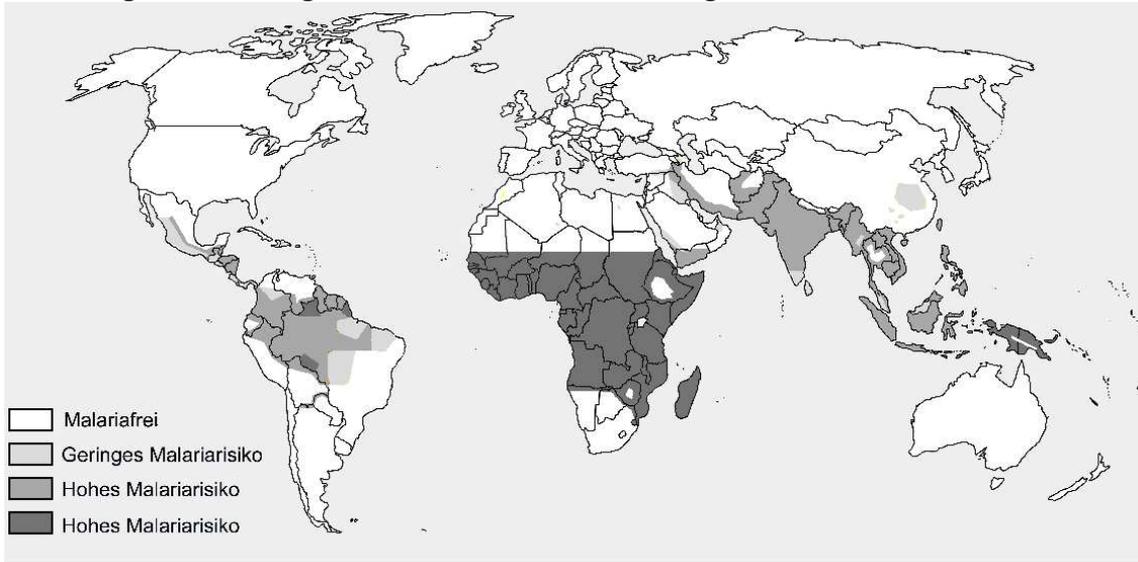
Im Jahr 2008 wurde in Atures ein Pilotprogramm zur Verbesserung der Medikamenteneinnahme (engl. *adherence*, dt. Adhärenz bzw. „Therapietreue“) der oral-medikamentösen Malariatherapie begonnen, bei dem spezielle Blisterverpackungen zum Einsatz kommen sollten [Shwe, 1998;].

Die vorliegende Studie fand im Rahmen dieses Projekts statt. Am Anfang des Projektes wurde eine Querschnittsstudie bei den zwei in Atures am stärksten vertretenen indigenen Gruppen durchgeführt, um Basisdaten zur Mikroepidemiologie der Malaria in der Projektregion zu erheben. Da serologische Marker besonders in Gegenden mit geringer Inzidenz geeignete Indikatoren sind [Bousema, 2010], wurden die Immunantworten auf MSP3- und GLURP-Antigene als Kennwerte für die natürlich erworbene Immunität gegen *P. falciparum* bestimmt. Begleitend wurden Interviews und körperliche Untersuchungen durchgeführt, sowie eine regionale Datenbank aufgearbeitet.

Die Studie sollte vor allem folgende Fragen beantworten:

- Können in indigenen lateinamerikanischen Populationen natürlich erworbene Antikörper gegen die potentiellen Impfantigene GLURP und MSP3 detektiert werden?
- Finden sich für die Häufigkeit und Intensität des Auftretens dieser Antikörper Unterschiede zwischen Populationssubgruppen?

Abbildung 1: Studienregion, weltweite Malariaverteilung



Verteilung Endemiegebiete weltweit, 2005 (Quelle: Wikipedia)



Lokalisation des Bundesstaats Amazonas in Venezuela

Zum Größenvergleich: Portugal ist etwa halb so groß



Lokalisation des Verwaltungsbezirkes Atures und der Hauptstadt des Bundesstaates Puerto Ayacucho

Zum Größenvergleich: Atures ist etwa dreimal so groß wie das Saarland

3 Methoden

3.1 Studienpopulation

Die Studie fand im Juni 2009 in drei indigenen Dörfern der Provinz Atures im venezolanischen Bundesstaat Amazonas statt. Die Dörfer liegen südlich der Provinzhauptstadt Puerto Ayacucho an der einzigen asphaltierten zirka 130 km langen Straße des Bundesstaates. Die Dörfer werden von zwei ethnischen Volksgruppen, den Guahibo (auch: Guajibo, Wahibo, Hiwi, Jivi) und den Piaroa, bewohnt. Diese beiden Volksgruppen stellen in Atures den größten Teil der Bevölkerung. Bei den Studiendörfern handelte es sich um:

- 1) Platanillal (475 Einwohner, Guahibo)
- 2) Cerro de Oro (60 Einwohner, Guahibo)
- 3) Paria Grande (463 Einwohner, Piaroa)

Der Abstand zwischen diesen Dörfern ist klein (<20 km Luftlinie) und bezüglich ökologischer, geographischer Bedingungen (für die Malariatransmission z. B. der Abstand zu *Anopheles*-Brutplätzen) sind sie sehr ähnlich. Die Mehrheit der Unterkünfte vor Ort besteht nicht aus traditionellen Hütten, sondern aus von der Regierung errichteten einfachen Wohnhäusern. Platanillal und Paria Grande haben jeweils einen Gesundheitsposten, der neben allgemeinmedizinischem Personal jeweils auch über einen Mikroskopisten verfügt, der im Rahmen nationaler Gesundheitsprogramme in Malariadiagnostik und -therapie ausgebildet wurde.

3.2 Ethikvotum, informiertes Einverständnis und medikamentöse Behandlung der Malaria

Die Studie wurde von der Ethikkommission des „Zentrums zur Erforschung und Kontrolle von Tropenkrankheiten ‘Simón Bolívar’ in Amazonas“, (*Servicio Autónomo Centro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales, Simón Bolívar, SACAICET*), in Puerto Ayacucho, Amazonas, Venezuela und der Ethikkommission des venezolanischen Ministeriums für

Wissenschaft und Technologie (*Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación*) genehmigt. Die Bewohner wurden in Dorfversammlungen über Ziele und Vorgehensweisen der Studie aufgeklärt, wenn nötig unter Zuhilfenahme von Übersetzern und alle wurden eingeladen teilzunehmen. Diejenigen, die ihr Einverständnis gaben, wurden untersucht und interviewt. Das Einverständnis wurde durch Unterschrift, beziehungsweise bei Analphabeten durch Fingerabdruck gemeinsam mit der Nummer des Personalausweises dokumentiert. Bei Probanden mit Malaria, also im Rahmen dieser Studie definitionsgemäß bei jeder im dicken Tropfen nachgewiesenen Parasitämie, wurde entsprechend der damals aktuellen nationalen Leitlinie therapiert [Grenfell, 2008]:

- *P. falciparum*: Tag 1-3 Artemisinin, 0,4 mg/kg Körpergewicht (KG), Tag 2 Mefloquin 15 mg/kg KG, Tag 3 Mefloquin 10 mg/kg KG
- *P. vivax*: Tag 1-2 Chloroquin 10 mg/kg KG, Tag 3 Chloroquin 5 mg/kg KG, Tag 1-7 Primaquin 0,25 mg/kg KG

3.3 Extraktion von Daten aus dem regionalen Malaria-Register

Der Bundesstaat Amazonas verfügt über ein Dokumentationssystem zu Erfassung aller Malariafälle. Die Menge der erfassten Daten wurde zwischenzeitlich erweitert, sie beinhaltet jedoch stets neben dem Datum der Probengewinnung und –untersuchung die diagnostizierte Plasmodienspezies, Ort der Diagnose, Ort der vermutlichen Infektion und die Ethnie des Probanden. Die in den Gesundheitsposten von Platanillal und Paria Grande vor Beginn der Studie von Januar 2003 bis Mai 2009 diagnostizierten Malariafälle wurden analysiert.

3.4 Interviews und körperliche Untersuchung

Jeder Proband – beziehungsweise bei noch nicht sprachfähigen Kleinkindern deren Erziehungsberechtigte – wurde anhand eines Befragungsbogens, der mit Hilfe von Anthropologen formuliert wurde, auf Spanisch interviewt. Bei unzureichenden Spanischkenntnissen der Studienteilnehmer halfen Übersetzer. Der strukturierte Anteil des Interviews beinhaltete Fragen zur persönlichen Malariaanamnese, zu Besitz und Nutzung von Moskitonetzen, zum Allgemeinzustand und zu unspezifischen Symptomen während der vorangegangenen sieben Tage sowie zu einer etwaigen Schwangerschaft. Daran schloss sich für jeden Probanden eine orientierende körperliche Untersuchung mit Messung der Körpertemperatur und Milzpalpation an.

3.5 Blutausstriche, dicke Tropfen und Seren

Von jedem Probanden wurden dicke Tropfen und Blutausstriche hergestellt. Die Proben wurden luftgetrocknet und 45 Minuten mit dreiprozentiger Giemsalösung gefärbt [Kilian, 2000]. Alle Objektträger wurden einmal von ausgebildeten Mitarbeitern des SACAICET und ein zweites Mal von der regionalen Gesundheitsverwaltung Puerto Ayacucho gelesen.

Allen Studienteilnehmern wurde zudem zehn Milliliter Blut ohne Zusatz von Antikoagulantien abgenommen. Dieses wurde zentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.6 Rekombinante Antigene

Als „rekombinant“ werden artifizielle Proteine bezeichnet, die außerhalb ihres normalen physiologischen Entstehungsortes, beispielsweise in Bakterien- oder Eukaryotenkulturen, produziert wurden. Im Falle von Bakterien wird die Gensequenz, die für das gewünschte Protein kodiert, kloniert und bei Bedarf mit einem *tag* – einem Abschnitt, der Auffinden und Isolieren des fertigen Genprodukts erleichtert – versehen. Nun wird das Gen mittels Restriktionsenzymen in ein Expressionsplasmid kloniert, und dieses in den Mikroorganismus „transformiert“, also von selbigem aufgenommen. Dieser

produziert dann das gewünschte rekombinante Protein. Zur „Ernte“ werden die Bakterien vom Nährmedium getrennt und lysiert. Eine übersichtliche Darstellung findet sich in Abbildung 2.

Die Herstellung der verwendeten rekombinanten Proteine fand in *Escherichia coli* im Labor von Michael Theisen, University of Copenhagen, statt [Theisen, 1995].

MSP3 befindet sich in den intraerythrozytären Stadien des Parasiten [McColl, 1997] (siehe Abbildung 3). Von dem 48 kDa großen Protein gibt es 2 Hauptallele, wobei nur der Carboxy-Terminus konserviert ist. Es wird bis heute als erfolgversprechender Impfkandidat angesehen [Courtin, 2009; Audran, 2005], obwohl die Analyse von natürlich erworbenen anti-MSP3 Antikörper bei unterschiedlichen Allelen die Assoziation mit Schutz vor Malaria heterogen ist [Fowkes, 2010].

Das 220 kDa große Glutamate-Rich Protein (GLURP) besteht aus drei Abschnitten von denen zwei aus repetitiven Sequenzen bestehen.

Es ist in den asexuellen, im Menschen stattfindenden Vermehrungsstadien, also in den Leberkapseln, den erythrozytären Schizonten und Merozoiten, nachweisbar [Borre, 1991] (siehe Abbildung 3). Vor allem der rekombinant hergestellte R0-Teil des konservierten N-terminalen, nicht-repetitiven Abschnitts des Proteins erwies sich in epidemiologischen Assoziationsstudien als vielversprechend [Fowkes, 2010; Oeuvray, 2000].

Bei beiden Antigenen ist die Funktion für den Parasiten unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass gegen sie gerichtete Antikörper eine antikörperabhängige zelluläre Inhibierung (ADCI) des *in vitro* Wachstums von *P. falciparum* erreichen können [Dodo, 2000; Theisen, 2001; Audran, 2005]. Dieser gemeinsame Wirkmechanismus ist die Begründung für die Kombination von MSP3 und GLURP im Impfantigen GMZ2 [Soe Soe, 2004; Esen, 2009]. Die für alle Experimente im Rahmen der Studie eingesetzten Untereinheiten sind die konservierten Abschnitte MSP3₂₁₂₋₃₁₈ und GLURP₂₇₋₅₀₀.

Abbildung 2: Herstellung rekombinanter Proteine.

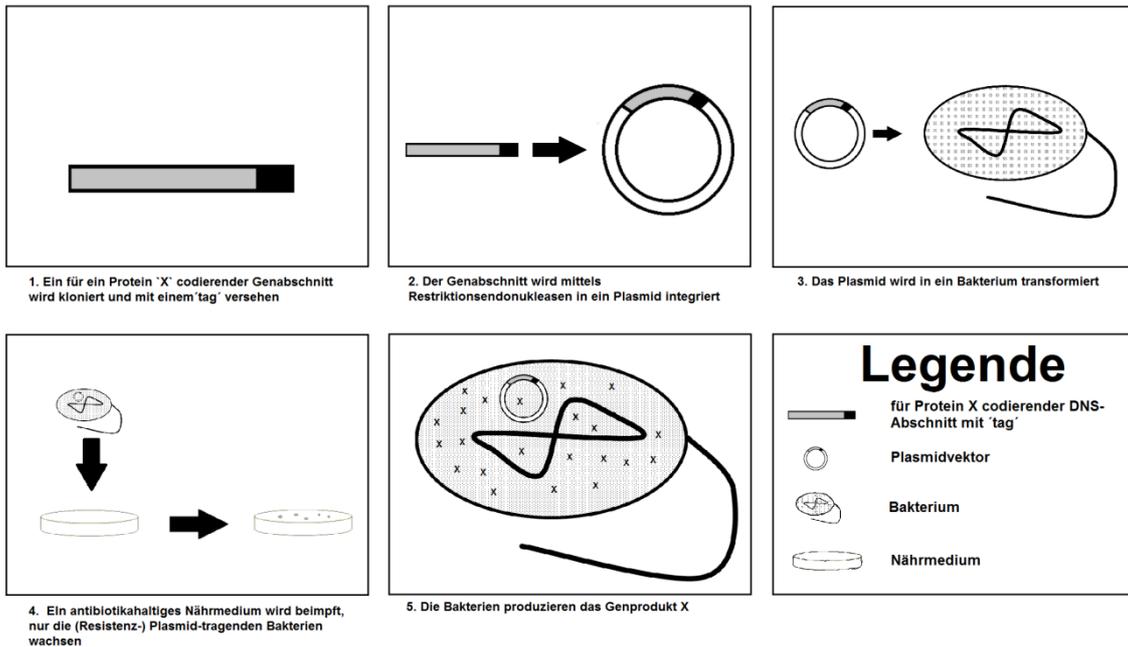
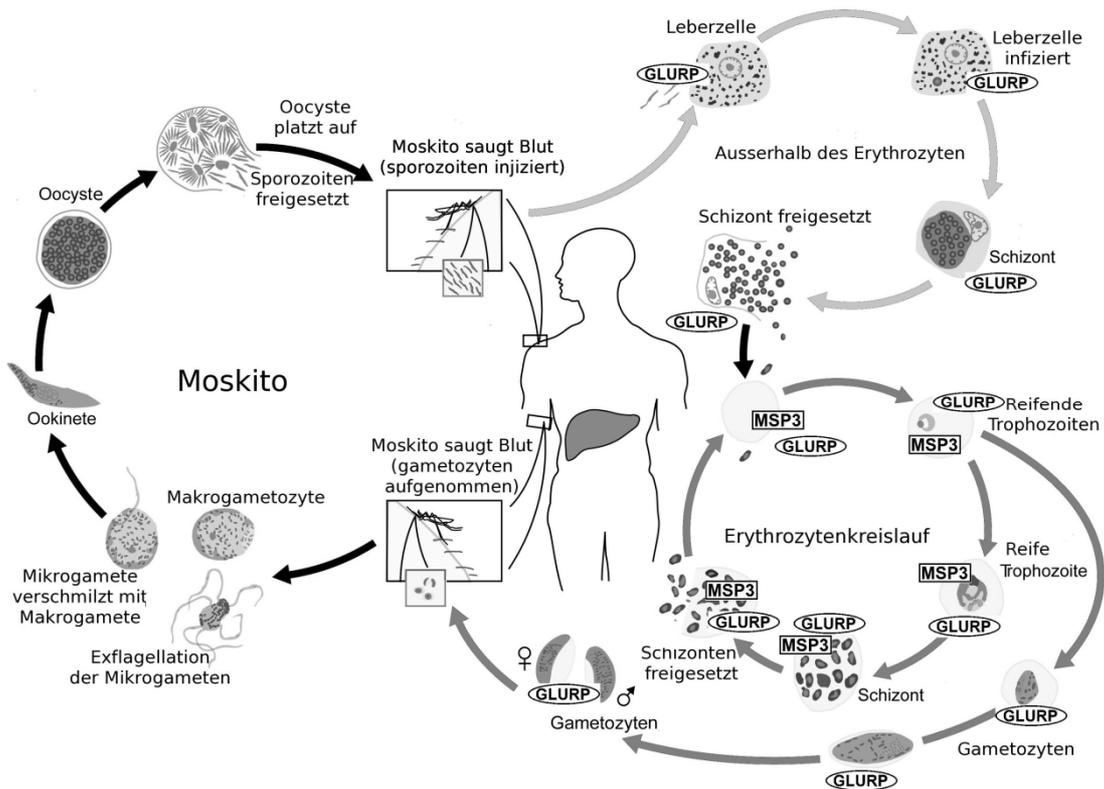


Abbildung 3: Expression von MSP3 und GLURP im *P. falciparum* Vermehrungszyklus



3.7 Messung der Antikörperspiegel

Die Serumantikörperspiegel gegen MSP3 und GLURP wurden durch Einsatz einer modifizierten Version eines bereits beschriebenen quantitativen ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), einem enzymvermittelten antikörperbasierten Nachweisverfahren, bestimmt [Theisen, 1998].

Der ELISA-Test stellt eine bereits lange etablierte Möglichkeit des Nachweises von Antigen durch die indirekte Messung enzymatischer Farbreaktionen an markierten Antikörpern dar, die an die Antigene gebunden haben:

Ein spezifischer Antikörper wird entweder am F_c -Teil direkt mit einem sogenannten Reporterenzym markiert, oder der unmarkierte spezifische Antikörper wird mittels eines zweiten, an den spezifischen Antikörper bindenden und seinerseits Reporterenzym-gekoppelten Detektionsantikörper nachgewiesen.

Am F_c -Teil des jeweiligen markierten Immunglobulins sitzt also ein Enzym, welches die Umsetzung eines Substrats zu einem farbchromatographisch messbaren Produkt katalysiert. Anschließend wird die optische Dichte (OD) im Wellenlängenbereich des Produktes bestimmt.

Das Antigen kann qualitativ oder quantitativ bestimmt werden. Bei qualitativer Bestimmung wird die Frage beantwortet, ob das Antigen nachweisbar ist (ja oder nein). Bei der quantitativen Bestimmung wird darüber hinaus die Konzentration des Antigens im Serum gemessen (in $\mu\text{g/ml}$). Die Quantifizierung kann dabei relativ zu einem Standard und in metrischen Einheiten erfolgen [Lequin, 2005].

Im vorliegenden Fall wurde ein quantitativer Antikörper-ELISA angewandt. Die Polystyroloberflächen einer Mikrotiterplatte werden dabei mit dem Ziel-Antigen der gesuchten Immunglobuline beschichtet. Die zu untersuchenden Serumproben werden in die Nöpfchen beziehungsweise „Wells“ pipettiert, wobei Antikörper, soweit sie im Serum enthalten sind, mit ihrem F_{ab} -Teil an das Antigen an den Wänden der Nöpfchen binden. Nach gründlichem Auswaschen der Nöpfchen mit dem Zweck alles nicht gebundene Antigen zu entfernen, wird eine Lösung mit Detektionsantikörper beigefügt, der mit seinem F_{ab} -Teil am F_c -

Teil der am Antigen der gebundenen Immunglobuline der Probe bindet. Nach erneutem Auswaschen wird das Substrat des Reporterenzym beigefügt, wobei der messbare Farbumschlag die Menge an vorhandenem Immunglobulin widerspiegelt (siehe Abbildung 4).

Durch die Messung einer Standardprobe mit bekannter Konzentration von Antikörpern auf jeder beschickten Mikrotiterplatte werden Unterschiede der ODs bei verschiedenen Chargen durch veränderte Rahmenbedingungen, wie zum Beispiel die genaue Temperatur oder die exakte Einwirkzeit mess- und ausgleichbar. Der Antikörpergehalt des Standardserums wiederum lässt sich durch Vergleich mit definierten Immunglobulinmengen bestimmen.

Praktische Durchführung: Auf Mikrotiterplatten wurde MSP3- beziehungsweise GLURP-Antigen in einer Verdünnung von 0,5 mg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert (*Coating*). Am nächsten Morgen schloss sich ein Waschzyklus an (Dreifaches Auswaschen der 96 Nöpfchen der Platte mit einem Waschpuffer aus PBS mit 0,5 Mol/Liter NaCl und 0,1% Tween-20). Dann wurden die Nöpfchen für eine Stunde mit einer Lösung aus PBS mit 0,1% Tween-20 (PBS-T) mit 30 g entfettetem Milchpulver pro Liter geblockt, d.h. die verbliebenen freien Anteile der Wand der Wells werden mit einem Proteinfilm überzogen um unspezifische Bindungen der in den folgenden Schritten zugegebenen Antikörper an der Plastikoberfläche der Wells zu verhindern. Nach einem weiteren Waschzyklus wurden die Nöpfchen mit Probandenproben, Positiv- und Negativ-Kontrollen sowie Verdünnungsreihen eines hochpositiven Standardserums beschickt. Diese jeweils zu Kontrollzwecken duplizierten und mit Blockpuffer (PBS mit 0,1% Tween-20 (PBS-T) mit 10 g entfettetem Milchpulver pro Liter) verdünnten Proben wurden für zwei Stunden auf einer rutschfesten Schüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Das Standardserum wurde seriell von 1/20 bis 1/327.680 verdünnt, die Probandenproben und Kontrollen jeweils in einer Verdünnung von 1/50 und 1/200 eingefügt.

Nachdem die Platten einen weiteren Waschzyklus durchlaufen hatten, wurden sie mit einem peroxidasekonjugierten, gegen menschliche Immunglobuline

gerichteten Ziegen-IgG (Caltag, 1/5.000 in Blockpuffer) für eine Stunde auf der Schüttelplatte inkubiert, erneut gewaschen und mit TMB-One (Promega) beschickt. Hierbei handelt es sich um ein Substrat, das durch die Peroxidase an den Ziegen-IgGs in einen Farbstoff überführt wird. Hierfür wurden die Platten für 15 Minuten im Dunkeln gelagert, worauf die Färbungsreaktion mit Schwefelsäure, die TMB-denaturiert, abgebrochen wurde und die Lichtabsorption chromatographisch bei 450 nm bestimmt wurde.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

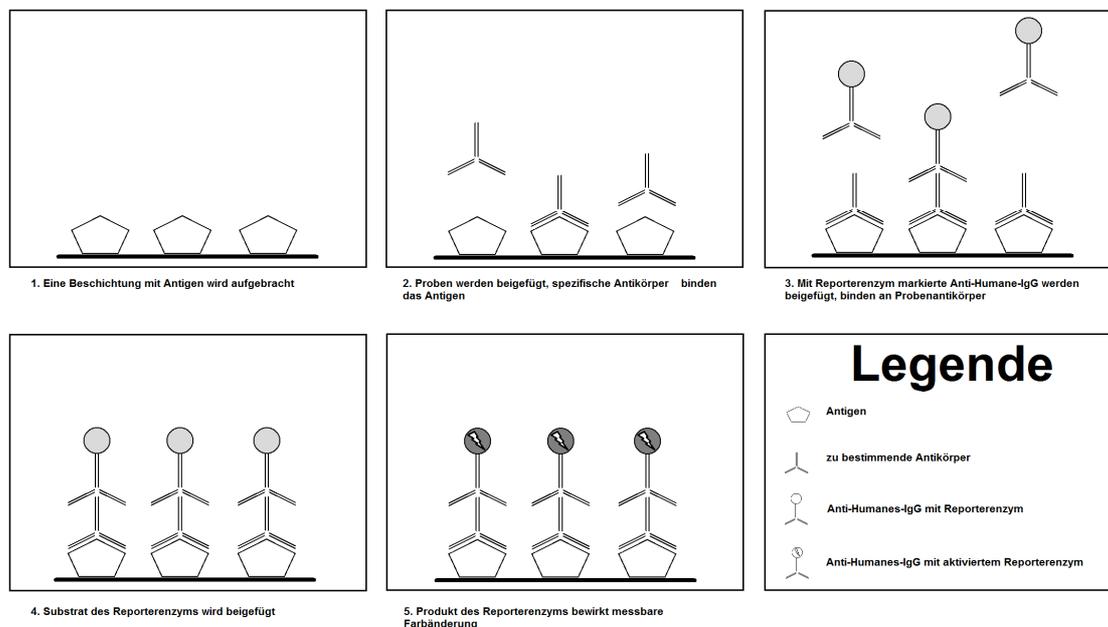
Tween®20	entspricht Polysorbat 20, einem nicht-toxischen Emulgator
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, enthält pro Liter 8g Natriumchlorid, 0,2g Kaliumchlorid, 1,42g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,27g Kaliumhydrogenphosphat
PBS-T	Grundlage für die eingesetzten Puffer, enthält 1ml Tween®20 auf 1Liter PBS
Blockpuffer	Enthält 30g entfettetes Milchpulver auf 1Liter PBS-T
Verdünnungspuffer	Enthält 10g entfettetes Milchpulver auf 1Liter PBS-T
Waschpuffer	Enthält 29g Natriumchlorid entfettetes Milchpulver auf 1Liter PBS-T
TMB one	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Substrat der Meerrettichperoxidase) in Pufferlösung
Schwefelsäure	1 normale (entspricht 0,5 molarer) Schwefelsäure
MSP-3	MSP ₃₂₁₂₋₃₁₈ -Abschnitt des Merozoite Surface Protein, 0,5 mg/ml in PBS
GLURP	GLURP ₂₇₋₅₀₀ -Abschnitt des Glutamate Rich Protein, 0,5 mg/ml in PBS
Ziegen-IgG (Caltag)	Peroxidasemarkierte gegen menschliche IgGs gerichtete Antikörper aus der Ziege 1:5000 in Blockpuffer

Wenn Proben im Ergebnis ODs ergaben, die höher als die eines Standardserums waren, wurde die Messung mit einer Verdünnung von 1/800 wiederholt. Über die OD dieses Standardserums² dessen Antikörperspiegel in mg/dl quantifiziert wurde, konnten die absoluten Konzentrationen der Antikörper der Probanden errechnet werden. Als Negativkontrolle kam gepooltes Serum von 20 Freiwilligen, die nie in Malaria-Endemiegebieten gelebt hatten, zum Einsatz.

² Das Standardserum stammte von einem stark reaktiven Angehörigen des Yanumami-Stammes, einer Ethnie aus dem Hoch-Endemiegebiet des Alto-Orinoco.

Das arithmetische Mittel der Negativkontrollen hatte eine Konzentration von 0,075 mg/dl (SD 0,040 mg/dl) für MSP3 und 0,092 mg/dl (SD 0,044 mg/dl) für GLURP.

Abbildung 4: Schematische Abbildung des Antikörper-ELISA



3.8 Datenerfassung und Datenanalyse

Alle Daten wurden auf Plausibilität untersucht, zweifach – räumlich und örtlich getrennt – digitalisiert und in Epidata v3.0® auf Übertragungsfehler untersucht. Die optischen Dichten (ODs) der Duplikate wurden gemittelt und normiert. Messungen, bei denen die Ergebnisse der Duplikate eine Abweichung von mehr als 25 Prozent zeigten, wurden wiederholt, ansonsten wurde das arithmetische Mittel verwendet.

Alle Ergebnisse in ODs wurden unter Zuhilfenahme der Werte des Standardserums in Konzentrationsangaben (mg/dl) umgerechnet.

Proben wurden als „positiv“ beziehungsweise „hoch-positiv“ definiert, wenn ihre OD die Summe aus der OD des arithmetischen Mittels des Negativpools plus drei beziehungsweise fünf Standardabweichungen (SDs) desselben überschritt.

Die statistische Auswertung wurde mit der Software SPSS 19® durchgeführt. Im Gegensatz zu den Negativkontrollen, bei denen von einer Normalverteilung der ODs ausgegangen werden konnte, musste als Mittelwert für die Proben das geometrische Mittel betrachtet werden, da nach Antigenkontakt die Antikörperspiegel exponentiell ansteigen.

Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen bezüglich Antikörperspiegeln wurden mit dem T-Test gerechnet, während χ^2 -Tests der Suche nach signifikanten Unterschieden in Bezug auf die Verteilung (hoch-) positiver Titer im Allgemeinen dienten.

Spearman's Rho wurde verwendet um die Korrelation zwischen Titer und Probandenalter zu bestimmen.

Das Lebensalter in Jahren ging auch gemeinsam mit dem Geschlecht, den anamnestischen Angaben zu Malariaepisoden in den letzten zwölf Monaten beziehungsweise im gesamten bisherigen Leben, dem Besitz und der regelmäßigen Nutzung von Moskitonetzen sowie der ethnischen Zugehörigkeit in eine Regressionsanalyse zur qualitativen Vorhersage der Positivität ein.

Das gewählte, recht konservative, binäre logistische Modell bietet sich an, weil damit für jede einzelne Variable eine Odds Ratio errechnet werden kann.

Des Weiteren wurde für dieselben Variablen ein lineares Regressionsmodell erstellt, um deren Einfluss auf die absoluten Anti-GMZ2-IgG-Titer zu ermitteln. Um diese Analyse durchzuführen wurden die Antikörperspiegel dekadisch logarithmiert, um eine Gauss'sche Normalverteilung der Werte zu erreichen. Die Ergebnisse sind exponenziert („delogarithmiert“) dargestellt um die Interpretation zu vereinfachen.

4 Resultate

4.1 Studienpopulation

Vierhundertfünfundsiebzig Individuen nahmen an der Studie teil und stellten Serum zur Verfügung. Die demographischen und per Fragebogen erfassten Daten der Probanden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 2: Probanden und Interviewergebnisse

	Guahibo (n = 180)	Piaroa (n = 295)
Alter (Jahre)	20,8, SD 19,1	22,4, SD 16,8
- Kleinkinder (0-6)	45 (25,0%)	49 (16,6%)
- Kinder (7-14)	47 (26,1%)	67 (22,7%)
- Adoleszenten (15-24)	30 (16,7%)	74 (25,1%)
- Erwachsene (25-40)	28 (15,6%)	63 (21,4%)
- ältere Erwachsene (über 40)	30 (16,7%)	42 (14,2%)
Geschlecht, weiblich	108 (60,0%)	147 (48,8%)
Besitz eines Moskitonetzes	143 (79,4%)	285 (96,6%)
Konstante Nutzung eines Netzes	125 (69,4%)	263 (89,2%)
Malariaepisode in den letzten 12 Monaten	32 (17,8%)	36 (12,2%)
Malariaepisode im ganzen Leben	112 (62,2%)	170 (57,6%)

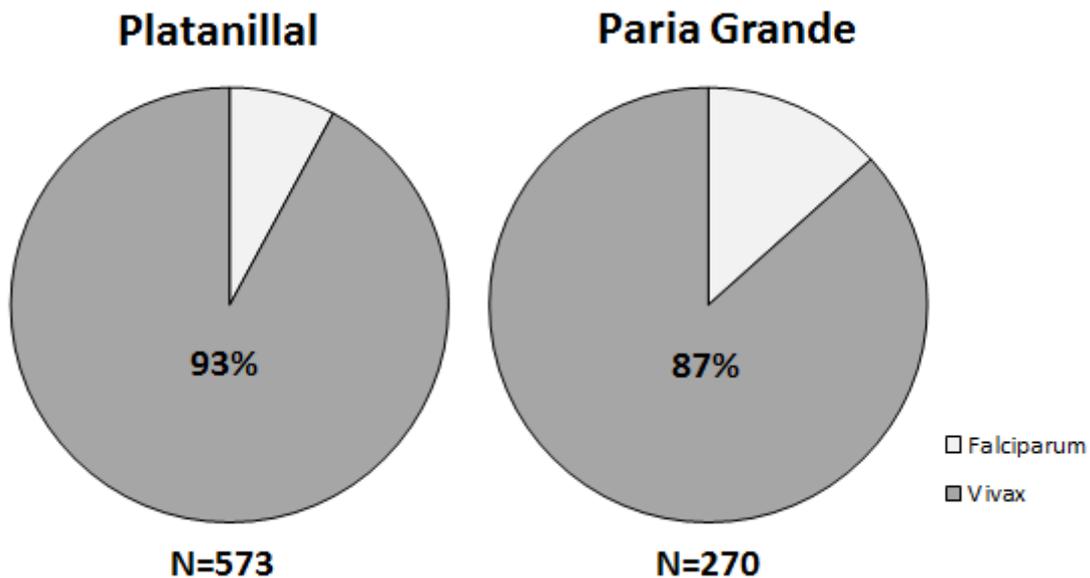
4.2 Malariainfektionen in Platanillal und Paria Grande ab 2003

In den sechs Jahren vor der Querschnittsstudie (2003 – 2008), verzeichnete die Krankenstation von Platanillal insgesamt 573 Malariafälle bei Patienten, die sich der Guahibo-Ethnie zuordnen (2003: 134 Fälle; 2004: 62 Fälle; 2005: 90 Fälle; 2006: 141 Fälle; 2007: 95 Fälle; 2008: 51 Fälle).

Die Krankenstation in Paria Grande dokumentierte im selben Zeitraum 270 Fälle bei Patienten, die sich der Piaroa-Ethnie zuordnen (2003: 11 Fälle; 2004: 65 Fälle; 2005: 29 Fälle; 2006: 70 Fälle; 2007: 74 Fälle; 2008: 21 Fälle).

Davon wurden in Platanillal 45/573 Fälle (7,8%) beziehungsweise in Paria Grande 36/270 Fälle (13,3%) durch *P. falciparum* verursacht. Die restlichen Infektionen wurden durch *P. vivax* verursacht. *P. malariae* und Infektionen mit mehreren Plasmodienspezies wurden in keinem Fall diagnostiziert.

Abbildung 5: Detektierte Malariafälle 2003-2008 in Platanillal und Paria Grande

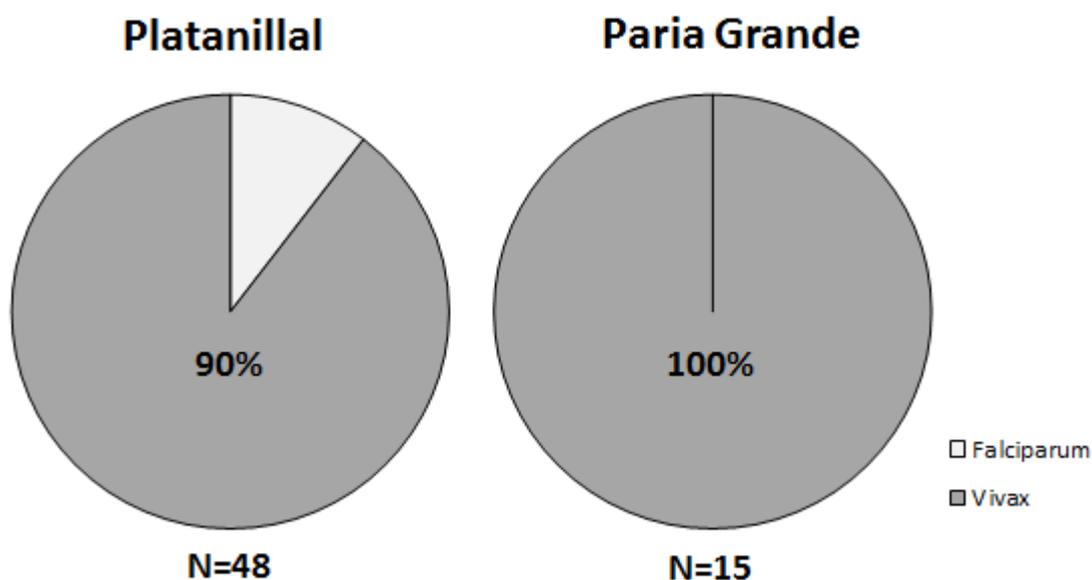


4.3 Malariainfektionen in Platanillal und Paria Grande im Frühjahr 2009

Während der fünf Monate, die der Querschnittsstudie vorausgingen, wurden im Gesundheitsposten von Platanillal insgesamt 154 dicke Tropfen von Patienten untersucht. Dreiundvierzig von 154 Blutausstrichen (27,9%) stellten sich als positiv für *P. vivax*, und 5 von 154 Blutausstriche (3,2%) als positiv für *P. falciparum* heraus.

Im Gesundheitsposten von Paria Grande wurden zwischen Januar und Mai 2009 148 dicke Tropfen untersucht. Fünfzehn von 148 Blutausstrichen (10,1%) wurden als positiv für *P. vivax* diagnostiziert. *P. falciparum* wurde im genannten Zeitraum nicht gefunden.

Abbildung 6: Detektierte Malariafälle Januar bis Mai 2009 in Platanillal und Paria Grande



4.4 Symptome und klinische Laborbefunde

Bezogen auf die letzten sieben Tage vor dem jeweiligen Untersuchungstag klagten die Probanden (n = 475) über folgende Symptome: Kopfschmerzen (71; 14,9%), Gelenkschmerzen (45; 9,5%), Grippesymptome (101; 21,3%), Husten (34; 7,2%), Schüttelfrost (5; 1,1%), Fieber (28; 5,9%), Diarrhoe (46; 9,7%), Bauchschmerzen (30, 6,3%), Übelkeit (34, 7,2%), Abgeschlagenheit (14, 2,9%). Die Durchschnittstemperatur der Probanden betrug 37,02 °C (Min. 35,8°C, Max. 38,9°C, SD. 0,4803). Neun der 475 Probanden (1,8%) hatten eine Körpertemperatur über 38 °C. Keiner der Studienteilnehmer hatte eine tastbare Milz.

Bei keinem Studienteilnehmer konnte am Tag der Querschnittsuntersuchung eine *P. falciparum* -Infektion diagnostiziert werden. Bei zwei Probanden (2/475; 0,4%) wurde eine niedrige *P. vivax*-Parasitämie nachgewiesen (sie zeigten jeweils <100 Parasiten/µl). Bei beiden Patienten handelte es sich um Angehörige der Guahibo, die über Malaria in ihrer Vorgeschichte berichteten. Der eine Proband war ein leicht anämischer zwölfjähriger Junge (Hb 12,5 mg/dl) in reduziertem Allgemeinzustand, der über Schüttelfrost in den letzten sieben Tagen klagte, jedoch mit normaler Körpertemperatur (36,5°C) zur Untersuchung erschien. Bei dem zweiten Patienten handelte es sich um eine 26-jährige anämische Schwangere (Hb 9,7 mg/dl) mit ebenfalls normaler Körpertemperatur (37,1°C) die ein reduziertes Allgemeinbefinden beklagte.

4.5 Antikörper gegen MSP3 und GLURP

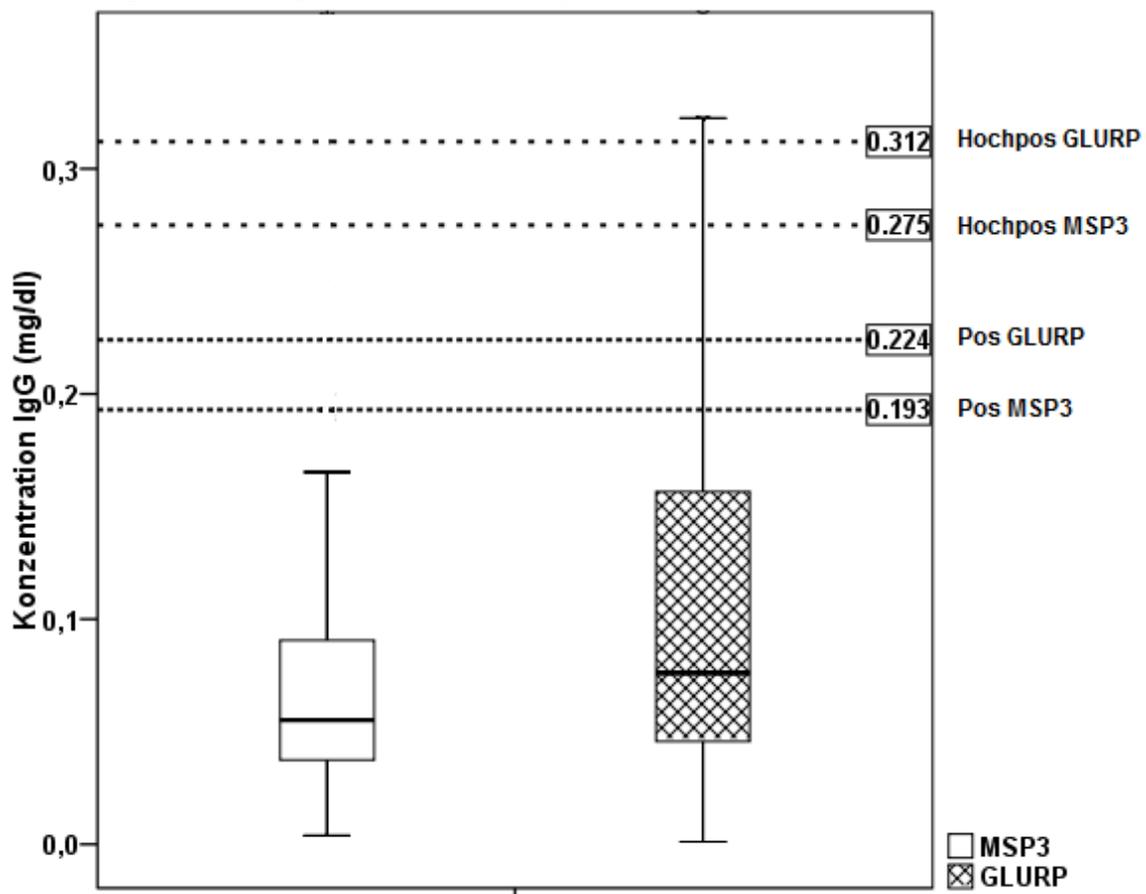
Der Cut-Off-Wert für Positivität der Proben lag für MSP3 bei 0,193 mg Immunglobulin/dl Serum und für GLURP bei 0,224 mg/dl. Einhundertelf der 475 Probanden (23,4%) waren für mindestens einen der Antikörper positiv. Dreiundfünfzig von 475 Probanden (11,2%) waren Anti-MSP3-positiv und 93 von 475 (19,6%) für Anti- GLURP. Fünfunddreißig von 475 Teilnehmern (7,4%) hatten positive Antikörperspiegel gegen beide Antigene.

Das geometrische Mittel der positiven Proben lag für MSP3 bei 0,36 mg/dl (95% Konfidenzintervall: 0,32 mg/dl – 0,41 mg/dl) und für GLURP bei 0,47 mg/dl (95% KI: 0,41 mg/dl – 0,55 mg/dl).

Die Berechnung der Cut-Off-Werte für die Hochpositiven ergab 0,275 mg/dl für MSP3 und 0,312 mg/dl für GLURP. Achtundsiebzig der 475 Probanden (16,4%) waren für einen oder beide Antikörper hochpositiv, davon 36 von 475 (7,6%) für MSP3, und 61 von 475 (12,8%) für GLURP. Neunzehn der 475 Teilnehmer (4%) hatten für beide Antikörper hochpositive Spiegel.

Die höchsten gemessenen Antikörperspiegel in absoluten Zahlen waren Werte von 2,8 mg/dl für MSP3 und 3,36 mg/dl für GLURP.

Abbildung 7: Verteilung der Antikörperspiegel bei MSP3 und GLURP



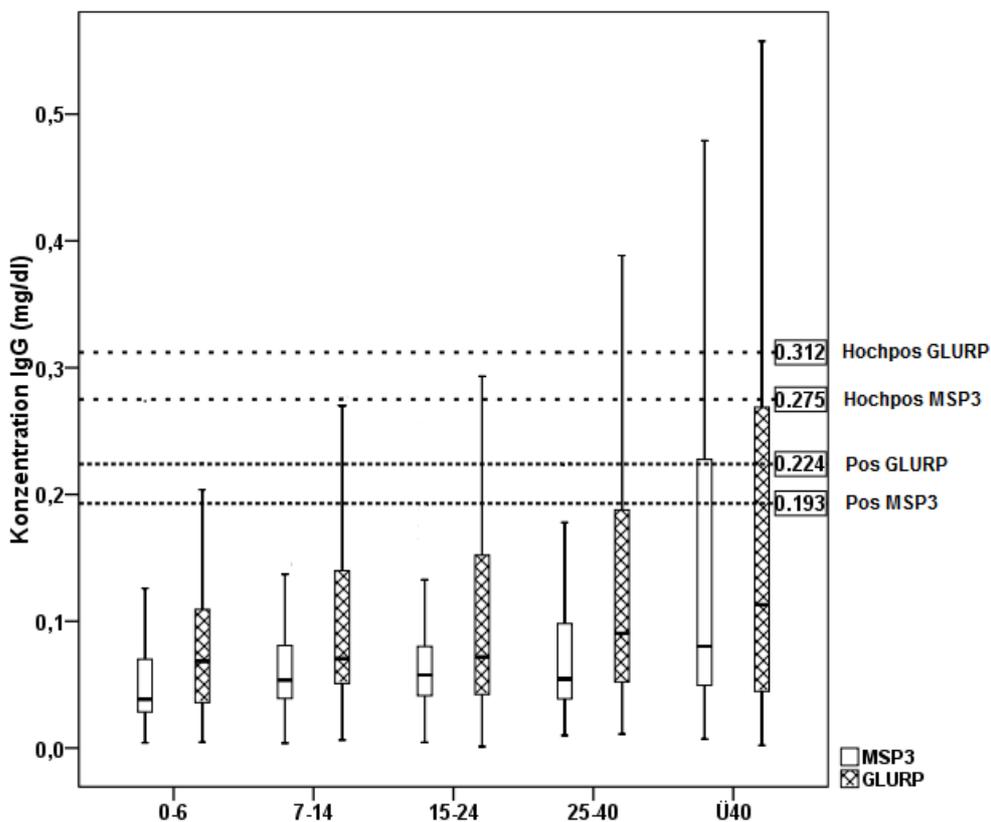
Einteilung nach Alter und Geschlecht

Mit zunehmendem Alter der Probanden war ein signifikanter Anstieg der Antikörperspiegel nachweisbar (Rangkorrelation nach Spearman, $R_{SpGLURP}=0,130$, $p=0,005$. $R_{SpMSP3}=0,259$, $p<0,001$). Bei Einteilung der Studienpopulation in Altersgruppen

- 0 bis 6 Jahre: Kleinkinder, n=94
- 7 bis 14 Jahre: Kinder, n=114
- 15 bis 24 Jahre: Adoleszenten, n=104
- 25 bis 40 Jahre: Erwachsene, n=91
- über 40 Jahre: Ältere, n=72

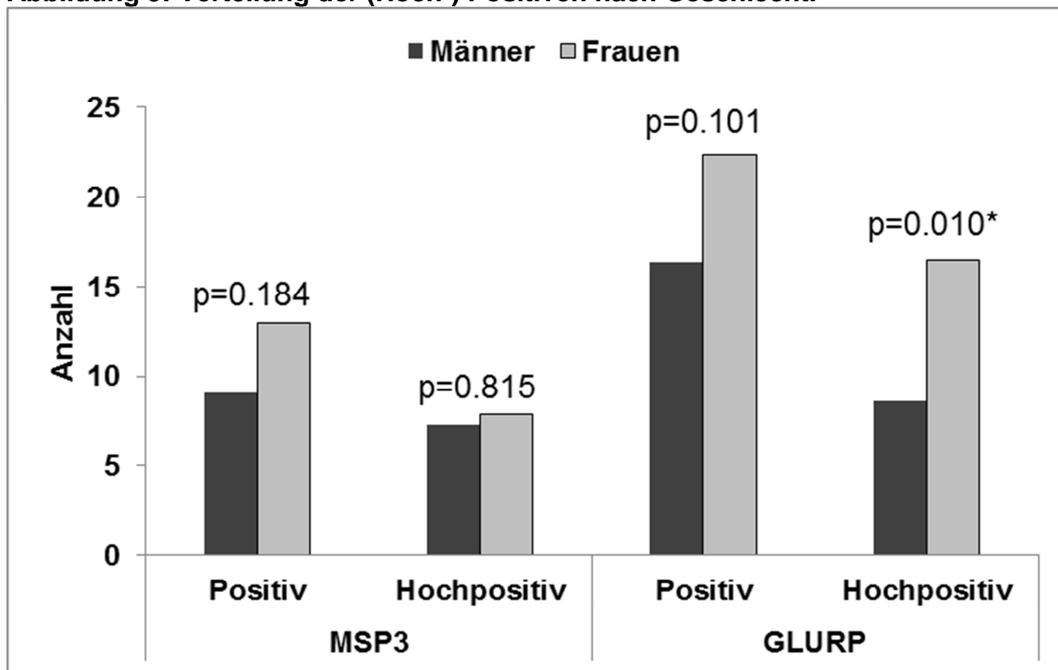
zeigte eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*, ein Mittelwertsvergleich zwischen mehreren Gruppen) signifikante Ergebnisse für MSP3 und GLURP ($p_{MSP3}< 0,001$, $p_{GLURP}=0,031$).

Abbildung 8: Darstellung der Verteilung der Antikörperspiegel nach Altersgruppen, mit Cut-Off-Werten



Hinsichtlich des Geschlechts konnten keine signifikanten Unterschiede der Antikörperspiegel (T-Test: $p_{\text{GLURP}}=0,101$, $p_{\text{MSP3}}=0,169$) und der Antikörperprävalenz (χ^2 -Test: $p_{\text{GLURP}}=0,101$, $p_{\text{MSP3}}=0,184$) festgestellt werden. Unter den Hochpositiven für GLURP jedoch waren signifikant mehr Frauen vertreten, während ein solcher Effekt für MSP3 nicht belegt werden konnte (χ^2 -Test: $p_{\text{GLURP}}=0,010$, $p_{\text{MSP3}}=0,815$).

Abbildung 9: Verteilung der (Hoch-) Positiven nach Geschlecht.

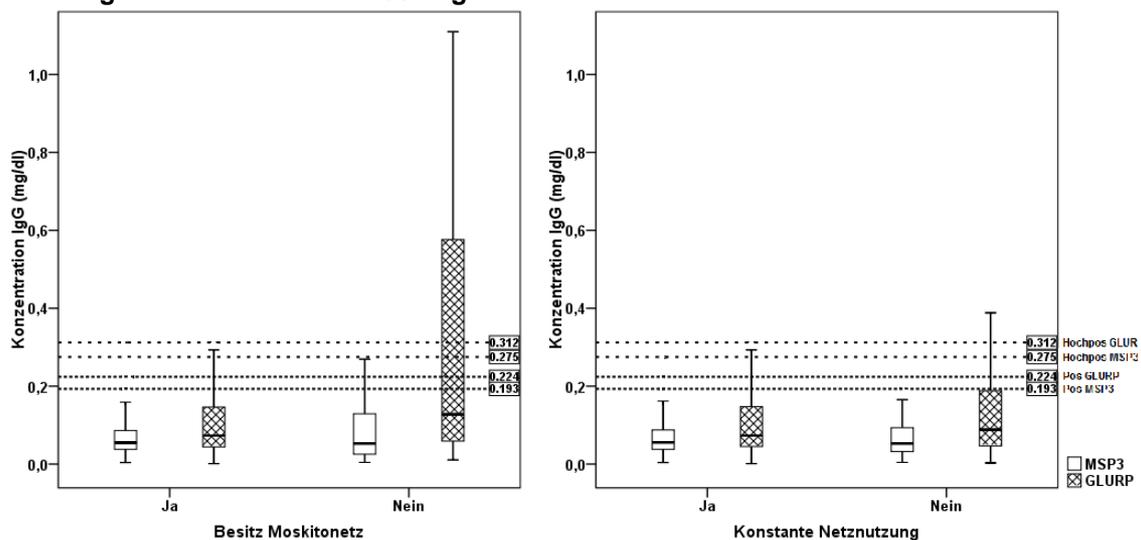


Stratifizierung nach Besitz und Nutzung von Moskitonetzen

Beim Vergleich derer, die den Besitz eines Moskitonetzes angaben (428/475, 90,1%) mit denen, die über kein solches verfügten (47/475, 9,9 %) zeigten die Netzbesitzer niedrigere Antikörperspiegel gegen GLURP (T-test, $p_{\text{GLURP}} < 0,001$). Der Unterschied bezüglich Anti-MSP3-Immunglobulinen war jedoch nicht signifikant (T-test, $p_{\text{MSP3}} = 0,489$).

Dreihundertzweiundneunzig von 475 Teilnehmern (82,5%) gaben die tägliche Nutzung eines Moskitonetzes während der letzten 30 Tage an. Sie wurden als regelmäßige Nutzer definiert. Zwischen diesen und dem Rest der Studienpopulation konnte weder in Bezug auf den Anteil der Positiven (χ^2 -Test, $p_{\text{GLURP}} = 0,182$, $p_{\text{MSP3}} = 0,084$), noch in Bezug auf die Antikörperspiegel (T-Test, $p_{\text{GLURP}} = 0,125$, $p_{\text{MSP3}} = 0,991$) ein signifikanter Unterschied beobachtet werden;

Abbildung 10: Antikörperspiegel eingeteilt nach Moskitonetzbesitz und konstanter Nutzung während der letzten 30 Tage



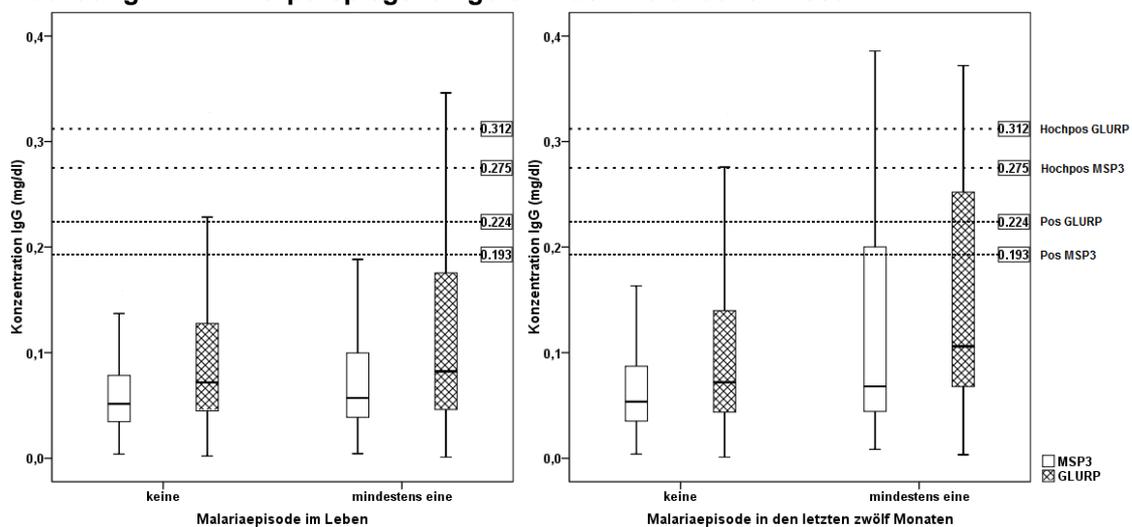
Stratifizierung nach Malariaanamnese

Zweihundertzweiundachzig der 475 Probanden (59,4%) gaben an, in ihrem Leben mindestens einmal Malaria gehabt zu haben. Fünfundachzig der 475 (17,9%) berichteten von einer Malariaepisode in den letzten zwölf Monaten vor dem Tag der Untersuchung. Verglichen mit den Teilnehmern, die angaben nie eine Malaria gehabt zu haben, zeigten diejenigen mit positiver Anamnese signifikant höhere IgG-Spiegel gegen MSP3 (T-Test, $p_{\text{MSP3}}=0,032$), jedoch nur andeutungsweise gegen GLURP (T-Test, $p_{\text{GLURP}}=0,062$). Auch die Anteile an Positiven waren unter denen mit Malariaanamnese höher (χ^2 -Test, $p_{\text{GLURP}}=0,039$; $p_{\text{MSP3}}=0,025$). Bei den Hochpositiven war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (χ^2 -Test, $p_{\text{GLURP}}=0,103$; $p_{\text{MSP3}}=0,102$).

Teilnehmer, die eine Episode in den vergangenen zwölf Monaten angaben waren im Durchschnitt etwas häufiger positiv (χ^2 -Test, $p_{\text{GLURP}}=0,002$; $p_{\text{MSP3}}<0,001$) und hochpositiv (χ^2 -Test, $p_{\text{GLURP}}=0,023$; $p_{\text{MSP3}}<0,001$) für beide Antikörper.

Ein signifikanter Einfluss auf die IgG-Spiegel konnte aber auch für diese Variable nur für MSP3 (T-Test, $p_{\text{MSP3}}=0,041$), nicht aber für GLURP (T-Test, $p_{\text{GLURP}}=0,075$) belegt werden.

Abbildung 11: Antikörperspiegel eingeteilt nach Malariaanamnese



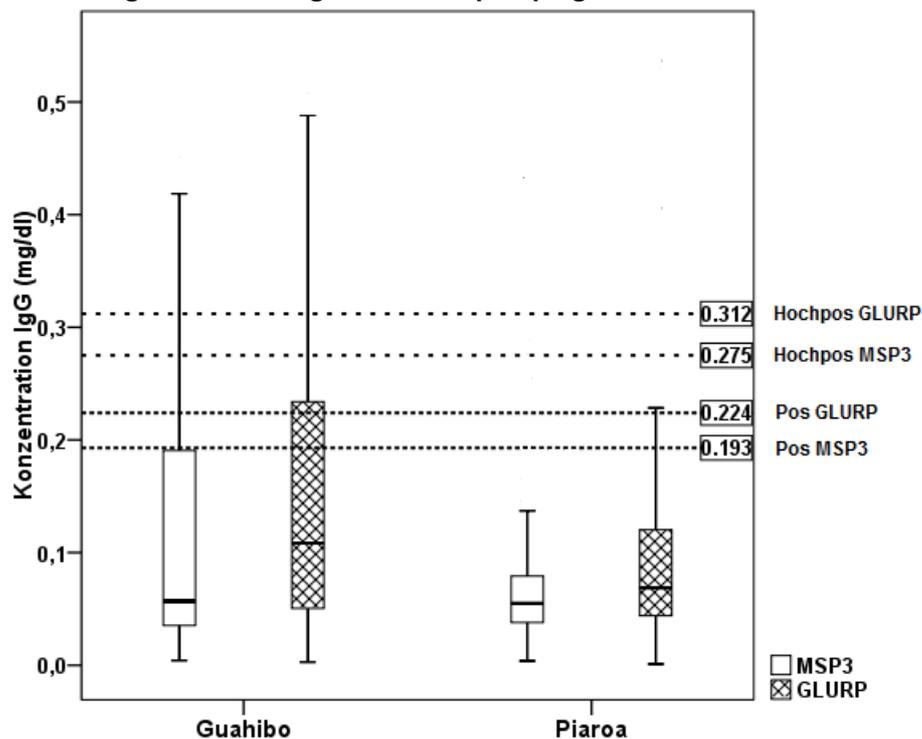
Stratifizierung nach ethnischer Zugehörigkeit

Im Vergleich mit den Teilnehmern aus der Piaroa-Ethnie zeigten Probanden, die der Guahibo-Ethnie angehörten, signifikant höhere Antikörperspiegel gegen beide Antigene und auch höhere Raten an Positiven (Tabelle 2, Abbildung 5).

Tabelle 3: Anteil der Positiven und der Hochpositiven nach Ethnie

		MSP3		GLURP	
		positiv	hochpositiv	positiv	hochpositiv
Guahibo (N=180)	Anzahl	44	31	54	33
	Prozent	24,4	17,2	30,0	18,3
Piaroa (N=295)	Anzahl	9	5	39	28
	Prozent	3,1	1,7	13,2	9,5
χ^2 -Test	(p)	<0,001	<0,001	<0,001	0,005

Abbildung 12: Verteilung der Antikörperspiegel nach Ethnie



4.6 Binäres logistisches und lineares Regressionsmodell

Die im Kapitel „Datenerfassung und Datenanalyse“ aufgeführten Parameter flossen in ein binäres logistisches und ein lineares Regressionsmodell ein, um prognostische Aussagen zu Positivität und Antikörperspiegeln von MSP3 und GLURP in der Studienpopulation treffen zu können.

Im binär logistischen Modell zeigten die Variablen Alter, Besitz eines Moskitonetzes und ethnische Herkunft signifikante Resultate:

Die Wahrscheinlichkeit einen positiven Antikörperspiegel gegen eines der Antigene aufzuweisen steigt mit dem Alter. Die Anzahl der Lebensjahre kann mit der OR als Faktor multipliziert werden und quantifiziert so den Risikoanstieg. Die OR liegt dabei für beide Antigene bei jeweils 1,03 (MSP3: KI: 1,018; 1,051, $p \leq 0,001$ und GLURP: KI: 1,020; 1,049, $p < 0,001$). Demzufolge ist also die statistische Wahrscheinlichkeit positiv für ein Antigen zu sein nach Abschluss eines Lebensjahres jeweils drei Prozent höher als im Vorjahr.

Verglichen mit den Piaroa hatten Angehörige der Guahibo-Ethnie ein 8,04-fach höheres Risiko (KI: 4,061; 15,898, $p < 0,001$) positive Anti-MSP3-Spiegel zu haben. Für GLURP war das Risiko 2,81-fach (KI: 1,677; 4,721, $p < 0,001$) höher.

Da Antikörperspiegel in der Regel keine Gauss'sche Normalverteilung zeigen wurde das Modell mit den dekadischen Logarithmen der gemessenen IgG-Spiegel berechnet. Die Ergebnisse wurden anschließend wieder exponenziert. Das Alter zeigte für jedes zusätzliche Lebensjahr einen signifikanten Einfluss. Der Trend weiblicher Probanden zu höheren IgG-Spiegeln erwies sich als nicht signifikant. Der Besitz eines Moskitonetzes zeigte für MSP3 keinen signifikanten Koeffizienten, wohl aber für GLURP. Die regelmäßige Nutzung desselben während der letzten 30 Tage zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss, genausowenig die eigenanamnestischen Angaben zu Malariaepisoden während des ganzen Lebens. Jedoch ließ sich für die Angaben zu Malaria in den vorangegangenen zwölf Monaten ein signifikanter Einfluss auf die Spiegel von Anti-MSP3-Antikörpern und ein gewisser Trend in Bezug auf Anti-GLURP ermitteln. Die Zugehörigkeit zu einer Ethnie zeigte signifikante Koeffizienten sowohl für MSP3 als auch für GLURP. Die einzelnen Resultate des linearen

Regressionsmodells mit kombinierbaren Regressionskoeffizienten β finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Lineares Regressionsmodell.

	MSP3				GLURP			
	β	95% KI für β		p	β	95% KI für β		p
		min	max			min	max	
Alter in Jahren	1,02	1,01	1,02	<0,001	1,01	1,00	1,01	0,019
Geschlecht	1,07	0,92	1,26	0,373	1,10	0,90	1,36	0,354
Besitz Moskitonetz	1,12	0,77	1,63	0,556	2,52	1,54	4,13	<0,001
Konstante Netznutzung	1,18	0,89	1,56	0,256	1,30	0,90	1,88	0,168
Malariaepisode (jemals)	1,10	0,92	1,32	0,309	0,99	0,78	1,26	0,947
Malariaepisode (12 m ¹)	1,37	1,08	1,73	0,009	1,34	0,98	1,82	0,066
Ethnie	1,31	1,10	1,54	0,002	1,26	1,01	1,57	0,041

5 Diskussion

Die in dieser Studie vorgestellten Resultate belegen, dass Teile der indigenen Bevölkerung im venezolanischen Amazonas Antikörper gegen die Untereinheiten eines *P. falciparum* Impfstoffkandidaten bilden. Es konnte damit gezeigt werden, dass im Amazonasgebiet, trotz der im Vergleich zu Afrika epidemiologisch sehr unterschiedlichen Situation, ein großer Teil der Einwohner eine robuste Antwort gegen MSP3 und GLURP durch natürliche Exposition entwickelt haben. Dabei zeigen die Ergebnisse - von der kleinen Gruppe der Hochpositiven abgesehen - eher niedrige Werte, vom durchschnittlich etwa doppelten Wert des Cut-Offs. Ob die nachgewiesenen Antikörper einen schützenden Effekt haben, kann mit dem vorliegenden Studiendesign einer Querschnittstudie nicht bestimmt werden. Durch die geringe Inzidenz wäre es sehr aufwendig die Assoziation mit Schutz vor Malaria gut zu schätzen und würde nur einen geringen Wissensgewinn bringen, da es eine Vielzahl von Studien aus anderen Regionen gibt. Eine Interventionsstudie mit GMZ2 im untersuchten Gebiet wäre sehr interessant, ist zur Zeit aber nicht in Planung. Dass Antikörper gegen Abschnitte des Impfantigens GMZ2 als natürlich erworbene IgGs vorkommen spricht dafür, dass eine Intervention mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in Atures (und damit außerhalb Afrikas) erfolgreich wäre.

Da Immunglobulin-Subklassen eine wichtige Rolle bei der Wirksamkeit der impfinduzierten Immunantwort spielen wäre es interessant natürlich erworbene und durch den Impfstoff hervorgerufene Immunantworten zu vergleichen [Metzger, 1999]. Denn die durch eine Impfung erzeugte Immunantwort kann in Hinsicht auf die Immunglobulin-Subklassen anders ausfallen als die durch natürliche Infektionen hervorgerufene Immunantwort [Metzger, 2003]. Ob, und wie stark die durch eine Impfung hervorgerufenen Antikörper schützend wirken, müsste in einer klinischen Impfstudie mit dem Endpunkt Krankheit gezeigt werden.

Zum Studienzeitpunkt wurde eine sehr niedrige Quote an Probanden mit Parasitämie (2/475, 0.4%) gefunden. Bei beiden Infektionen handelte es sich

um *P. vivax*, die in der Region am stärksten prävalente Spezies [Metzger, 2008/2011]). *P. falciparum* wurde zum Studienzeitpunkt in keinem der Probanden nachgewiesen. Dies spricht für einen geringen Erregerkontakt der untersuchten Population zum Studienzeitpunkt.

Die wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Studie sind 1) die relativ hohe Prävalenz von Antikörpern gegen hochkonservierte Anteile von MSP3 und GLURP bei vergleichsweise geringem Auftreten von *P. falciparum*-Malaria, und 2) die signifikant höhere Prävalenz der Antikörper bei der Guahibo-Ethnie im Vergleich zu Angehörigen der Piaroa-Ethnie.

Ethnie

Durch Nutzung des Malaria-Dokumentationssystems des Staates Amazonas wurde der Grad der Transmission in den untersuchten Dörfern in den der Studie vorausgehenden Monate und Jahre geschätzt. Da die Krankenstationen von Platanillal und Paria Grande bezüglich der Anzahl der jährlich untersuchten Blutaussstriche in etwa vergleichbar sind (z.B. 2009: Platanillal, 280 dicke Tropfen; Paria Grande, 269 dicke Tropfen), die zugehörigen Daten zu ethnischer Herkunft und Ort der Infektion dokumentiert und in der Datenbank mit abrufbar waren, und ein aktueller Bevölkerungszensus im Rahmen der Studie durch Anthropologen durchgeführt wurde, konnte für beide Dörfer die Malariaprävalenz im Allgemeinen und die von *P. falciparum* im Besonderen bestimmt werden.

Die durchschnittliche jährliche Inzidenz für Malaria insgesamt lag dabei für die Guahibo aus Platanillal mit ca. 18 Prozent über der Inzidenz bei den Piaroa in Paria Grande mit ca. 8 Prozent. Es handelte sich hauptsächlich um *P. vivax* – Fälle, während die Zahl der *P. falciparum*-Infektionen in beiden Gruppen erstaunlich niedrig war: Binnen sechseinhalb Jahren wurde in Platanillal nur bei 50 Guahibo und in Paria Grande bei 36 Piaroa eine Malaria tropica diagnostiziert, und die durchschnittliche jährliche Inzidenz einer *P. falciparum*-Malaria lag ohne signifikanten Unterschied bei beiden Gruppen unter zwei Prozent. Dennoch zeigten sich in der vorliegenden Studie eine höhere anti-MSP3 und -GLURP Reaktivität bei den Guahibo.

Dem Stamm der Piaroa gehören insgesamt rund 12,000 Personen an. Ihre soziale Organisation wird von Anthropologen als friedlich und ausgesprochen egalitär [Overing, 1989], teilweise gar als anarchistisch [Graeber, 2004] beschrieben. Ihre traditionelle Siedlungsweise war an agroforestale Subsistenzwirtschaft angepasst. Aufgrund ihres Pazifismus mussten die Dörfer zudem, um im Konfliktfall schneller fliehen zu können, sehr mobil sein. Sie lebten weit verstreut in Hütten in kleinen mobilen Gruppen mit etwa 50 Mitgliedern [Freire, 2003]. Heutzutage lebt die Mehrzahl der Piaroa, um besseren Zugang zu Märkten und (Gesundheits-) Dienstleistungen zu haben, in größeren Siedlungen, die in der Regel von der venezolanischen Regierung im Rahmen eines sozialen Wohnungsbauprogramms errichtet wurden, in der Peripherie ihrer angestammten Territorien, welche nach wie vor für Landbau und Jagd genutzt werden [Freire, 2003]. Der Teilnahme an der Studie gegenüber herrschte große Aufgeschlossenheit, und ein hoher Grad an dörflicher Organisation war erkennbar.

Die ca. 30,000 Stammesangehörigen der Guahibo siedeln in erster Linie in der Gegend um Puerto Ayacucho inklusive der angrenzenden kolumbianischen Gebiete. Ursprünglich ein Nomadenvolk von Wildbeutern – Jägern und Sammlern -, stammt diese Ethnie aus den sogenannten *Llanos*, einem weitläufigen, von ihrem heutigen Siedlungsgebiet nordwestlich gelegenen Flachland, aus dem sie in lang andauernden gewaltsamen Konflikten durch Siedler vertrieben wurden [Romero Moreno, 2000]. Die Kernfamilie spielt in ihrem patriarchalen Gesellschaftssystem eine zentrale Rolle [Morey, 1983]. Derzeit wohnen auch sie mehrheitlich sesshaft in Dörfern, die aus Projekten des sozialen Wohnungsbaus entstanden. Dort leben sie, wenngleich heute in Bezug auf Sprache und Kleidung zu großen Teilen assimiliert, in besonderem Maße von Armut und Verelendung bedroht [Boglar, 1982]. In ihren Gemeinschaften fiel die Rekrutierung von vor allem, aber nicht ausschließlich, männlichen Probanden weit schwerer. Neben allgemeinem Desinteresse wurde auch immer wieder die nur selten entkräftbare Sorge geäußert, durch die Blutentnahme „Kraft“ zu verlieren. Einige Personen wären nach eigenem Bekunden gegen monetäre Entlohnung zur Teilnahme bereit gewesen, zogen

sich jedoch zurück, als sie erfuhren dass dies nicht möglich ist. Es musste also mit einem - vor allem zu Lasten der Männer über 14 Jahren - kleineren Probandenkontingent aus dieser Ethnie vorliebgenommen werden. Dies könnte gerade beim Vergleich nach ethnischer Zugehörigkeit durch unterschiedliche Gruppenstruktur Verzerrungen hervorrufen. In den Regressionsmodellen werden jedoch Interkorrelationen, das heißt eventuelle Abhängigkeiten der einzelnen Variablen voneinander, mitberücksichtigt.

Die serologischen Resultate der vorliegenden Studie bestätigen vorhergehende Untersuchungen, in denen sich für diese Region ebenfalls ein erhöhtes Malariarisiko für Guahibo abzeichnete [Metzger, 2009 ; Sojo-Milano, 2009]. Verschiedene Formen der Immunantwort, mit anderen Mustern bezüglich Schutz und Abwehr, sind bei genetisch unterschiedlichen Populationen denkbar [Greenwood, 1987; Arama, 2011], doch auch die Wohnsituation, sozioökonomische Faktoren, die konsequente Einnahme der Malariamedikamente, das Vertrauen ins Gesundheitssystem und kulturelle Eigenarten können die unterschiedlichen Transmissionsraten in den zwei untersuchten Ethnien weitgehend erklären. An in diese Richtung deutenden Daten fanden sich zum Beispiel eine deutlich niedrigere Rate von Moskitonetzbesitzern bei den Guahibo, obwohl die Netze von Zeit zu Zeit in der gesamten Region gratis verteilt wurden. Auch die Quote derer, die ihr Netz konstant nutzen, war bei den Piaroa höher, was ebenfalls für eine erfolgreichere Vermittlung beziehungsweise Annahme von Präventionsmaßnahmen spricht. Künftige Forschung zur Malariatransmission im venezolanischen Amazonas sollte sich multidisziplinär und in Zusammenarbeit mit Anthropologen und den ansässigen Ethnien auf diese Punkte konzentrieren.

Alter und Netze

Die in der Studie nachgewiesene positive Korrelation der Antikörperspiegel mit dem Alter und ebenso die mit den Lebensjahren ansteigende Immunglobulin-Prävalenz ist ein bereits lange bekannter Effekt [Marsh, 1988]. Wenn Menschen in einem Malariaendemiegebiet leben, steigt mit der Zeit die Wahrscheinlichkeit eines Antigenkontaktes und infolgedessen auch die Rate der

Antikörperpositiven sowie die Antikörperspiegel. Umgekehrt sinken die Kontaktchancen bei Nutzung von Moskitonetzen; je mehr Zeit unter dem Netz verbracht wird umso geringer die Chance auf Erregerkontakt und damit immunologische Reaktion auf diesen.

Wie auch in anderen Studien [Metzger, 1998] konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass bei regelmäßigem Gebrauch von Moskitonetzen Malariaprävalenz und Antikörperspiegel sinken. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei der angewandten Definition für „regelmäßige Nutzung“ auch Nutzer, die nur gelegentlich in den 30 Nächten vor der Befragung unter einem Netz geschlafen haben, miteinbezogen worden sind. In diese Kategorie fällt also möglicherweise ein sehr heterogenes Probandenkontingent. „Kein Netz“ zu haben dagegen bedeutet die gänzliche Abwesenheit von jeglichem nächtlichem Schutz. Dies könnte die Erklärung sein warum bei „regelmäßiger Nutzung“ weniger signifikante Unterschiede zu Tage traten als bei „Besitz eines Moskitonetzes“. Warum jedoch die Unterschiede der Ergebnisse für GLURP signifikant sind, während sich für MSP3 ein Zusammenhang nicht einmal andeutet (T-test, $p_{\text{GLURP}}=0.00$ versus $p_{\text{MSP3}}=0.489$) bleibt unklar. Jedoch zeigte sich auch bei einer GMZ2-Impfstudie [Mordmüller 2010] ein geringerer Anstieg der IgG-Titer gegen MSP3. Naheliegende Erklärungen wären eine stärkere Antigenität von GLURP, eine längere Halbwertszeit der Anti-GLURP-Antikörper oder eine Kreuzreaktion der Antikörper gegen GLURP mit nicht von *P. falciparum* stammenden Epitopen.

Hohe Rate an positiven Proben

Die vorliegende Querschnittsstudie diente der Evaluierung der Immunantworten gegen zwei in der asexuellen Phase von *P. falciparum* auftretende Antigene, die auf der Basis anderer Studien, die unter stark veränderten Rahmenbedingungen durchgeführt wurden, als vielversprechende Impfkandidaten gelten. Die Probengewinnung fand außerhalb der Malariasaison statt, um gewährleisten zu können, dass der Kontakt mit *P. falciparum* minimal ist und die Basistiter gemessen werden können. Tatsächlich konnte eine

Parasitämie mit *Plasmodium spp.* nur bei zwei von fast 500 Studienteilnehmern nachgewiesen werden (2/475; 0,4%), wobei es sich in beiden Fällen um *P. vivax* handelte. Dennoch hatte fast ein Viertel (23,4%) der Probanden positive Antikörperspiegel gegen zumindest eines der beiden getesteten *P. falciparum* Antigene.

Um den Abwehrstatus gegen einen Erreger wie Malaria zu erfassen, auf den die Immunantwort hochkomplex ist, genügt das Aufsummieren der Immunantworten auf einzelne Antigene nicht und es ist sehr schwierig ohne kontrollierte Studien, Antigene zu identifizieren die Schutz induzieren können. Interessanterweise waren 7,6 Prozent der Probanden hochpositiv für MSP3 und 12,8 Prozent für GLURP. Bei der geringen *P. falciparum* Inzidenz in der Region ist der Anteil der stark positiven Individuen überraschend hoch. *P. vivax* exprimiert keine MSP3- oder GLURP-orthologen Proteine.

Es muss deshalb festgestellt werden, dass bei einer jährlichen Inzidenz von 68,4 Fällen pro 1000 Einwohner, wovon lediglich rund 16 Prozent auf Infektionen mit *P. falciparum* zurückzuführen sind, also statistisch etwa ein Prozent der Bevölkerung jedes Jahr an Malaria tropica erkrankt, die Raten an Antikörper-Hochpositiven -mit insgesamt 16,4 Prozent für zumindest eines der beiden Antigene hoch sind.

Eine mit den Daten dieser Studie weder veri- noch falsifizierbare Hypothese wäre die polyklonale Aktivierung von Effektor-T- und Memory-B-Zellen gegen *P. falciparum*-Antigene durch *P. vivax* [Chuangchaiya, 2010] oder andere Parasiten [Mutapi, 2007].

In der Literatur belegte, aber noch wenig erforschte Einflussfaktoren auf die Antikörpertiter gegen Malariaantigene könnten auch Medikamente sein. Zum Beispiel kann bei nachgewiesener Kreuzreaktivitaet von Malaria- und *Schistosoma*-Antigenen die Therapie der Bilharziose mit Praziquantel auch eine Änderung der Antikörpertiter gegen Malariaantigene bewirken [Mutapi, 2007]. Da Schistosomiasis in unserem Studiengebiet nicht vorkommt, kann diese Möglichkeit in unserer Studie mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Wenngleich sich die Antikörper gegen MSP3 und GLURP nach Impfung ohne Boosterung im Blut nur für zirka zwölf Monate nachweisen lassen [Esen, 2009] sollte man auch nicht vergessen, dass höhere Antikörperspiegel eventuell auch länger persistieren könnten wenn sie durch natürliche Exposition erworben wurden.

Alle vorgenannten Hypothesen können jedoch kaum den Umstand erklären, dass sich sogar in der Gruppe, derer die anamnestisch nie in ihrem Leben an Malaria litten (193/475) eine Positivenrate von 17,6 Prozent fand. Besonders wichtig erscheinen daher Infektionen unter dem Detektionslevel, das heißt Infektionen, die unter der mikroskopischen Nachweisschwelle liegen [Harris, 2010], und asymptomatische bzw. subklinische Infektionen, bei denen erst gar keine Diagnostik stattfindet. So fanden in der Studienregion auch schon weitere Studien statt, in denen ein großer Prozentsatz asymptomatische Träger nachgewiesen werden konnten [Rodríguez, 2010]. Doch ohne sensitivere Diagnostikwerkzeuge zur Senkung der Nachweisschwelle und breit angelegte Reihenuntersuchungen zum Aufspüren asymptomatischer Verläufe, lässt sich der Anteil dieser Faktoren nicht methodisch sauber quantifizieren. Dies wäre jedoch hochinteressant, auch um zu ermitteln welche Variablen einen immunologisch kontrollierten Infektionsverlauf begünstigen. Neben der Möglichkeit von sehr früh behandelten oder kontrollierten Infektionen ist es auch denkbar, dass Malariaepisoden unter einer anderen Diagnose, wie z.B. Grippe, mitbehandelt wurden (entweder durch oft verschriebene „Anti-Infektionscocktails“ oder die Gabe von Antibiotika mit Wirkung gegen Plasmodien). Die rein klinische Diagnose einer Malaria ist insuffizient und Bedarf unbedingt der Überprüfung durch einen Parasitennachweis [Tangpukdee, 2009].

Interessant scheint in diesem Zusammenhang auch, dass die Rate an Infektionen mit mehreren verschiedenen Plasmodienspezies in Amazonas sehr niedrig ist [Metzger, 2009]. Wenn ein Teil der Ko-Infektionen mit *P. falciparum* dem Untersucher vor Ort schlicht unbemerkt bleibt, könnte dies zumindest teilweise den hohen Anteil an Antikörperpositiven erklären. Auch in dem im Rahmen dieser Studie aufgearbeiteten Dokumentationssystem war für die

untersuchten Siedlungen in den vergangenen Jahren keine einzige Infektion mit mehreren Spezies verzeichnet.

Die niedrige Letalitätsrate und die niedrige Prävalenz an *P. falciparum* bestätigen, dass Atures als ein Gebiet mit kontrollierter Malaria, angesehen werden kann. Auch wenn eventuell die Verwendung anderer, zum Beispiel präerythrozytärer *P. falciparum* Antigene punktuell zu etwas anderen Ergebnissen geführt hätte, würden die die Gesamtrichtung der Resultate wahrscheinlich dieselbe bleiben. Dies bedeutet, dass die Infektionsraten über einen längeren Zeitraum auf niedrigem Niveau stabil sind.

Kontrollierte Malaria ist das Resultat des Zusammenspiels vom Abwehrsystem des Wirts, den Maßnahmen der öffentlichen Gesundheitsfürsorge, Umweltbedingungen, auch kulturell geprägten Verhaltensmustern und der Epidemiologie und Infektionsbiologie der Parasiten. Eingriffe in dieses System sollten nur mit Vorsicht vorgenommen werden, um ein eventuell bestehendes Gleichgewicht nicht zu zerstören. Daher wären weitere Querschnittsstudien nach richtungsweisenden Änderungen im Gesundheitssektor des Bezirks in jedem Fall empfehlenswert. Sowohl die Epidemiologie als auch die Immunologie in Gebieten mit kontrollierter Malaria könnten bald Gegenstand wachsenden Interesses von Malariologen und Entscheidungsträgern werden, da das in Niedrig-Endemiegebieten erlangte Wissen wegweisend für das weitere Vorgehen in Hoch-Endemiegebieten nach gelungenen Kontroll- und Eradikationsversuchen sein könnte.

6 Zusammenfassung

Ziel der Studie war zum einen der Nachweis, dass auch außerhalb Afrikas natürlich erworbene Antikörper gegen die Untereinheiten des vielversprechenden *P.falciparum*-Impfkandidaten GMZ2 vorkommen. Auf lokaler Ebene sollte für den Bezirk Atures im venezolanischen Bundesstaat Amazonas zudem geklärt werden ob Zugehörigkeit zu bestimmten Populationssubgruppen die Häufigkeit und Intensität des Auftretens dieser Antikörper beeinflusst.

Hierzu wurden an 475 Probanden aus zwei Ethnien und drei Dörfern Interviews, körperliche Untersuchungen und Blutentnahmen durchgeführt sowie ein lokales Malariaregister ausgewertet. Die Blutproben wurden mittels quantitativem ELISA auf das Vorkommen von IgG-Antikörpern gegen die GMZ2-Untereinheiten MSP-3 und GLURP getestet.

Bei allgemein niedriger Malariaprävalenz (2/475) und insbesondere geringem Auftreten von Infektionen mit *P. falciparum* (0/475) ließen sich bei fast einem Viertel der Probanden positive Antikörperspiegel gegen eines der beiden Antigene belegen. Es konnten mehrere die Prävalenz der Antikörper gegen MSP-3 und GLURP im lokalen Setting signifikant beeinflussende Faktoren identifiziert werden.

Diese scheinen, vom Probandenalter abgesehen, zumindest soziokulturell mitbedingt, was gezielte edukative Interventionen in bestimmten Populationssubgruppen erfolgversprechend scheinen lässt.

Die insgesamt hohe Rate an Antikörperpositiven lässt sich am ehesten durch subklinische oder submikroskopische Infektionen erklären. Bei erstmaligem Nachweis von natürlich erworbenen Antikörpern gegen die Untereinheiten von GMZ2 außerhalb Afrikas erscheint eine etwaige Erprobung des Impfkandidaten auch in der Studienregion erfolgversprechend.

7 Bild und Tabellenverzeichnis

7.1 Bilder und Graphiken

Abbildung 1: Studienregion, weltweite Malariaverteilung, angelehnt an Sven Jähnichen, 2005 http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Malaria_distribution_%28de%29.png&filetimestamp=20051125174203 (Stand 15.01.2014).....	13
Abbildung 2: Herstellung rekombinanter Proteine (selbst erstellt mit Microsoft Paint).	18
Abbildung 3: Präsenz der Antigene im <i>P.falciparum</i> Vermehrungszyklus, angelehnt an, http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Plasmodium_zyklus.png&filetimestamp=20091119081538 (Stand 15.01.2014)	18
Abbildung 4: Schematische Abbildung des Antikörper-ELISA (selbst erstellt mit Microsoft Paint)	22
Abbildung 5: Detektierte Malariafälle 2003-2008 in Platanillal und Paria Grande	25
Abbildung 6: Detektierte Malariafälle Januar bis Mai 2009 in Platanillal und Paria Grande.....	26
Abbildung 7: Verteilung der Antikörperspiegel bei MSP3 und GLURP	28
Abbildung 8: Darstellung der Verteilung der Antikörperspiegel nach Altersgruppen, mit Cut-Off-Werten.....	29
Abbildung 9: Verteilung der (Hoch-) Positiven nach Geschlecht.....	30

Abbildung 10: Antikörperspiegel eingeteilt nach Moskitonetzbesitz und konstanter Nutzung während der letzten 30 Tage..... 31

Abbildung 11: Antikörperspiegel eingeteilt nach Malariaanamnese..... 32

Abbildung 12: Verteilung der Antikörperspiegel nach Ethnie..... 33

7.1 Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Ragenzien 21

Tabelle 2: Probanden und Interviewergebnisse 24

Tabelle 3: Anteil der Positiven und der Hochpositiven nach Ethnie..... 33

Tabelle 4: Lineares Regressionsmodell. 35

8 Literaturverzeichnis

- Anderson, T. J.; Haubold, B.; Williams, J. T.; Estrada-Franco, J. G.; Richardson, L.; Mollinedo, R. et al. (2000): Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Mol Biol Evol* 17 (10), S. 1467–1482.
- Arama, Charles; Giusti, Pablo; Boström, Stéphanie; Dara, Victor; Traore, Boubacar; Dolo, Amagana et al. (2011): Interethnic Differences in Antigen-Presenting Cell Activation and TLR Responses in Malian Children during *Plasmodium falciparum* Malaria. In: *PLoS ONE* 6 (3), S. e18319.
- Audran, Regine; Cachat, Michel; Lurati, Floriana; Soe, Soe; Leroy, Odile; Corradin, Giampietro et al. (2005): Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. In: *Infect Immun* 73 (12), S. 8017–8026.
- Auterhoff, H. (1968): Nobel Lectures Physiology or Medicine 1901–1921. XVI, 5615. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York 1967.. In: *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 301 (4), S. 310.
- Barry, Alyssa E.; Schultz, Lee; Buckee, Caroline O.; Reeder, John C.; Rénia, Laurent (2009): Contrasting Population Structures of the Genes Encoding Ten Leading Vaccine-Candidate Antigens of the Human Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*. In: *PLoS ONE* 4 (12), S. e8497.
- Baumann, Andreas; Magris, Magda M.; Urbaez, Marie-Luz; Vivas-Martinez, Sarai; Durán, Rommy; Nieves, Tahidid et al. (2012): Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan Amazon. In: *Malar J* 11 (1), 46.
- Boglár, Lajos; Weissling, Heinrich (1982): Wahari. Eine südamerikanische Urwaldkultur. 1. Aufl. Hanau/Main: Müller & Kiepenheuer.
- Borre, M. B.; Dziegiel, M.; Hogh, B.; Petersen, E.; Rieneck, K.; Riley, E. et al. (1991): Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. In: *Mol Biochem Parasitol* 49 (1), S. 119–131.
- Bousema, Teun; Youssef, Randa M.; Cook, Jackie; Cox, Jonathan; Alegana, Victor A.; Amran, Jamal et al. (2010): Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. In: *Emerg Infect Dis* 16 (3), S. 392–399.
- Capanna, Ernesto (2006): Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? In: *Int. Microbiol.* 9 (1), S. 69–74.
- Carvalho, L. J. M.; Oliveira, S. G.; Theisen, M.; Alves, F. A.; Andrade, M. C. R.; Zanini, G. M. et al. (2004): Immunization of Saimiri sciureus monkeys with *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels. In: *Scand J Immunol* 59 (4), S. 363–372.

CDC - Centers for disease control and Prevention (2004): History: Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites | CDC Malaria. Online verfügbar unter

<http://web.archive.org/web/20070602185153/http://www.cdc.gov/malaria/history/ross.htm>, zuletzt geprüft am 15.01.2014.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2010): CDC - Malaria - About Malaria - Biology - Mosquitoes - Anopheles Mosquitoes. Hg. v. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>, zuletzt geprüft am 15.01.2014.

Chuangchaiya, S.; Jangpatarapongsa, K.; Chootong, P.; Sirichaisinthop, J.; Sattabongkot, J.; Pattanapanyasat, K. et al. (2010): Immune response to *Plasmodium vivax* has a potential to reduce malaria severity. In: *Clin Exp Immunol* 160 (2), S. 233–239.

Contreras, Carmen E.; Cortese, Joseph F.; Caraballo, Alejandro; Plowe, Christopher V. (2002): Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolivar. In: *Am J Trop Med Hyg* 67 (4), S. 400–405.

Courtin, David; Oesterholt, Mayke; Huisman, Harm; Kusi, Kwadwo; Milet, Jacqueline; Badaut, Cyril et al. (2009): The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. In: *PLoS ONE* 4 (10), S. e7590.

Dodoo, Daniel; Theisen, Michael; Kurtzhals, Jørgen A. L.; Akanmori, Bartholomew D.; Koram, Kwadwo A.; Jepsen, Søren et al. (2000): Naturally Acquired Antibodies to the Glutamate-Rich Protein Are Associated with Protection against *Plasmodium falciparum* Malaria. In: *J INFECT DIS* 181 (3), S. 1202–1205.

Esen, Meral; Kremsner, Peter G.; Schleucher, Regina; Gässler, Michael; Imoukhuede, Egeruan Babatunde; Imbault, Nathalie et al. (2009): Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. In: *Vaccine* 27 (49), S. 6862–6868.

Fischer-Elfert, Hans-Werner (2005): Papyrus Ebers und die antike Heilkunde. Akten der Tagung vom 15.-16. 3. 2002 in der Albertina/UB der Universität Leipzig. Wiesbaden: Harrassowitz.

Flores, Walter; Chang, Jaime; Barillas, Edgar (2011): Rapid assessment of the performance of malaria control strategies implemented by countries in the Amazon subregion using adequacy criteria: case study. In: *Malar J* 10 (1), S. 379.

Fowkes, Freya J. I.; Richards, Jack S.; Simpson, Julie A.; Beeson, James G.; Bejon, Philip Andrew (2010): The Relationship between Anti-merozoite Antibodies and Incidence of *Plasmodium falciparum* Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *PLoS Med* 7 (1), S. e1000218.

Frank, Werner; Lieder, Johannes (1986): Taschenatlas der Parasitologie. Für Humanmediziner, Veterinärmediziner und Biologen. Stuttgart: Franckh (Kosmos-Taschenatlas).

Freire, Germ-n (2003): Tradition, Change and Land Rights: Land Use and Territorial Strategies among the Piaroa. In: *crit anthropol* 23 (4), S. 349–372.

Graeber, David (2004): Fragments of an anarchist anthropology. Chicago: Prickly Paradigm Press; Distributed by University of Chicago Press.

Greenwood, B. M.; Groenendaal, F.; Bradley, A. K.; Greenwood, A. M.; Shenton, F.; Tulloch, S.; Hayes, R. (1987): Ethnic differences in the prevalence of splenomegaly and malaria in The Gambia. In: *Ann Trop Med Parasitol* 81 (4), S. 345–354.

Grenfell, P.; Fanello, C. I.; Magris, M.; Goncalves, J.; Metzger, W. G.; Vivas-Martinez, S. et al. (2008): Anaemia and malaria in Yanomami communities with differing access to healthcare. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102 (7), S. 645–652.

Harris, Ivor; Sharrock, Wesley W.; Bain, Lisa M.; Gray, Karen-Ann; Bobogare, Albino; Boaz, Leonard et al. (2010): A large proportion of asymptomatic Plasmodium infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. In: *Malar J* 9 (1), S. 254.

Kilian, A. H. D.; Metzger, W. G.; Mutschelknauss, E. J.; Kabagambe, G.; Langi, P.; Korte, R.; Sonnenburg, F. (2000): Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. In: *Trop Med Int Health* 5 (1), S. 3–8.

Kruger, A.; Rech, A.; Su, X. Z.; Tannich, E. (2001): Two cases of autochthonous Plasmodium falciparum malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous Anopheles plumbeus. In: *Trop Med Int Health* 6 (12), S. 983–985.

Lequin, R. M. (2005): Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Clinical Chemistry* 51 (12), S. 2415–2418.

Lindner, Scott E.; Miller, Jessica L.; Kappe, Stefan H. I. (2012): Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. In: *Cell Microbiol* 14 (3), S. 316–324.

López, Carolina; Saravia, Carolina; Gomez, Andromeda; Hoebeke, Johan; Patarroyo, Manuel A. (2010): Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. In: *Gene* 467 (1-2), S. 1–12.

Löscher, Thomas; Burchard, Gerd D. (2008): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Das Referenzwerk für Tropen- und Reisemedizin - mit Curriculum Reisemedizin. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Lucius, Richard; Loos-Frank, Brigitte (1997): Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Magris, Magda; Rubio-Palis, Yasmin; Menares, Cristobal; Villegas, Leopoldo (2007): Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. In: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (3), S. 303–311.
- Marsh, K.; Hayes, R. H.; Carson, D. C.; Otoo, L.; Shenton, F.; Byass, P. et al. (1988): Anti-sporozoite antibodies and immunity to malaria in a rural Gambian population. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82 (4), S. 532–537.
- McColl, D. J.; Anders, R. F. (1997): Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 (MSP-3). In: *Mol Biochem Parasitol* 90 (1), S. 21–31.
- Mehlhorn, Heinz; Piekarski, Gerhard (2002): Grundriss der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum.
- Metzger, W. G.; Haywood, M.; D'Alessandro, U.; Drakeley, C. J.; Weiss, H.; Bojang, K. et al. (1999): Serological responses of Gambian children to immunization with the malaria vaccine SPf66. In: *Parasite Immunol* 21 (7), S. 335–340.
- Metzger, W. G.; Maxwell, C. A.; Curtis, C. F. (1998): Anti-sporozoite immunity and impregnated bednets in Tanzanian villages. In: *Ann Trop Med Parasitol* 92 (6), S. 727–729.
- Metzger, W. G.; Vivas-Martínez, S.; Rodriguez, I.; Gonçalves, J.; Bongard, E.; Fanello, C. I. et al. (2008): Malaria diagnosis under field conditions in the Venezuelan Amazon. In: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102 (1), S. 20–24.
- Metzger, Wolfram G.; Giron, Anibal M.; Vivas-Martínez, Sarai; González, Julio; Charrasco, Antonio J.; Mordmüller, Benjamin G.; Magris, Magda (2009): A rapid malaria appraisal in the Venezuelan Amazon. In: *Malar J* 8 (1), S. 291.
- Metzger, Wolfram G.; Okenu, Daniel M. N.; Cavanagh, David R.; Robinson, Jane V.; Bojang, Kalifa A.; Weiss, Helen A. et al. (2003): Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. In: *Parasite Immunol* 25 (6), S. 307–312.
- Mordmüller, Benjamin; Szywon, Katja; Greutelaers, Benedikt; Esen, Meral; Mewono, Ludovic; Treut, Carolin et al. (2010): Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambarene, Gabon. In: *Vaccine* 28 (41), S. 6698–6703.
- Mordmüller, Benjamin (2010): New medicines for malaria. In: *Wien. Klin. Wochenschr.* 122 Suppl 1, S. 19–22.
- Morey, Robert V.; Metzger, Donald J. (1974): The Guahibo: People of the Savanna. Wien: Inst. f. Völkerkunde (Acta ethnologica et linguistica. Series Americana. 7, 31).
- Murray, Christopher J. L.; Rosenfeld, Lisa C.; Lim, Stephen S.; Andrews, Kathryn G.; Foreman, Kyle J.; Haring, Diana et al. (2012): Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. In: *The Lancet* 379 (9814), S. 413–431.

Mutabingwa, T. K. (2005): Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! In: *Acta Trop* 95 (3), S. 305–315.

Mutapi, F.; Roussilhon, C.; Mduluzza, T.; Druilhe, P. (2007): Anti-malaria humoral responses in children exposed to *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*. In: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (3), S. 405–409.

Nerlich, Andreas G. (2008): *Plasmodium falciparum* in Ancient Egypt. In: *Emerg. Infect. Dis.* 14 (8), S. 1317–1319.

Oaks Jr., Stanley C.; Mitchell, Violaine S.; Pearson, Greg W.; Carpenter, Charles C.J (Hg.) (1991): *Malaria. Obstacles and opportunities*. Washington, D.C: National Academies Press.

Oeuvray, C.; Theisen, M.; Rogier, C.; Trape, J.-F; Jepsen, S.; Druilhe, P. (2000): Cytophilic Immunoglobulin Responses to *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein Are Correlated with Protection against Clinical Malaria in Dielmo, Senegal. In: *Infection and Immunity* 68 (5), S. 2617–2620.

Overing, Joanna (1989): The aesthetics of production: The sense of community among the Cubeo and Piaroa. In: *Dialect Anthropol* 14 (3).

Pain, A.; Böhme, U.; Berry, A. E.; Mungall, K.; Finn, R. D.; Jackson, A. P. et al. (2008): The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. In: *Nature* 455 (7214), S. 799–803.

RKI, Robert Koch Institut (2012): RKI - Infektionskrankheiten A-Z - Malaria. RKI-Ratgeber für Ärzte. RKI. Online verfügbar unter http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html?nn=2386228#doc2392924bodyText1, zuletzt geprüft am 15.01.2014.

Rodríguez I, Abreu N. Carrasquel A. Bolívar J. González M. Scorza JV Pérez H. de (2010): Infecciones maláricas en individuos asintomáticos en la población indígena Jivi, Amazonas, Venezuela. In: *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* (50), S. 197–205.

Roll Back Malaria Partnership (2013): Roll Back Malaria Partnership Mandate. Roll Back Malaria Partnership. Online verfügbar unter <http://www.rollbackmalaria.org/rbmmandate.html>, zuletzt geprüft am 15.01.2014.

Romero Moreno, María Eugenia; Castro Agudelo, Luz Marina; Aguablanca, Esperanza (2000): *Geografía humana de Colombia III. Región de la Orinoquia*. 1. Aufl. Santafé de Bogotá: Instituto Colombiano de Cultura Hispánica.

Smith, David L.; Klein, Eili Y.; McKenzie, F. Ellis; Laxminarayan, Ramanan (2010): Prospective strategies to delay the evolution of anti-malarial drug resistance: weighing the uncertainty. In: *Malar J* 9 (1), S. 217.

Soe, S.; Theisen, M.; Roussilhon, C.; Aye, K.-S; Druilhe, P. (2004): Association between Protection against Clinical Malaria and Antibodies to Merozoite Surface Antigens in an Area of Hyperendemicity in Myanmar: Complementarity between Responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-Kilodalton Glutamate-Rich Protein. In: *Infection and Immunity* 72 (1), S. 247–252.

- Soe, Soe; Theisen, Michael; Roussilhon, Christian; Aye, Khin-Saw; Druilhe, Pierre (2004): Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. In: *Infect Immun* 72 (1), S. 247–252.
- Sojo-Milano M, Grande-Montalvo T. (2009): Epidemiología de casos repetidores de Malaria en Amazonas, Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. In: *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* (49), S. 73–89.
- T Shwe, M. LwinS Aung (1998): Influence of blister packaging on the efficacy of artesunate mefloquine over artesunate alone in community-based treatment of non-severe falciparum malaria in Myanmar. In: *Bulletin of the World Health Organization* 76 1, S. 35–41.
- Tangpukdee, Noppadon; Duangdee, Chatnapa; Wilairatana, Polrat; Krudsood, Srivicha (2009): Malaria Diagnosis: A Brief Review. In: *Korean J Parasitol* 47 (2), S. 93.
- Theisen, M.; Doodoo, D.; Toure-Balde, A.; Soe, S.; Corradin, G.; Koram, K. K. et al. (2001): Selection of Glutamate-Rich Protein Long Synthetic Peptides for Vaccine Development: Antigenicity and Relationship with Clinical Protection and Immunogenicity. In: *Infection and Immunity* 69 (9), S. 5223–5229.
- Theisen, M.; Soe, S.; Oeuvray, C.; Thomas, A. W.; Vuust, J.; Danielsen, S. et al. (1998): The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. In: *Infect Immun* 66 (1), S. 11–17.
- Theisen, M.; Vuust, J.; Gottschau, A.; Jepsen, S.; Høgh, B. (1995): Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. In: *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2 (1), S. 30–34.
- WHO, World Health Organization (2011): WHO | The top 10 causes of death. World Health Organization (Factsheet 310). Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>, zuletzt geprüft am 15.01.2014.
- Yah, Clarence Suh; Fatumo, Segun (2010): In silico studies of multi drug resistance (MDR) genetic markers of *Plasmodium* species. In: *Journal of Computational Biology and Bioinformatics Research* (Vol. 2 (1)), S. 5–9. Online verfügbar unter <http://www.academicjournals.org/JCBBR/>.
- Yalcindag, Erhan; Elguero, Eric; Arnathau, Céline; Durand, Patrick; Akiana, Jean; Anderson, Timothy J. et al. (2012): Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2), S. 511–516.

9 Veröffentlichung

Diese Dissertation war Grundlage einer Veröffentlichung:

Baumann, Andreas; Magris, Magda M.; Urbaez, Marie-Luz; Vivas-Martinez, Sarai; Durán, Rommy; Nieves, Tahidid; Mordmüller, Benjamin G; Theisen, Michael; Avilan Luisana; Metzger, Wolfram G.

Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan Amazon.

Malaria Journal (2012), Band 11 (1), 46.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Der Autor dieser Dissertation und der daraus hervorgegangenen Publikation arbeitete das ELISA-Protokoll unter den in Venezuela gegebenen Laborbedingungen aus. Er war wesentlich an der Planung und Durchführung der Querschnittstudie im Feld beteiligt und führte sämtliche Laborarbeiten zur Bestimmung der Antikörperspiegel sowie die statistische Auswertung der Resultate selbst aus.

11 Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum vom Frühjahr 2009 bis Spätsommer 2012 am Institut für Tropenmedizin, Medizinische Klinik, Innere Medizin VII des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Direktor Professor Dr. P. G. Kremsner, und im SACAICET (Servicio Autónomo, Centro Amazónico para la Investigación y Control der Enfermedades Tropicales.) in Puerto Ayacucho, Amazonas, Venezuela unter der Leitung der Direktorin América Perdomo. Dies wäre ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich im Nachfolgenden herzlich bedanken möchte:

Herr Professor Dr. Peter G. Kremsner erklärte sich freundlicherweise bereit, als Berichterstatter für die vorliegende Arbeit zu fungieren, ihm gebührt mein ganz besonderer Dank.

Herr Dr. Michael Theisen und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Kopenhagen stellten die verwendeten Antigene zur Verfügung, wofür ich mich sehr bedanken möchte.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem „Betreuerstab“, also zunächst einmal Herrn Dr. Wolfram G. Metzger, der mir die Möglichkeit bot diese Arbeit durchzuführen. Seine Begeisterung und sein Enthusiasmus haben mich immer wieder aufs Neue motiviert und ohne seine wertvollen Hinweise und Anregungen wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Danke dir, Wolfram.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Magda Magris, die „ihrem kleinen Austauschdeutschen“ mit Rat und Tat nicht nur wissenschaftlich sondern auch für alle Alltagsorgen wie Visaverlängerung etc. unermüdlich zur Seite stand und mit ihrem Wissen, ihrer Hilfe und Kritik maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ihrer Abteilung für Malarialogie und insbesondere der Licenciada Marie-Luz Urbaz danke ich für das nette Arbeitsklima, die vielen Gespräche über mehr oder minder wissenschaftliche Themen, vom Erklären labortechnischer Methoden bis hin zur Landes- und Regionalkunde, für Kaffee und Kekse und für die lustigen Abende bei Taschenlampenlicht mit Dschungelkulisse!

PD Dr. Benjamin Mordmüller danke ich sehr für seine Unterstützung bei „statistischen Unsicherheiten“, Frau Dr. Meral Esen für die Einlernphase im Labor, beiden dafür, dass sie sich so oft Zeit genommen haben und mich in vielen Belangen unter ihre Fittiche genommen haben.

Zuletzt möchte ich hier meine Frau, Familie und Freunde erwähnen, die stets für mich da sind und mir in allen Phasen meines Lebens zur Seite stehen. Ohne eure liebevolle Unterstützung, eure Geduld und Kraft wäre ich nicht dort, wo ich heute bin.