

Aus dem
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Surveillance von arboviralen Infektionen und Malaria
in einem Distriktkrankenhaus in Nord-Tansania
mittels molekularbiologischer Diagnostik und
POC-Schnelltests**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Marlene Follmann, geb. Hagemann
aus Seeheim-Jugenheim

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

16. Juni 2023

1 Inhaltsverzeichnis

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
III.	TABELLENVERZEICHNIS	XI
1.	EINLEITUNG	1
2	LITERATURDISKUSSION	3
2.1	MALARIA.....	3
2.1.1	<i>Epidemiologie</i>	3
2.1.2	<i>Erreger und Pathologie</i>	4
2.1.3	<i>Symptomatik</i>	5
2.1.4	<i>Diagnostik</i>	6
2.1.4.1	Lichtmikroskopie.....	6
2.1.4.2	Malaria-Schnelltests	6
2.1.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)	7
2.1.4.4	Serologie	8
2.1.5	<i>Therapie</i>	8
2.1.6	<i>Vorbeugung</i>	8
2.1.7	<i>Aktuelle Entwicklungen</i>	10
2.2	ARBOVIREN (ARTHROPOD-BORNE-VIRUSES)	13
2.2.1	<i>Epidemiologie</i>	13
2.2.2	<i>Erreger und Pathologie</i>	16
2.2.2.1	Dengue.....	16
2.2.2.2	Vergleich von Malaria und Arboviren	21
2.3	AUSGANGSMATERIALIEN	22
2.3.1	<i>Vollblut und Serum</i>	22
2.3.2	<i>Dried Blood Spots</i>	22
2.4	FOKUS TANSANIA	25
2.4.1	<i>Epidemiologie</i>	26
2.5	FOKUS BURKINA FASO.....	29
2.5.1	<i>Epidemiologie</i>	29
2.6	HYPOTHESEN.....	31
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	MATERIAL	32
3.2	METHODEN	41
3.2.1	<i>Etablierung der RT-mPCR</i>	41
3.2.1.1	Stenzen der Dried Blood Spots aus den Filterkarten	41
3.2.1.2	Elution von Dried Blood Spots	41
3.2.1.3	Isolierung	42

3.2.1.4	Reverse Transkription	43
3.2.1.5	Multiplex-PCR	43
3.2.1.6	Singleplex-PCR	44
3.2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.1.8	ELISA-Hybridisierungsreaktion	45
3.2.2	<i>Forschungsprojekt Tansania</i>	47
3.2.2.1	Hintergrund des Projekts und Ethik	47
3.2.2.2	Studienort	48
3.2.2.3	Studienpopulation	49
3.2.2.4	Ablauf der Datenerhebung und Probengewinnung	49
3.2.2.5	Serologische Tests	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	KLINISCHE DATEN AUS TANSANIA	52
4.1.1	<i>Probanden</i>	52
4.1.2	<i>Allgemeine Patientendaten</i>	52
4.1.3	<i>Daten der körperlichen Untersuchung</i>	52
4.1.3.1	Ernährungszustand	52
4.1.3.2	Vitalparameter	53
4.1.3.3	Impfstatus und chronische Erkrankungen	54
4.1.3.4	Fieberbeginn	54
4.1.3.5	Symptome	55
4.1.4	<i>Daten der Laboruntersuchungen</i>	56
4.1.4.1	Hämoglobinwerte	56
4.1.4.2	Weitere Blutwerte	57
4.1.5	<i>Testergebnisse</i>	57
4.1.6	<i>Prämedikation und getroffene Maßnahmen des Krankenhauses</i>	59
4.1.6.1	Prämedikation	59
4.1.6.2	Maßnahmen im Krankenhaus	61
4.1.7	<i>Aufnahmediagnosen der Kinderstation von Januar bis Dezember 2017</i>	65
4.2	AUSWERTUNG DER DRIED BLOOD SPOTS	68
4.2.1	<i>Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode</i>	68
4.2.1.1	Nachtestung der Probe 28 auf das Zika-Virus	69
4.2.1.2	Auswertung der Proben aus Dar Es Salaam	69
4.3	AUSWERTUNG DER SEROLOGISCHEN DATEN	72
4.4	AUSWERTUNG DER DATEN DER ERWACHSENEN PROBANDEN	74
4.4.1	<i>Allgemeine Daten der Probanden und Probengewinnung</i>	74
4.4.2	<i>Testergebnisse</i>	75
4.5	DATEN AUS BURKINA FASO	76
4.5.1	<i>Studienpopulation</i>	76
4.5.2	<i>Datenerhebung und Probengewinnung</i>	76
4.5.3	<i>Allgemeine Patientendaten und Daten der klinischen Untersuchung</i>	76

5	DISKUSSION	81
5.1	KLINISCHE DATEN AUS SENDEREMA	81
5.1.1	<i>Probanden</i>	81
5.1.2	<i>Daten der körperlichen Untersuchung</i>	81
5.1.2.1	Ernährungszustand	81
5.1.2.2	Vitalparameter	81
5.1.2.3	Impfstatus und chronische Erkrankungen	82
5.1.2.4	Fieberbeginn	83
5.1.2.5	Symptome.....	83
5.1.3	<i>Daten der laboratorischen Investigationen</i>	84
5.1.3.1	Hämoglobinwerte	84
5.1.3.2	Weitere Blutwerte	84
5.1.4	<i>Testergebnisse</i>	84
5.1.4.1	Malaria-Schnelltests	84
5.1.4.2	Lichtmikroskopie.....	85
5.1.4.3	Dengue-Schnelltest	86
5.1.5	<i>Prämedikation</i>	87
5.1.6	<i>Maßnahmen im Krankenhaus</i>	87
5.1.6.1	Gestellte Arbeitsdiagnosen.....	87
5.1.6.2	Verordnete Medikamente	88
5.2	AUSWERTUNG DER DRIED BLOOD SPOTS	89
5.2.1	<i>Diskussion der Malaria-Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode</i>	89
5.2.2	<i>Diskussion der Dengue-Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode</i>	90
5.3	AUSWERTUNG DER SEROLOGISCHEN DATEN	92
5.4	AUSWERTUNG DER DATEN DER ERWACHSENEN PROBANDEN	94
5.4.1	<i>Allgemeine Daten der erwachsenen Probanden</i>	94
5.4.2	<i>Testergebnisse</i>	94
5.5	DATEN AUS BURKINA FASO	95
5.6	AUSBLICK	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
8	ANHANG	121
8.1	EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG FÜR ELTERN ODER ERZIEHUNGSBERECHTIGTE	121
8.2	FRAGEBOGEN FÜR DIE KINDER	123
8.3	EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG FÜR DIE ERWACHSENEN	128
8.4	FRAGEBOGEN FÜR DIE ERWACHSENEN	130
9	DANKSAGUNG	132
10	LEBENS LAUF.....	133

I. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AB	Antibiotikum
Anti-DIG	Digoxigenin Antikörper
Arbo	Englisch: Arthropod- borne
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CHIKV	Chikungunya Virus
cDNA	Komplementäre DNA
DBS	Dried Blood Spots / getrocknete Blutproben
DENV	Dengue Virus
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	desoxy-Uridintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fl	femtoliter
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FHI	Fraunhofer Institut, Leipzig
g/dl	Gramm pro Deziliter
ggf.	gegebenenfalls
GTS	Global technical strategy/ globale technische Strategie
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HIV	human immunodeficiency virus/ humanes Immundefizienzvirus
H ₂ O	Nukleasefreies steriles Wasser
HRP2	Histidin-rich-Protein 2
IgG, IgM	Immunglobuline der Klasse G bzw. M
IRS	Indoor residual spray/ Insektizid-Innenraumsprays

i.v.	intravenös
Kp.	Kapitel
LE Agarose	Low electroendosmosis Agarose
MCH	Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
ml	Milliliter
mM	Millimol
min	Minuten
mPCR	Multiplex polymerase chain reaction/ Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion
MRDT	Malaria rapid diagnostic test/ Malaria-Schnelltest
NaCl	Natriumchlorid/ Kochsalzlösung
NaOH	Natriumhydroxid
nl	Nanoliter
NS1-Antigen	nichtstrukturelles-Glykoprotein-1 Antigen
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
ONNV	O'nyong-Nyong-Virus
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
pdN6	Hexanukleotide
P. falciparum	Plasmodium falciparum
pg	Pikogramm
pLDH	Plasmodium Laktat Dehydrogenase
P. malariae	Plasmodium malariae
POCT	Point-of-care-testing/ patientennahe Labordiagnostik
P. ovale	Plasmodium ovale
P. vivax	Plasmodium vivax
RNA	Ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-mPCR- ELISA	Reverse transcriptase multiplex polymerase chain reaction with Enzyme-linked Immunosorbent Assay/ Reverse-Transkriptase- Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion mit Enzymimmunoassay
Rpm / UpM	Rotations per minute / Umdrehungen pro Minute
RVFV	Rift-Valley Fever Virus
	Sekunde

s	
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SFV	Semliki-Forest Virus
SSA	Subsahara-Afrika
sPCR	Singleplex-Polymerase-Kettenreaktion
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UmP	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
µl	Mikroliter
V	Volt
WNV	West-Nil-Virus
YFV	Gelbfieber-Virus
ZIKV	Zika-Virus
%	Prozent

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Inzidenz von Malaria
Abbildung 2	Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> im Menschen und in der <i>Anopheles</i> -Mücke
Abbildung 3	Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Schweregrad einer Malariainfektion.
Abbildung 4	Verbreitung von <i>Ae. aegypti</i>
Abbildung 5	Verbreitung von <i>Ae. albopictus</i>
Abbildung 6	Globale Verbreitung von Dengue-Fieber
Abbildung 7	Zeitspanne für primäre und sekundäre Dengue-Virus-Infektionen und die zugehörigen Diagnosemethoden
Abbildung 8	Karte von Tansania mit dem Studienort Sengerema
Abbildung 9	Verteilung aller Diagnosen von 133 fiebernden Kindern in Tansania
Abbildung 10	Karte von Burkina Faso mit dem Studienort Ouagadougou
Abbildung 11	Schematischer Ablauf der ELISA-Hybridisierungsreaktion
Abbildung 12	Schema zum Pipettieren einer ELISA-Mikrotiterplatte
Abbildung 13	Vergleich zwischen der mittleren Temperatur der Gesamtpopulation und der der MRDT-positiven Probanden
Abbildung 14	Vergangene Tage nach Fieberbeginn
Abbildung 15	Symptome
Abbildung 16	Hämoglobinwerte
Abbildung 17	Prämedikation
Abbildung 18	Indizierte und nicht indizierte Prämedikation
Abbildung 19	Arbeitsdiagnosen
Abbildung 20	Antibiotikaeinsätze bei verschiedenen Arbeitsdiagnosen
Abbildung 21	Verordnete Medikamente
Abbildung 22	Aufnahmediagnosen 2017
Abbildung 23	Gelelektrophorese der Proben 1-9
Abbildung 24	Gelelektrophorese der Proben 1-10 aus Dar es Salaam
Abbildung 25	Ergebnisse der serologischen Tests

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Vergleich von Malaria und Arboviren
Tabelle 2	Allgemeine Materialien
Tabelle 3	Verwendete Materialien in Tansania
Tabelle 4	Verwendete Materialien für das Stanzen der Filterkarten und für das Eluieren der DBS
Tabelle 5	Verwendete Materialien für die RNA-Extraktion
Tabelle 6	Verwendete Materialien für die Reverse Transkription
Tabelle 7	Verwendete Materialien für die Multiplex-PCR und Singleplex-PCR
Tabelle 8	Verwendete Positivkontrollen für die RT-mPCR
Tabelle 9	Verwendete Materialien für die Herstellung des Agarose-Gels
Tabelle 10	Verwendete Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese
Tabelle 11	Verwendete Materialien für die ELISA-Hybridisierung
Tabelle 12	Verwendete Primer (Forward+Reverse) und Sonden
Tabelle 13	Master-Mix Ansatz für die Reverse Transkription
Tabelle 14	Primer-Mix Ansatz für Multiplex-PCR
Tabelle 15	Primer-Mix Ansatz für Singleplex-PCR
Tabelle 16	Ergebnisse der Malaria-Schnelltests und der RT-mPCR
Tabelle 17	Sensitivität und Spezifität der Malaria-Schnelltests
Tabelle 18	Konkordanz zwischen MRDT und RT-mPCR-ELISA
Tabelle 19	Antibiotikaeinsätze bei verschiedenen Arbeitsdiagnosen
Tabelle 20	Vergleich zwischen den 7 häufigsten Aufnahmediagnosen im Jahr 2017 und den 7 häufigsten Arbeitsdiagnosen während der Studienlaufzeit
Tabelle 21	Auswertung und Vergleich der Daten aus Burkina Faso mit den Daten aus Sengerema
Tabelle 22	Konkordanz zwischen MRDT und RT-mPCR-ELISA (Burkina Faso)

1. Einleitung

Malaria und arbovirale Infektionen sind durch Stechmücken übertragbare fieberhafte Erkrankungen, die besonders die Bevölkerung Afrikas belasten. Malaria ist die bedeutendste parasitäre Erkrankung des Menschen und weltweit eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in der Pädiatrie. Die Region südlich der Sahara (Subsahara Afrika, SSA) verzeichnet etwa 90 % aller Malaria-Todesfälle und steht damit vor einer großen gesundheitlichen Herausforderung (White et al., 2014). Auch in Tansania stellt Malaria eine der 10 häufigsten Todesursachen dar (IHME & GDB, 2017). Aufgrund von erfolgreich eingesetzten Präventionsmaßnahmen, wie Moskitonetze, Insektizide und Chemoprophylaxe, konnten die jährlichen Fallzahlen reduziert werden (WHO, 2018b). Die unspezifischen klinischen Symptome einer Malariaerkrankung grenzen diese nur unzureichend von anderen fieberhaften Infektionen ab, weshalb es häufig zu Fehldiagnosen kommt. Ein Mangel an laboratorischer Ausrüstung und Expertise führt in vielen Fällen dazu, dass Malaria überdiagnostiziert und übertherapiert wird. Die negativen Folgen dieser Übertherapie sind mögliche Nebenwirkungen für die Patienten, die Entwicklung von Medikamentenresistenzen, sowie die entstehenden Kosten unnötiger Therapien für Patienten und das Gesundheitssystem (Mwangi, Mohammed, Dayo, Snow, & Marsh, 2005; Reyburn et al., 2004). Vor diesem Hintergrund wird die Notwendigkeit, arbovirale Infektionen als alternative Fieberursache in Betracht zu ziehen, besonders deutlich.

Die Dengue-Virus-Infektion hat sich in den letzten Jahren durch eine rasante Verbreitung der Vektoren im Zuge der globalen Erwärmung und Urbanisierung zu der am schnellsten verbreiteten Tropenkrankheit der Welt entwickelt (WHO, 2009). Mit etwa 390 Millionen Fällen in über 100 Ländern der Welt stellt diese arbovirale Infektion eine große Last für die betroffene Bevölkerung dar (Bhatt et al., 2013).

Auch Tansania verzeichnet immer wieder akute Dengue-Fieber-Ausbrüche (Public Library of Science, 2016). Eine mangelhafte epidemiologische Datenlage führt zu der Annahme, dass das Ausmaß an Dengue-Fieber-Infektionen unterschätzt wird (Hertz et al., 2012; Vairo et al., 2012).

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es unter anderem durch den Einsatz von Malaria- und Dengue-Schnelltests im Studienort Sengerema in Tansania die Prävalenzen dieser Erkrankungen zu erfassen. Mithilfe der klinischen Daten der Probanden kann ein besseres Verständnis über die unterschiedlichen Krankheitsmuster und die

Verbreitung der Erkrankungen in der Region um den Viktoriasee erlangt werden. In der Dissertation ist eine Reverse-Transkriptase-Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion mit Enzymimmunoassay (engl.: reverse-transcriptase-multiplex-polymerase-chain-reaction with Enzyme-linked Immunosorbent Assay, RT-mPCR-ELISA) aus getrockneten Blutproben auf Filterpapierkarten (Dried Blood Spots, DBS) zu testen, welche es erlaubt, Malariainfektionen und arbovirale Infektionen gleichzeitig nachzuweisen. Als Transportmittel für die gewonnenen Blutproben wurden Filterpapierkarten (Whatman 903 Protein Saver Cards) verwendet, die auf ihre Konservierungsfähigkeiten von Malariaparasiten und arboviraler Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid, RNA) getestet werden sollen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zum Ziel, das Bewusstsein für das Vorkommen anderer fieberhafter Erkrankungen neben Malaria zu stärken. Auf diese Weise kann perspektivisch eine Verbesserung der Diagnostik und eine adäquate Therapieentscheidung für die betroffenen Patienten erzielt werden. Zudem liefert der Vergleich der Ergebnisse der Schnelltests mit den Ergebnissen der RT-mPCR-ELISA Informationen über die Sensitivität und die Spezifität der Testverfahren. Längerfristig sind durch die Ergebnisse der Promotionsarbeit die Testverfahren arboviraler Erkrankungen zu optimieren, sodass ein geeignetes Verfahren zur patientennahen Labordiagnostik (engl.: Point-of-Care-Testing, POCT) in Tansania entwickelt werden kann.

Durch die Anwendung des in Sengerema verwendeten Studienmodells in Burkina Faso ist die Übertragbarkeit des Studiendesigns auf andere Orte zu testen. Ziel war es, epidemiologische Daten über Malaria und Arboviren in Burkina Faso zu sammeln und dadurch mögliche Parallelen und Unterschiede zwischen den Infektionsgeschehen der beiden Länder aufzudecken.

Die Überwachung von arboviralen Infektionen spielt nicht nur in Tansania und Burkina Faso eine wichtige Rolle, sondern ist durch die anhaltende Verbreitung der Vektoren und das Vordringen der arboviralen Infektionen bis nach Südeuropa auch weltweit von großer Relevanz.

2 Literaturdiskussion

2.1 Malaria

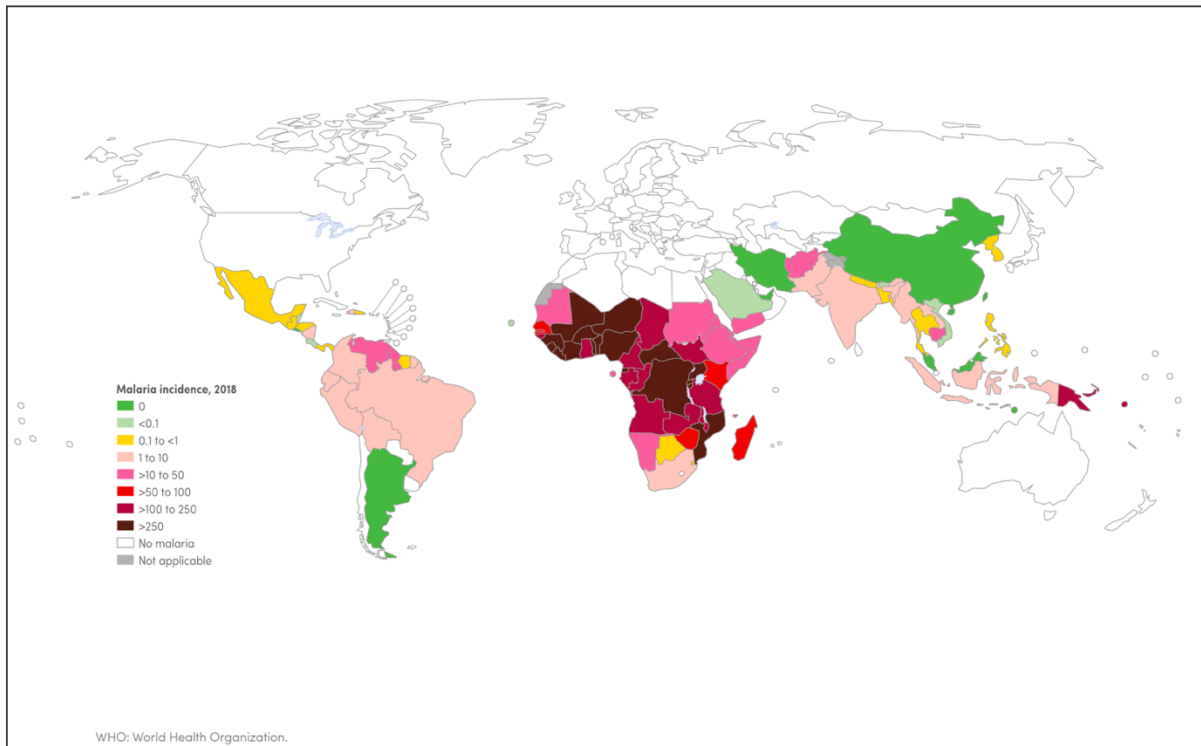
2.1.1 Epidemiologie

Malaria ist mit etwa 228 Millionen Fällen im Jahr 2018 weltweit die bedeutendste parasitäre Erkrankung des Menschen (White et al., 2014). Abbildung 1 gibt einen globalen Überblick über die Inzidenzraten von Malaria im Jahr 2018. Subsahara-Afrika verzeichnet 93 % aller Malariafälle und trägt dadurch die größte Belastung an Morbidität und Mortalität. Im Jahr 2018 starben 405.000 Menschen weltweit an Malaria. Kinder unter 5 Jahren weisen 67 % aller Todesfälle auf und gehören damit zur vulnerabelsten Altersgruppe der Gesellschaft.

Die weltweite Inzidenzrate hat sich innerhalb der letzten Jahre reduziert. Afrika erlebte einen Rückgang der Inzidenz von 2010-2018 um 22 % (WHO, 2019). Auch Morbidität und Mortalität sind besonders durch den vermehrten Einsatz von insektizid-behandelten Moskitonetzen, das Besprühen von Innenräumen mit Insektiziden, effektive Anti-Malaria-Medikamente und durch die Eliminierung von Vektor-Brutstätten gesunken (Murphy et al., 2013). Hervorzuheben ist jedoch, dass sich die Änderungsraten der Inzidenz, Morbidität und Mortalität seit 2014 zu verlangsamen scheinen (WHO, 2019). Weltweit leben über 40 % der Weltbevölkerung in über 90 Ländern in Malaria-Endemiegebieten (Garcia, 2010).

Tansania und Burkina Faso gehören zu den Malaria-Endemiegebieten, in denen optimale Vektorbedingungen zu einer ganzjährigen, stabilen Transmission von Malaria führen. Ein Mangel an Ressourcen und sozio-ökonomische Instabilität erschweren eine adäquate Vektorbekämpfung (CDC, 2020a). Laut WHO liegt Burkina Faso bezüglich der geschätzten Malaria-Fälle im Zeitraum von 2010-2018 auf dem sechsten Platz und Tansania auf dem achten Platz der Liste aller Länder mit hoher Malariabelastung (WHO, 2019).

Abbildung 1: Inzidenz von Malaria (neue Fälle in einem Jahr pro 1000 gefährdete Personen), 2018 (WHO, 2019)



2.1.2 Erreger und Pathologie

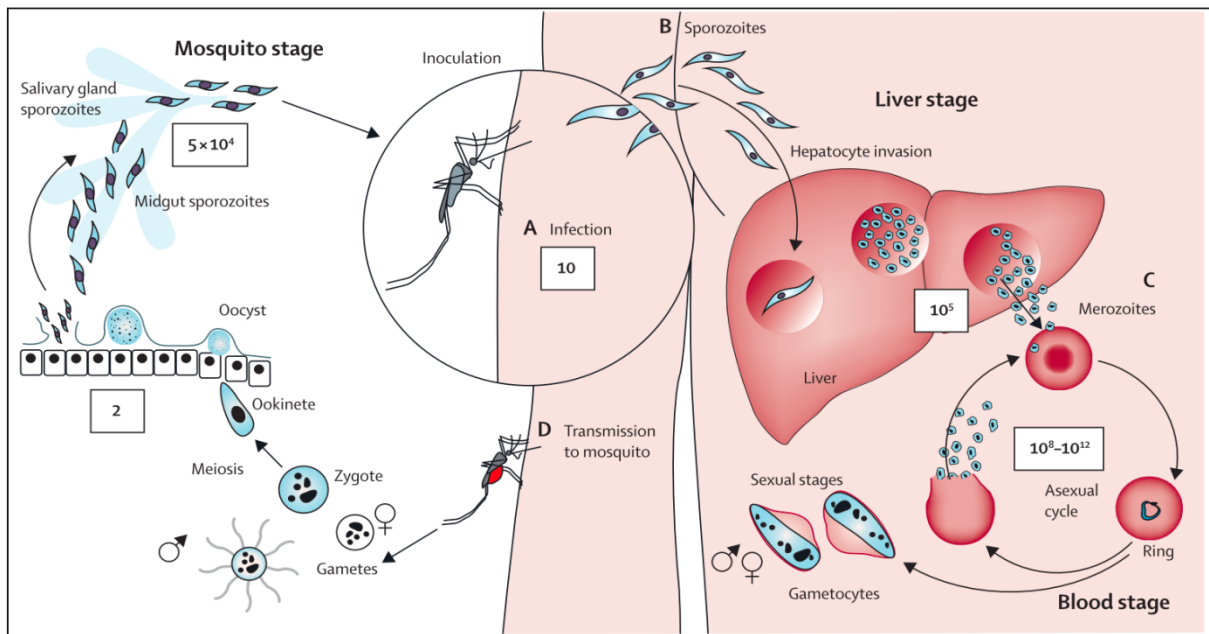
Malaria wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* ausgelöst und gehört zu den Protozoonosen. Von über 150 verschiedenen *Plasmodium*-Arten sind vier humanpathogene Spezies bekannt; *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae*. Eine fünfte Spezies wurde 2004 in Malaysia entdeckt und spielt seitdem besonders in Südostasien eine Rolle (Ott, 1967; B. Singh & Daneshvar, 2013). *Plasmodium falciparum* ist der meist prävalente Parasit in Afrika. Er ist für etwa 99,7 % der dortigen Malariafälle verantwortlich und bestimmt maßgeblich die Mortalität (White et al., 2014; WHO, 2018b).

Als Vektor fungiert eine Stechmücke der Gattung *Anopheles*. In weiten Teilen Afrikas, unter anderem in Tansania und in Burkina Faso, spielt *Anopheles gambiae* die bedeutendste Rolle (Dambach et al., 2018; Kiszewski et al., 2004). Der Lebenszyklus des Malariaparasiten vollzieht sich sowohl im Menschen als auch in der Stechmücke. Abbildung 2 zeigt einen detaillierten Ablauf des Vermehrungszyklus. Der Zyklus beginnt im Menschen mit dem Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke, welche Sporozoiten in die Blutbahn des Wirts injiziert. Im Menschen folgen eine präerythrozytäre und eine erythrozytäre Phase, bevor Gametozyten über das Blutsaugen von der Stechmücke aufgenommen werden und sich der Kreislauf damit schließt (RKI, 2015).

Jede *Plasmodium*-Art führt zu einem unterschiedlichen Krankheitsbild der Malaria;

Erreger	Malariaform
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria tropica
<i>Plasmodium vivax</i>	Malaria tertiana
<i>Plasmodium ovale</i>	Malaria tertiana
<i>Plasmodium malariae</i>	Malaria quartana

Abbildung 2: Lebenszyklus von *P. falciparum* im Menschen und in der *Anopheles*-Mücke (White et al., 2014)



2.1.3 Symptomatik

Jede Malariainfektion ist in Bezug auf die Individualität, das Alter und die Komorbiditäten des Wirts, die Expositionshäufigkeit und den Zugang zu medizinischen Behandlungen und Medikamenten einzigartig (Palacpac, Horii, & Duffy, 2020)

Die Inkubationszeit variiert je nach Malaria-Art zwischen 7-40 Tagen. Hauptsymptom jeder Malariainfektion ist das Fieber. Rhythmisierungen des Fiebers im 48 h Takt bei der Malaria tertiana und im 72 h Takt bei der Malaria quartana können auftreten (RKI, 2015). Unspezifische Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Unwohlsein, Müdigkeit, Bauchschmerzen, Erbrechen und Übelkeit prägen das Krankheitsbild der Malaria. Besonders Kinder präsentieren sich mit diffusen Symptomen und erleiden häufiger schwere Krankheitsverläufe mit Hepatosplenomegalie, Hypoglykämie und Anämie (Mwangi et al., 2005; White et al., 2014).

Infektionen mit *Plasmodium falciparum* sind häufig Grund für Komplikationen wie die zerebrale Malaria mit Krampfanfällen und komatösen Zuständen. Unbehandelt kann eine komplizierte Verlaufsform in bis zu 20 % der Fälle zum Tod führen (RKI, 2015). Menschen mit einer heterozygoten Sichelzellerkrankung, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Thalassämie, Hämoglobin C&E und Ovalozytose erfahren einen natürlichen Schutz vor einer schwerwiegenden Malariainfektion (Williams, 2012).

2.1.4 Diagnostik

Die Symptome einer Malariainfektion sind schwer von den Symptomen anderer fieberhafter Erkrankungen zu unterscheiden (Kiemde et al., 2017). Jahrelang wurde eine Malariaerkrankung vorwiegend anhand von klinischen Symptomen diagnostiziert (Mboera, Makundi, & Kitua, 2007). Die WHO empfiehlt nun vor jeder Malariatherapie eine eindeutige, laboratorisch gestellte Diagnose (WHO, 2019).

2.1.4.1 Lichtmikroskopie

Goldstandard der Diagnostik ist die Lichtmikroskopie. Hierbei wird der dicke Blutausschlag für das Auffinden von Parasiten und der dünne Blutausschlag für die Identifizierung der *Plasmodium*-Art verwendet (Murphy et al., 2013). Die Vorteile der Lichtmikroskopie sind vielfältig. Es handelt sich um eine einfache, kosteneffektive Methode, die weitverbreitet zugänglich ist. Zudem wird der Parasit selbst identifiziert und quantifiziert, sodass die Methode auch als Verlaufsparemeter während einer Therapie dient. Nachteilig an der Lichtmikroskopie ist, dass die Sensitivität stark von der Expertise der durchführenden Laborkraft und der Qualität des Blutausschlages und des Mikroskops abhängig ist (Ashraf et al., 2012; Murphy et al., 2013).

2.1.4.2 Malaria-Schnelltests

Malaria-Schnelltests (engl.: Malaria rapid diagnostic test, MRDT) basieren auf dem Prinzip einer Dünnschichtchromatografie in Kombination mit einer Immunfärbung. Innerhalb von 5-20 min zeigen sie dadurch das Vorhandensein oder die Abwesenheit von *Plasmodium*-spezifischen Antigenen an. Zur Durchführung der Tests kann kapillares oder venöses Blut verwendet werden (Murphy et al., 2013). Die Identifikation von Malaria erfolgt über die Detektion von drei Antigenen; Histidin-rich Protein 2 (HRP2), Plasmodium Laktat Dehydrogenase (pLDH) und Aldolase (Moody, 2002).

Schnelltests, die HRP2 detektieren, können nach erfolgreicher Eradikation des Parasiten bis zu mehreren Wochen positiv bleiben. Dies liegt an einer persistierenden Antigenämie (N. Singh & Shukla, 2002). Dadurch kann es zu falsch-positiven Ergebnissen und einer geringeren Spezifität der Tests kommen. Patienten mit falsch-positiven Ergebnissen werden häufig mit überflüssigen Anti-Malaria-Medikamenten belastet und der wahre Grund ihrer fieberhaften Erkrankung bleibt oft unentdeckt. Dies führt zu einer erheblichen Gefährdung ihrer Gesundheit und belastet das Gesundheitssystem durch vermehrte Kosten (Swarthout, Counihan, Kabangwa, Senga, & Van Den Broek, 2007).

Im Gegensatz zu den Schnelltests, die HRP2-sensibel sind, weisen Schnelltests, die pLDH detektieren, eine geringere Sensitivität auf. Dafür zirkuliert das pLDH-Antigen kürzer im Blut und die Zahl an falsch-positiven Tests nach abgeschlossener Behandlung ist geringer (Murphy et al., 2013).

Die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Malaria-Schnelltests detektieren *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* anhand von HRP2 und pLDH (nal von minden GmbH, 2016).

Die Vorteile der Malaria-Schnelltests beinhalten die einfache Handhabung und die Durchführung ohne laboratorische Technik, Expertise und Elektrizität. Zu den Nachteilen gehören die fehlende Validierung der Quantität der Parasiten, die im Vergleich zur Mikroskopie hohen Produktionskosten, die falsch-negativen Ergebnisse bei niedriger Parasitenlast und die unterschiedliche Qualität der Tests je nach Hersteller (Murphy et al., 2013). Um die Qualität der Malaria-Schnelltests zu verbessern und zu sichern, hat die WHO ein fortlaufendes Evaluationsprogramm gestartet (WHO, 2012).

2.1.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein molekulartechnisches Verfahren zur Amplifizierung von Nukleinsäuren (Ratcliff, Chang, Kok, & Sloots, 2007). Dieses Verfahren gewährleistet eine optimale Sensitivität und kann durch spezifische Primer zwischen den *Plasmodium*-Arten unterscheiden (Murphy et al., 2013). Mithilfe der PCR können die Parasiten ausgezeichnet quantifiziert werden und 1-4 Tage früher als mit dem Lichtmikroskopieverfahren detektiert werden (Hermsen et al., 2001). Nachteilig ist, dass es sich bei der PCR um ein zeitaufwendiges und kostenintensives Verfahren handelt, welches generell noch nicht als Routinediagnostik eingesetzt wird. Die Durchführung verlangt eine aufwändig

erlernte Expertise, da das Testverfahren sehr anfällig für Kontaminationen und dahingehend für falsche Ergebnisse ist. Die Tatsache, dass die PCR bereits eine geringe Parasitendichte erfassen kann, zieht Vor- und Nachteile mit sich. Asymptomatische Patienten mit geringer Parasitämie können durch die PCR auffindig gemacht werden und die Malariatransmission durch ihre Behandlung bekämpft werden. Als Nachteil wird gewertet, dass Patienten mit positivem PCR Ergebnis automatisch eine Malariadiagnose erhalten. Dadurch besteht die Gefahr, aufgrund einer asymptomatischen Parasitämie den eigentlichen Krankheitserreger zu missachten (Murphy et al., 2013; Strøm et al., 2013).

2.1.4.4 Serologie

Serologische Tests detektieren Antikörper und damit die Immunantwort gegenüber Plasmodien. Sie werden nicht als Diagnostik für eine akute Malariainfektion eingesetzt, sondern spielen eine Rolle bei der Evaluation von Expositionen und Transmissionen. Zudem wird die Überwachung der Immunantwort mittels serologischen Tests bei der Entwicklung eines potenten Impfstoffes gegen Malaria eingesetzt. (Kobayashi et al., 2012; Murphy et al., 2013)

2.1.5 Therapie

Die Therapie der Malaria variiert je nach Erreger, Resistenzlage und klinischem Bild. Für die Therapie einer unkomplizierten Malaria tropica stehen 3 gleichwertige Wirkstoffkombinationen zur Verfügung; Atovaquon/ Proguanil, Artemether/ Lumefantrin oder Dihydroartemisinin/ Piperaquin. Bei einer komplizierten Verlaufsform kommt unter intensivmedizinischer Bereitschaft Artesunat intravenös (i.v.) zum Einsatz. Als Zweitlinientherapie gilt Chinin i.v.. Im Anschluss folgt eine orale Therapie mit Atovaquon/ Proguanil.

Die Malaria tertiana wird off-label mit Artemether/ Lumefantrin oder Atovaquon/ Proguanil behandelt.

Chloroquin kommt bei der Behandlung der Malaria quartana zum Einsatz (AWMF, 2016; RKI, 2015)

2.1.6 Vorbeugung

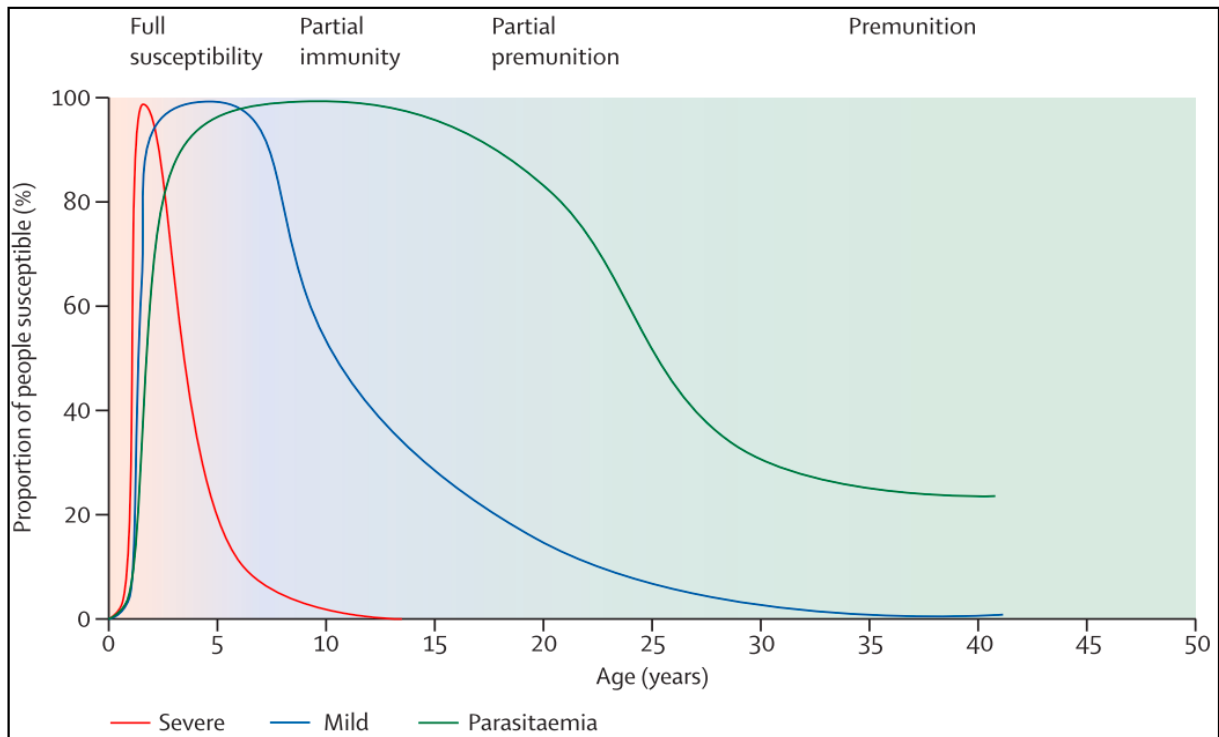
Die Entwicklung einer natürlichen (Teil)Immunität gegenüber Malaria kann an Bewohnern in Endemiegebieten mit hoher Transmission beobachtet werden. Diese (Teil)Immunität entsteht durch herkömmliche B- und T-Zellimmunantworten auf

Immunogene (Sardá, Kaslow, & Williamson, 2009). Mit zunehmendem Alter entwickeln sie eine steigende Resistenz gegenüber schweren Verlaufsformen (Marsh, 1992). Aus diesem Grund treten tödlich verlaufende Malariaerkrankungen vor allem bei Kindern unter 5 Jahren auf (WHO, 2019). Im Erwachsenenalter dagegen, verläuft die Infektion zunehmend subklinisch und asymptomatische Parasitämien treten häufiger auf (Murphy et al., 2013). Abbildung 3 verschafft einen Überblick über den Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Schweregrad einer Malariainfektion.

Laut WHO umfasst die Prävention von Malaria die Vektorkontrolle, die Chemoprävention bei Kindern und Schwangeren, das Schlafen unter einem insektizid-behandelten Moskitonetz und das Besprühen von Innenräumen mit Insektiziden (Indoor residual sprays/ IRS) (WHO, 2019). Mittlerweile schläft etwa jeder zweite Mensch in einem Risikogebiet unter einem Moskitonetz und 22 % aller Schwangeren erhalten eine Chemoprävention mit Sulfadoxine-Pyrimethamin (WHO, 2018b).

Neue Ansätze der Vektorkontrolle beinhalten die Infektion der *Anopheles*-Mücke mit dem Proteobakterium *Wolbachia* (Shaw et al., 2016). Dieses Bakterium verhindert die Entwicklung des Malariaparasiten in der *Anopheles*-Stechmücke durch Hochregulation der Immunantwort (Kambris et al., 2010). Zusätzlich kann *Wolbachia* die Stechmücke *Aedes aegypti* infizieren und mindert dadurch die Transmission von Dengue und Chikungunya (Moreira et al., 2009). Die Tatsache, dass sich *Wolbachia* natürlicherweise innerhalb der Mückenpopulation vermehrt, öffnet neue Türen der Vektorbekämpfung und Prävention von Malaria und arboviren Infektionen (Kambris et al., 2010).

Abbildung 3: Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Schweregrad einer Malariainfektion. Modifiziert. (Sardá et al., 2009)



2.1.7 Aktuelle Entwicklungen

Die Inzidenzrate von Malaria ist zwischen 2010-2018 weltweit gesunken, jedoch stagniert die Abnahme an Fallzahlen zunehmend. Die globale technische Strategie (Global technical strategy, GTS) für Malaria sieht für 2020 als Meilenstein die Elimination von mindestens 10 Malaria-Endemiegebieten vor. Dieses Ziel wird voraussichtlich erreicht. Die Senkung der Morbidität, ein GTS Meilenstein für die Jahre 2025 und 2030, wird jedoch vermutlich nicht erzielt.

Der Kampf gegen Malaria wird durch zunehmende Resistenzbildungen gegen die Wirkung von Insektiziden und Medikamenten bedroht. Für die Behandlung von Moskitonetzen und für IRS wird das Insektizid Pyrethroid eingesetzt. Resistenzbildungen bei den Moskitos gegenüber diesem Insektizid führen dazu, dass auf teurere Alternativen zurückgegriffen werden muss. Dadurch hat sich der Populationsanteil, der unter einem Moskitonetz schläft, seit 2016 nicht verändert und die Zahl an benutzten IRS ist gesunken (WHO, 2019). Hinzu kommt eine steigende Resistenzbildung bei den Menschen gegenüber Anti-Malaria-Medikamenten. Eine „Arzneimittelresistenz führt normalerweise zu einer Verzögerung oder einem Versagen, asexuelle Parasiten aus dem peripheren Blut zu entfernen, was schließlich die Produktion von Gametozyten ermöglicht, die für die Übertragung des resistenten Genotyps verantwortlich sind“ (Sinha, Medhi, & Sehgal, 2014).

Resistenzen gegenüber dem Anti-Malaria-Medikament Aminoquinolin Chloroquin haben sich seit den 1980er Jahren in weiten Teilen Afrikas und auf anderen Kontinenten verteilt. Es galt bis dato als effektivstes und kostengünstigstes Medikament (Wernsdorfer & Payne, 1991). Seit 2010 empfiehlt die WHO Artemisinin-basierte Kombinationstherapien (WHO, 2010). Jedoch ist die Wirksamkeit der neuen Medikamente zunehmend durch neue Resistenzbildungen bedroht. Eine genetische Mutation im PfKelch13-Gen des Plasmodiums wird mit einer partialen Artemisinin-Resistenz assoziiert und wurde in Teilen Südostasiens, Guyana, Papua Neu Guinea und Ruanda entdeckt (WHO, 2019). Die Auswertung genetischer Untersuchungen in Ruanda zeigte, dass es sich bei der dortigen PfKelch13-Mutation um eine *de novo* Mutation handelt, welche für Artemisinin-Resistenzentstehungen ursächlich ist (Uwimana et al., 2020). Die meisten genetischen Mutationen, die eine Medikamentenresistenz nach sich ziehen, treten spontan in der Natur auf (Sinha et al., 2014). Es wurde zudem festgestellt, dass sich resistente Parasiten bei einer niedrigeren Arzneimitteldosis gut ausbreiten können, weil für ihre Eradikation höhere Dosen als für die herkömmlichen Parasiten benötigt werden (Barnes, Watkins, & White, 2008). Die Nanotechnologie bietet einen möglichen Lösungsansatz. Nanoträger können die Bioverfügbarkeit von Medikamenten beeinflussen und damit die Toxizität verändern, sodass alte Medikamente in potentiell toxischen Dosen verabreicht werden können (Forrest & Kwon, 2008).

Eine weitere Genveränderung von *P. falciparum* führt zu erheblichen Schwierigkeiten in der Detektion des Parasiten. HRP2/3 sind vorherrschende Zielstrukturen der Malariaschnelltests. Parasiten, welche diese Strukturen aufgrund einer Gendeletion nicht mehr exprimieren, sind für solche Malariaschnelltests unauffindbar. Erste genveränderte Parasiten wurden 2010 in Peru identifiziert. Seitdem haben sie sich unter anderem auf dem afrikanischen Kontinent ausgebreitet und stellen eine große Bedrohung für die Bekämpfung von Malaria dar (WHO, 2019).

Die Entwicklung eines Impfstoffes spielt eine große Rolle in der Kontrolle von Malaria und würde den bisherigen präventiven Maßnahmen entscheidende Unterstützung bieten. Eine günstige Massenimmunisierung könnte den lang ersehnten Effekt bringen, die Transmission von Malaria langfristig einzudämmen. Die Schwierigkeit in der Entwicklung eines Impfstoffes liegt darin, dass die Plasmodien einen komplexen Lebenszyklus aufweisen und jede immunologische Interaktion zwischen Menschen und Parasiten einzigartig ist.

Ein Impfstoff namens „RTS,S“, registriert als „Mosquirix“, wird seit 1987 von dem Unternehmen GlaxoSmithKline entwickelt und befindet sich aktuell in einer Phase 4 Studie. Ergebnisse der Phase 3 Studie zwischen 2009 und 2014 in Subsahara-Afrika lieferten moderate Ergebnisse. Nichtsdestotrotz bewahrt der Impfstoff viele Kinder vor dem Tod, weshalb die Entwicklung einer Immunisierung weiterhin Bestandteil aktueller Forschungen und Investitionen sein wird (Karunamoorthi, 2014; Palacpac et al., 2020; The Lancet Infectious Diseases, 2019).

2.2 Arboviren (Arthropod-borne-viruses)

Arboviren lassen sich zu einer Gruppe von Viren zusammenfassen, die Gliederfüßer, bevorzugt Moskitos und Zecken, befallen und durch ihren Biss auf Wirbeltiere übertragen werden. Normalerweise gehören Vögel oder kleine Säugetiere zu den Wirten. Wird ein Mensch infiziert, spricht man von „dead-end-host“, ein sogenannter Fehlwirt. Dies bedeutet, dass Menschen kein Virusreservoir darstellen und eine direkte Transmission auf andere Menschen nicht stattfinden kann (Weaver & Barrett, 2004).

Die Arboviren werden in mehrere Familien gegliedert. Drei dieser Familien enthalten humanpathogene Viren, welche in dieser Promotionsarbeit näher aufgeführt werden. Zur Familie der Flaviviren zählen das Gelbfieber-Virus (YFV), das Dengue-Virus (DENV), das Zika-Virus (ZIKV) und das West-Nil-Virus (WNV). Die Familie der Togaviren beinhaltet das Chikungunya-Virus (CHIKV), das O'nyong-nyong-Virus (ONNV) und das Semliki-Forest-Virus (SFV). Das Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) ist der Familie der Bunyaviren zugehörig (Berner et al., 2013; Wilder-Smith et al., 2017).

2.2.1 Epidemiologie

Zwei Moskitospezies der Gattung *Aedes*, *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus*, fungieren als primäre Vektoren für arbovirale Infektionen. Ihre globale Ausbreitung ist maßgeblich mit der Verbreitung dieser Infektionen und der damit einhergehenden gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Lasten assoziiert (Lwande et al., 2020). Die *Aedes*-Moskitos haben sich in den letzten Jahren stetig ausgebreitet und besiedeln nun alle Kontinente weltweit (Kraemer et al., 2015). Über 3 Milliarden Menschen leben in *Aedes* befallenen Gebieten. Die Abbildungen 4 und 5 geben einen Überblick über die globale Verteilung von *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus*.

Die drastische Expansion von Arboviren hängt unter anderem mit dem globalen Wandel zusammen. Zu den Hauptfaktoren gehören die Zunahme an internationalem Verkehr und Auslandsreisen, die Überbevölkerung und Verstädterung in tropischen Ländern mit niedrigem Einkommen, die daraus künstlich entstehenden Larvenlebensräume, Globalisierungsprozesse, Eingriffe in das Ökosystem und der Klimawandel (Martins, Prata-Barbosa, & Cunha, 2020; Wilder-Smith & Gubler, 2008). Das RNA Genom der Arboviren ermöglicht ihnen eine konstante und schnelle Adaption an wechselnde Umwelteinflüsse (Beckham & Tyler, 2015). So kam es dazu, dass sich Dengue-Fieber am schnellsten von allen arboviralen Infektionen entwickelte. Die Inzidenzraten sind in den letzten 60 Jahren um das 30-fache

gestiegen und die Endemiegebiete haben sich von 10 Ländern auf 124 Länder ausgebreitet. Zu diesen Dengue-Endemiegebieten zählen auch die Länder Tansania und Burkina Faso (Bhatt et al., 2013; WHO, 2009).

Erste autochthone Dengue-Virus-Übertragungen in Europa fanden im Jahr 2010 in Frankreich statt. Weitere folgten in den Jahren 2013 und 2015 in Südfrankreich, einer Region, in der *Ae. albopictus* heimisch wurde (Ruche et al., 2010).

Neben dem Dengue-Fieber stellt auch die Chikungunya-Erkrankung eine große medizinische und sozioökonomische Last dar (Kajeguka et al., 2016). Das Chikungunya-Virus zirkuliert typischerweise im Rahmen großer Epidemien, bevorzugt in Afrika, Asien und Australien (Caglioti et al., 2013). Erstes großes Aufsehen erzielte eine Epidemie in Kenya im Jahr 2004. Von dort breitete sich das Virus auf viele Länder im indischen Ozean aus und führte zu einem massiven Ausbruch auf der Insel La Réunion im Jahr 2005 (Pialoux, Gaüzère, Jauréguiberry, & Strobel, 2007). In Europa wurde eine erste autochthone Chikungunya-Transmission im Jahr 2007 in Italien gemeldet. Im Jahr 2010 und 2014 folgten weitere autochthone Zirkulationen in Frankreich. Im Jahr 2017 erfuhren Frankreich und Italien einen erneuten Chikungunya-Virus-Ausbruch (Martinet, Ferté, Failloux, Schaffner, & Depaquit, 2019; Tomasello & Schlagenhauf, 2013; Venturi et al., 2017). Während eines Ausbruchs auf der Insel La Réunion zwischen 2005-2006 wurde eine Genommutation festgestellt, welche dazu führte, dass das Virus neben *Ae. aegypti* auch *Ae. albopictus* infizieren konnte. Stechmücken der Gattung *Aedes* sind in Gebieten Europas und Amerikas heimisch, wodurch Chikungunya-Virus-Ausbrüche in diesen Gegenden erklärt werden können (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; Tsetsarkin, Vanlandingham, Mcgee, & Higgs, 2007).

Das Zika-Virus hat sich seit seiner Entdeckung im Jahr 1947 in Uganda auf dem afrikanischen Kontinent, in Asien, auf den pazifischen Inseln und in Amerika verbreitet. Seitdem wächst seine Bedeutung unter den arboviralen Infektionen (Boyer, Calvez, Chouin-Carneiro, Diallo, & Failloux, 2018). In Europa wurden bis heute keine Zika-Virus-Ausbrüche registriert. Jedoch stellt die europäische Stechmücke *Ae. albopictus* einen potenten Vektor für Zika-Virus-Transmissionen dar (Heitmann et al., 2017).

Zu der stetig wachsenden Ausbreitung der Vektoren kommt hinzu, dass sich die weibliche *Aedes aegypti* bevorzugt tagsüber und in häufigen Abständen von menschlichem Blut ernährt. Dadurch können die Arboviren sehr effektiv übertragen werden (Girard, Nelson, Picot, & Gubler, 2020).

Abbildung 4: Verbreitung von *Ae. aegypti* (Lwande et al., 2020)

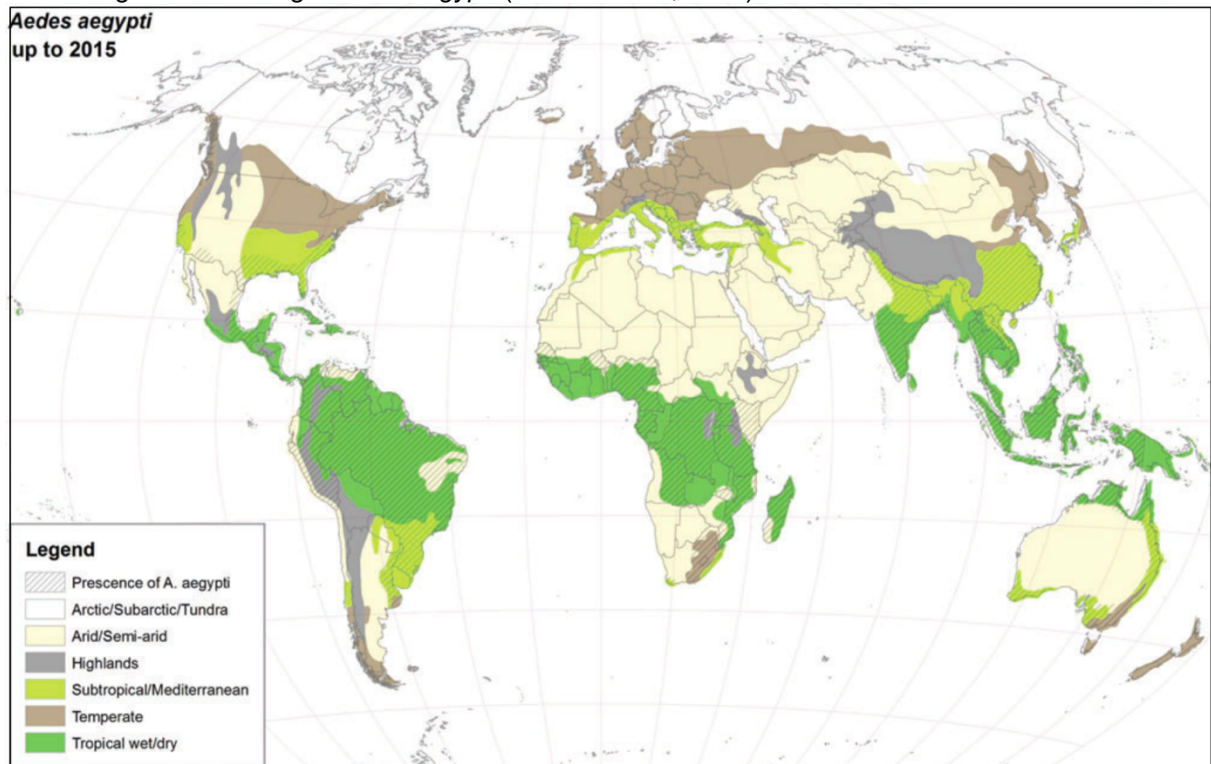
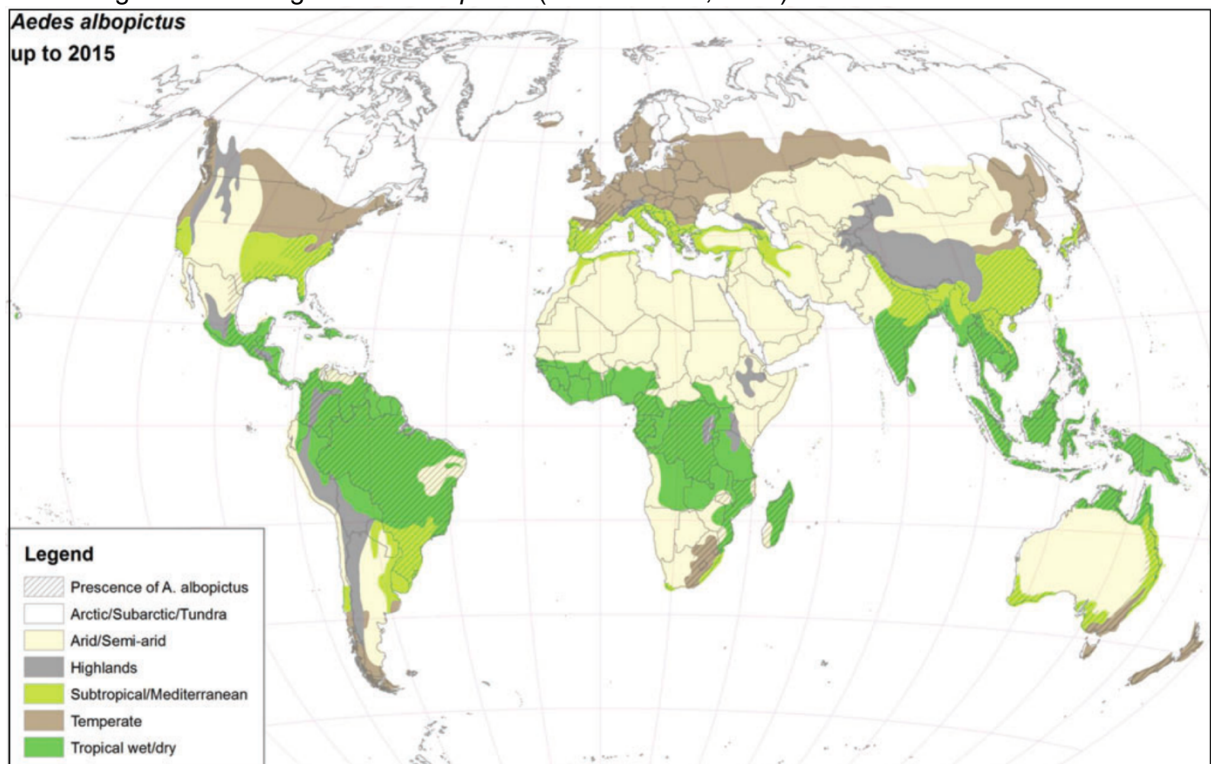


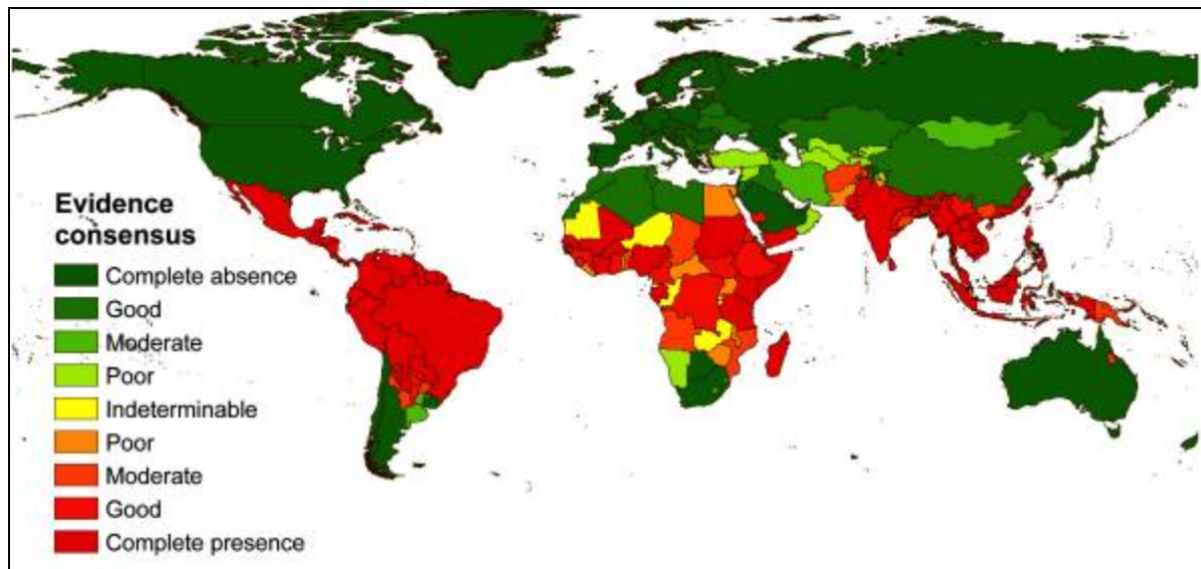
Abbildung 5: Verbreitung von *Ae. albopictus* (Lwande et al., 2020)



2.2.2 Erreger und Pathologie

2.2.2.1 Dengue

Abbildung 6: Globale Verbreitung von Dengue-Fieber. Modifiziert (Brady et al., 2012).



Dengue-Fieber ist die häufigste arbovirale Infektion des Menschen. Mit etwa 390 Millionen Fällen weltweit stellt sie eine große Last für die Weltbevölkerung dar (Bhatt et al., 2013). In Abbildung 6 ist die globale Verbreitung von Dengue-Fieber ersichtlich. Das Dengue-Virus ist ein RNA-Virus und gehört zur Familie der Flaviviren (Heilman, De Wolff, Beards, & Basden, 2014). Es existieren 4 humanpathogene Virusarten, die über die Stechmücke der Gattung *Aedes*, bevorzugt über *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus*, übertragen werden (CDC, 2019a). Im Jahr 2013 entdeckten Wissenschaftler einen fünften Dengue-Virus-Serotyp, welcher vermutlich ausschließlich unter Primaten zirkuliert (Normile, 2013).

Trotz der rasant steigenden Inzidenzzahlen, ist die epidemiologische Datenlage von Dengue mangelhaft (Vairo et al., 2012). Aufgrund fehlender Diagnostik und variablen nationalen Gesundheitssystemen existiert keine genaue Datenerfassung über das Ausmaß der globalen Dengue-Virus-Infektionen (Brady et al., 2012). Dass das Dengue-Virus in Teilen Subsahara-Afrikas zirkuliert, konnte durch mehrere Ausbrüche, unter anderem in Pemba und Mosambique, bestätigt werden (Gubler, Sather, Kuno, & Cabral, 1986; Vairo et al., 2012). Jedoch wird die tatsächliche Zahl an Infektionen weit unterschätzt und Dengue-Fieber häufig als Malaria fehldiagnostiziert. Dies hat den unnötigen Gebrauch von Anti-Malaria-Medikamenten, die verzögerte Diagnostik und Therapie der eigentlich vorhandenen Erkrankung und die damit einhergehenden Kosten für das Individuum und das Gesundheitssystem

zur Folge (Hertz et al., 2012; Hume et al., 2008). Von dieser Bürde sind besonders vulnerable und arme Gesellschaftsgruppen betroffen, die wenig Resilienz im Kampf gegen das Virus aufzeigen können (Amexo, Tolhurst, Barnish, & Bates, 2004).

2.2.2.1.1 Symptomatik

Die Symptomatik der Dengue-Virus-Infektion variiert sehr stark und ist abhängig von dem Alter und dem immunologischen Status der erkrankten Person. Die Krankheitsdauer kann in 3 Phasen gegliedert werden. Die erste, febrile Phase dauert etwa 2-7 Tage und beginnt mit plötzlich auftretendem, hohem Fieber. Häufig wird das Fieber von Kopfschmerzen, Myalgie und Arthralgie begleitet. Die Hälfte der Patienten entwickelt ein makulopapuläres Exanthem. Bei unter 20 % der Erkrankten wird die zweite Phase mit einem zweiten Fieberschub beobachtet. Das dritte Stadium ist ein kritischer Zustand mit folgenden Warnzeichen: Blutungen, Bauchschmerzen, Hepatomegalie, Hypothermie, Lethargie und Ödembildung. In weniger als 5 % aller Fälle kommt es zu dem lebensbedrohlichen Dengue-Schock-Syndrom (Ranjit & Kisson, 2011). Dieses ist durch Kapillarlecks, die zum Schock und Lungenödem führen, schwere Blutungen und multiple Organfunktionsstörungen gekennzeichnet (WHO, 2009). Bei den meisten Kindern treten während der ersten Dengue-Virus Infektion subklinische, undifferenzierte, febrile Symptome auf (Berner et al., 2013; Guzman et al., 2010). Zu beachten gilt jedoch, dass bevorzugt Kinder bei einer zweiten Infektion an dem schweren Dengue-Schock-Syndrom erkranken. Dies liegt daran, dass der Schweregrad der Kapillarlecks altersabhängig ist und Kinder besonders stark betroffen sind (Guzman et al., 2002). Erwachsene dagegen haben ein höheres Risiko, bei einer Erstinfektion Komplikationen wie Hämorrhagien zu entwickeln (Guzman et al., 2010).

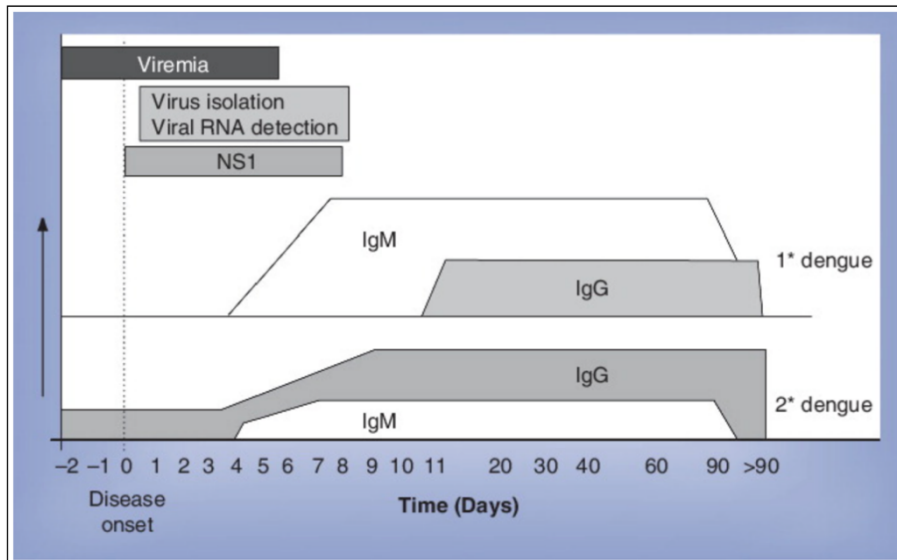
2.2.2.1.2 Diagnostik

Dengue-Fieber ist in Endemiegebieten typischerweise eine klinisch gestellte Diagnose (Whitehorn & Farrar, 2010). Dies stellt eine große Hürde dar. Dengue-Fieber präsentiert sich mit ähnlichen Symptomen wie andere arbovirale Infektionen und wie Malaria. Deshalb besteht die Schwierigkeit, anhand von klinischen Symptomen zwischen den einzelnen Erkrankungen zu unterscheiden. Eine Leukozytopenie, Thrombozytopenie und metabolische Azidose im Rahmen der Labordiagnostik können erste Hinweise für das Vorhandensein einer Dengue-Fieber-Infektion darstellen (Chen & Wilson, 2010; Ranjit & Kisson, 2011). Abbildung 7

verdeutlicht, welche diagnostischen Tests in den jeweiligen Krankheitsphasen möglich sind. Eine akute Dengue-Fieber Infektion kann innerhalb der ersten 7 Tage mithilfe der Detektion von nichtstrukturellem-Glykoprotein-1 Antigen (NS1-Antigen) oder der Isolation von Virus-RNA durch die RT-PCR diagnostiziert werden (N. H. Ahmed & Broor, 2014; Rockstroh et al., 2015). Die direkte Virusdetektion im Rahmen der RT-PCR wird in Endemiegebieten aufgrund von mangelnder Laborausstattung und dem hohen Risiko an Kontaminationen nicht routinemäßig durchgeführt (Peeling et al., 2010). Weit häufiger werden in der alltäglichen Diagnostik von Dengue-Fieber Schnelltests und ELISAs angewendet, die auf das NS1-Antigen abzielen. Ein Vorteil der Schnelltests im Vergleich zu der ELISA-Methode ist, dass sie das Ergebnis innerhalb von 15-30 min liefern und nicht auf Laboratorien angewiesen sind. Nachteilig ist, dass die Schnelltests eine geringere Sensitivität als die ELISA-Verfahren aufzeigen, besonders bei Zweitinfektionen. Die NS1-Antigene weisen im Blut an Tag 4-5 nach Symptombeginn ihr Maximum auf und sind vorher und nachher schwer detektierbar. Bei einer Zweitinfektion liegt das Maximum der Konzentration früher, da NS1-Antigene früher aus der Blutbahn verschwinden. Diese Tatsachen können zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Duyen et al., 2011; Pal et al., 2014). Zudem sollte beachtet werden, dass NS1-Antigen-Schnelltests nicht zwischen den einzelnen Dengue-Virus-Serotypen unterscheiden können (Guzman et al., 2010). Etwa 5 Tage nach Symptombeginn fallen die primären Marker, NS1-Antigen und Virus-RNA, ab und Dengue-IgM-Antikörper werden detektierbar. Bei einer ersten Infektion beginnt die Dengue-IgG-Antikörperproduktion einige Tage verzögert, wohingegen Dengue-IgG-Antikörper bei einer zweiten Infektion von vornherein vorhanden sind (Peeling et al., 2010).

Die am weitesten verbreitete Methode, um Dengue-Fieber zu diagnostizieren, ist ein ELISA, welcher Dengue-IgM/IgG-Antikörper detektiert. Diese serologische Methode hat den Nachteil, dass eine Diagnose erst nach der akuten Krankheitsphase stattfinden kann (Pal et al., 2014). Die Kreuzreaktivität des Dengue-Virus zu anderen Flaviviren stellt einen weiteren Nachteil der Antikörper-basierten Diagnostik dar (Papa, Karabaxoglou, & Kansouzidou, 2011). Dies kann zu falsch-positiven Testergebnissen führen, wenn im Voraus eine Infektion oder Vakzination mit einem anderen Flavivirus (Gelbfieber-Virus, Japanische Enzephalitis-Virus) stattgefunden hat (Simmons, Farrar, van Vinh Chau, & Wills, 2012).

Abbildung 7: Zeitspanne für primäre und sekundäre Dengue-Virus-Infektionen und die zugehörigen Diagnosemethoden (WHO, 2009).



2.2.2.1.3 Therapie

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine spezielle antivirale Therapie gegen das Dengue-Virus verfügbar. Zum Einsatz kommen nur supportives Flüssigkeitsmanagement sowie das Nichtopioid-Analgetikum Paracetamol. In kritischen Fällen erfolgt eine intensivmedizinische Betreuung. Diese beinhaltet eine i.v. Flüssigkeitsgabe und bei Bedarf den Einsatz von Erythrozyten- oder Vollblutkonserven (Berner et al., 2013; WHO, 2009). Dabei sollte besonders darauf geachtet werden, eine Flüssigkeitsüberladung des Körpers zu vermeiden (WHO, 2009).

2.2.2.1.4 Vorbeugung

Laut WHO Empfehlung umfasst die Prävention von Dengue-Fieber mehrere Punkte: ein sozialer und politischer Wandel, um sicher zu stellen, dass öffentliche Gesundheitsbehörden gestärkt werden und dass eine evidenzbasierte Entscheidungsfindung stattfindet, die Eliminierung von natürlichen Brutstätten durch Insektizide oder durch Beseitigung von stehenden Gewässern, der Einsatz von insektizid-behandelten Moskitonetzen und die individuelle Protektion vor Moskitostichen (WHO, 2009). Bis heute zeigte sich keine der Methoden ausreichend effektiv im Kampf gegen die Ausbreitung des Dengue-Virus (Heintze, Velasco Garrido, & Kroeger, 2007).

Eine weitere Option, um die Dengue-Virus-Transmission zu stoppen, stellt der Einsatz von *Wolbachia* dar. Eine australische Studie belegt, dass die Übertragung von Dengue-Fieber nach der Infektion der *Aedes* Moskitos mit dem Bakterium *Wolbachia* gestoppt wird (Anders et al., 2020).

Eine natürliche, lebenslange Immunität gegenüber einem speziellen Dengue-Virus-Serotyp entsteht nur nach durchgemachter Infektion. Gegenüber den verbleibenden Serotypen besteht jedoch keine Immunität. Eine Zweitinfektion birgt aufgrund vorbestehender Antikörper die Gefahr eines schweren Krankheitsverlaufs. Die Antikörper, die im Rahmen der ersten Infektion entstanden sind, ermöglichen dem zweiten Dengue-Virus-Serotyp das Eindringen in Fc-Rezeptor-tragende Zellen, wodurch eine verstärkte Virusreplikation stattfindet und der Patient stärker erkrankt.(Chen & Wilson, 2010; Rockstroh et al., 2015).

2.2.2.1.5 Aktuelle Entwicklungen

Bereits in den 1920er Jahren entstanden erste Versuche, einen Impfstoff gegen das Dengue-Virus zu entwickeln. Zurzeit befinden sich mehrere Impfstoffe in der Testphase und ein Impfstoff namens „Dengvaxia“ erlangte die Zulassung in 20 endemischen Ländern. Die komplexe Pathologie der Erkrankung und die Notwendigkeit, 4 Serotypen gleichzeitig zu kontrollieren, macht die Entwicklung eines optimalen Impfstoffes zur Herausforderung (Girard et al., 2020; Hombach, 2007). Der bisher zugelassene Impfstoff hat den Nachteil, dass er nur bei Dengue-seropositiven Menschen effektiv wirkt und die Symptome reduziert. Individuen, die zum Zeitpunkt der Impfung seronegativ waren, hatten ein erhöhtes Risiko, an einer schweren Dengue-Virus-Infektion zu erkranken. Demnach ist ein Screeningverfahren notwendig, um den Impfstoff ausschließlich seropositiven Individuen zu verabreichen (Guy & Jackson, 2016; Sridhar et al., 2018).

Der fehlende Durchbruch in der Impfstoffentwicklung verdeutlicht, wie wichtig die fortlaufende Forschung im Bereich der antiviralen Therapien gegen das Dengue-Virus ist. Bis heute wurden mehrere Zielmoleküle als Angriffspunkte für antivirale Therapien entdeckt. Ein möglicher Ansatz ist, den Eintritt des Virus in die menschliche Zelle über sein Hüllenprotein E zu verhindern (Sampath & Padmanabhan, 2009; Wang et al., 2009).

2.2.2.2 Vergleich von Malaria und Arboviren

Tabelle 1: Vergleich von Malaria und Arboviren

	Malaria	Dengue- Fieber	Yellow- Fieber	Zika- Fieber	Chikung unya- Fieber	O'nyong- nyong- Fieber	Rift- Valley- Fieber
Erreger	Plasmodien	Flavivirus	Flavivirus	Flavivirus	Togavirus	Togavirus	Bunyavirus
Symptome	-Fieber -Allg. Unwohlsein -Kopf- schmerzen -Glieder- schmerzen -Schüttel- frost -Übelkeit, Erbrechen	-Fieber -Knochen- ,Gelenk- ,Muskel- ,Kopf- ,Augen- schmerzen -Übelkeit, Erbrechen -Exanthem	-plötzliches Auftreten von Fieber -Allg. Unwohlsein -Kopf- schmerzen -Rücken- schmerzen -Schüttel- frost -Übelkeit, Erbrechen -Schwäche	80% asympto- matisch -Leichtes Fieber -Gelenk- schmerzen -Kopf- schmerzen -gastro- intestinale Beschwer- den -Ausschlag	-Fieber -Gelenk- schmerzen -Kopf-und Muskel- schmerzen -Exanthem	-Fieber -Gelenk- schmerzen -Lymph- adenopathie -Exanthem	-Fieber -Rücken- schmerzen -Schwäche
Referenz	(CDC, 2020a)	(CDC, 2019a)	(Berner et al., 2013; CDC, 2019b)	(Basarab, Bowman, Aarons, & Cropley, 2016; Duffy et al., 2009)	(Caglioti et al., 2013; CDC, 2018)	(Lanciotti et al., 1998)	(CDC, 2020b)

2.3 Ausgangsmaterialien

2.3.1 Vollblut und Serum

Die PCR, um Plasmodien-DNA zu detektieren, wird standardmäßig mit Vollblutproben durchgeführt. Die Studie von Bharti et al. (2007) konnte nachweisen, dass gefrorene Serumproben ebenfalls zu einem sensitiven Ergebnis führen und demnach gleichwertig genutzt werden können. Serumproben haben den Vorteil, dass sie leichter gelagert werden können und demnach eine retrospektive Malariadiagnostik zulassen (Bharti et al., 2007).

Dengue-Virus-Infektionen werden hingegen am häufigsten anhand von serologischen Tests diagnostiziert (Guzman et al., 2010). Goldstandard der Diagnostik ist ein ELISA-Verfahren, welches Dengue-IgM/IgG-Antikörper aus dem Patientenserum detektiert (Pal et al., 2014). Um das Dengue-Virus mittels PCR-Verfahren zu isolieren oder Antikörper durch ELISA-Methoden sichtbar zu machen, können neben Serumproben auch Vollblutproben verwendet werden (Herrera, Cabrera, García, & Gilart, 2006).

2.3.2 Dried Blood Spots

Filterpapierkarten mit getrockneten Vollblutproben (DBS) sind leicht zu lagern und zu verschicken und eignen sich deshalb besonders gut für seroepidemiologische Untersuchungen. Blutproben können durch einen Pikser an der Fingerkuppe oder an der Ferse gewonnen werden. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn eine venöse Blutentnahme, beispielsweise bei Kindern, schwierig ist. Initial wurden Filterpapierkarten zum Nachweis metabolischer Erkrankungen im Rahmen des Neugeborenen Screenings verwendet. Robert Guthrie gilt als der Erste, der 1963 getrocknetes Blut auf Filterpapierkarten zur Diagnostik von Phenylketonurie heranzog (Guthrie & Susi, 1963). Im Laufe der Zeit ist der Anwendungsbereich dieser Methode stark expandiert. So werden Filterpapierkarten seit vielen Jahren erfolgreich zum Nachweis von Antikörpern gegen das humane Immundefizienzvirus (engl.: human immunodeficiency virus/ HIV) eingesetzt. Die einfache Handhabung und minimale Invasivität der Filterpapierkarten machen sie zu einem optimalen Werkzeug für ressourcenarme Regionen (Farzadegan, Quinn, & Polk, 1987; Snijdewind et al., 2012).

Mithilfe von Filterpapierkarten können virale RNA, DNA, Antikörper, Proteine und antivirale Arzneimittel stabilisiert werden. Voraussetzung dafür ist, dass die Karten mit Trockenmittel in geschlossenen Plastikbeuteln bei Raumtemperatur für maximal

zwei Wochen gelagert werden. Bei längerer Aufbewahrungszeit wird empfohlen, die Proben bei -20 °C einzufrieren (Mei, Alexander, Adam, & Hannon, 2001; Snijdewind et al., 2012; Therrell et al., 1996).

In der Malariadiagnostik werden Filterpapierkarten seit mehreren Jahren angewendet. Eine Studie von Singhl et al. (1996) weist eine hohe Sensitivität der PCR zum Nachweis von Malaria aus DBS auf (Singhl et al., 1996). Weitere Studien belegen, dass selbst eine Lagerung der Filterpapierkarten von 5 Jahren keinen Verlust von genetischem Material nach sich zieht. Vermutlich ist die Stabilität der Nukleinsäuren jedoch abhängig von der Länge der PCR-Produkte. In diesem Bereich bedarf es weiterer Forschung (Wihokhoen, Dondorp, Turner, Woodrow, & Imwong, 2016). Kontrovers dazu steht die Studie von Schwartz et al. (2016). In dieser wird verdeutlicht, dass mit zunehmender Lagerungszeit eine starke Degradierung der DNA stattfindet. Die Art der Lagerung, die Methoden der Extraktion und Amplifikation nehmen starken Einfluss auf die Sensitivität der PCR. Es wird empfohlen, die Filterpapierkarten bei -20 °C in einem luftdichten Raum einzufrieren und die Trockenkügelchen regelmäßig zu wechseln. Die kalten Temperaturen und die geringe Luftfeuchtigkeit führen zu einer enzymatischen Hemmung, wodurch eine DNA-Fragmentierung verhindert wird (Corran et al., 2008; Schwartz et al., 2015).

Falsch-negative Ergebnisse der PCR aus DBS können bei Patienten mit niedriger Parasitämie beobachtet werden. Besonders *P. vivax*-Infektionen weisen eine geringe Parasitenzahl auf (Canier et al., 2015).

Für die Diagnostik von Dengue-Fieber wird standardmäßig venöses Vollblut gewonnen, jedoch stellen Filterpapierkarten mit getrockneten Blutproben eine Alternative dar (Prado et al., 2005). Das Ergebnis einer Studie von Anders et al. (2012) zeigt, dass die Sensitivität und die Spezifität der Dengue-Antikörperdiagnostik durch den Einsatz von DBS im Vergleich zu Plasma, welches aus venösem Vollblut gewonnen wird, keinen Verlust erfährt. Dies gilt gleichermaßen für die Detektion von NS1-Antigen aus DBS.

In Bezug auf das PCR-Verfahren wurde festgestellt, dass aus DBS ein geringerer Grad an RNA amplifiziert wurde als aus Plasma. Die Sensitivität und Spezifität verringert sich durch den Gebrauch von Filterpapierkarten geringfügig (Anders et al., 2012). Eine weitere Studie untersuchte die Stabilität der Virus-RNA auf Filterpapierkarten und demonstrierte, dass Dengue-RNA bei Temperaturen zwischen ca. 20 °C bis -70 °C für mindestens 9 Wochen stabil ist (Prado et al., 2005).

Nachteil der Filterpapierkarten ist, dass einige Viren infektiös bleiben. Die Infektiosität des Dengue-Virus bleibt für 48 h bei Raumtemperatur und für 72 h bei Temperaturen zwischen 4 °C bis -70 °C erhalten (Prado et al., 2005). Zudem variiert die Qualität der Filterpapierproben stark und kann durch falsche Blutentnahme, Feuchtigkeit und Schimmelpilzbefall negativ beeinflusst werden. Weiterhin zu beachten ist die mangelnde Standardisierung der Methodik. Um das große Potential der DBS in vollem Maße ausschöpfen zu können, sind weitere Forschungsarbeiten notwendig (Smit, Elliott, Peeling, Mabey, & Newton, 2014).

2.4 Fokus Tansania

Abbildung 8: Karte von Tansania mit dem Studienort Sengerema. Modifiziert. (Central Intelligence Agency, 2020b)



Tansania ist ein ostafrikanisches Land, welches an den indischen Ozean grenzt. Nördlich wird es von Kenia und südlich von Mosambik begrenzt. Weitere angrenzende Länder sind: Malawi, Sambia, demokratische Republik Kongo, Burundi, Ruanda und Uganda.

Seit dem Erreichen der Unabhängigkeit von den Briten in den 1960er Jahren, zählt die Insel Sansibar zur Republik Tansania.

Geographisch weist Tansania Besonderheiten auf. Einerseits beinhaltet das Land mit dem Kilimanjaro den höchsten Punkt Afrikas (5895m) und andererseits hat es Anteile am zweitgrößten See weltweit, dem Viktoria See.

Tansania zählt etwa 58,5 Millionen Einwohner (Stand 2020) und hat damit die größte Population aller ostafrikanischen Länder. Geschätzt ein Drittel der Bevölkerung lebt in ländlichen Regionen, so auch im Studienort Sengerema. Die schnelle Wachstumsrate von 2,71 % ist Auswirkung der hohen Fertilitätsrate von 4,8 Kindern pro Frau. Etwa zwei Drittel der Menschen weisen ein Lebensalter unter 25 Jahren auf. Das zu erwartende Lebensalter lag im Jahr 2017 bei Männern bei 64,6 Jahren und bei Frauen bei 68,9 Jahren. Während Malaria eine führende Todesursache bei Kindern unter 5 Jahren darstellt, bestimmen HIV-Infektionen die Mortalität im Erwachsenenalter.

Dar es Salaam ist die größte Stadt Tansanias und Verwaltungssitz der Regierung. Dodoma wurde 1996 zur nationalen Hauptstadt gewählt.

Neben der offiziellen Landessprache Swahili werden Englisch, Arabisch und viele verschiedene lokale Sprachen gesprochen (Central Intelligence Agency, 2020b; Institute for Health Metrics and Evaluation, 2020; National Bureau of Statistics, 2012).

Der Studienort Sengerema gehört zur Region Mwanza und ist in unmittelbarer Nähe zum Viktoria See gelegen. Der Umkreis von Sengerema umfasste im Jahr 2012 etwa 663000 Einwohner, von denen 88,4 % in ländlichen Regionen lebten.

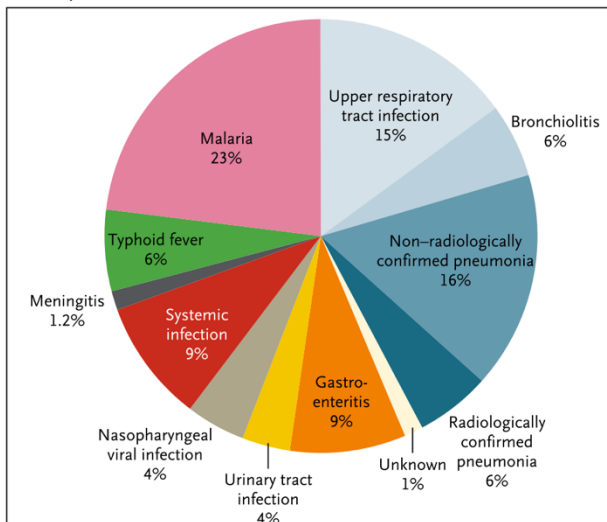
Die Vegetation und die Umgebung um den Viktoria See bieten hervorragende Konditionen für die Brutstätten der Malarialarven. Dies führt zu einer hohen Prävalenz an Malaria, besonders in den ländlichen Regionen und während der Regenzeit (D'Acremont, Lengeler, & Genton, 2010; Minakawa, Dida, Sonye, Futami, & Njenga, 2012).

2.4.1 Epidemiologie

Die Region um Mwanza, einschließlich Sengerema, verzeichnete zwischen den Jahren 2007-2012 einen Rückgang der Malariafälle bei Kindern unter 5 Jahren um 40 % (National Bureau of Statistics, 2008). Dadurch erhalten andere febrile Erkrankungen im Kindesalter eine zunehmend wichtige Bedeutung. Die Herausforderung bei einem negativen Malariatestergebnis ist, die Fieberursache mithilfe von POCT zu ermitteln und eine geeignete Therapie zu beginnen (D'Acremont et al., 2014). Atemwegsinfektionen stellen bei Kindern die häufigste Ursache von fieberhaften Erkrankungen, die nicht auf Malaria zurückzuführen sind dar (Muro, Reyburn, & Reyburn, 2015).

In Abbildung 9 ist das Ergebnis einer Studie von D'Acremont et al. (2014) zu sehen, welches einen Überblick über die Verteilung der Diagnosen von 133 fiebernden Kindern in Tansania gibt. Etwa die Hälfte aller Kinder präsentierte sich mit respiratorischen Beschwerden, wovon 81 % viraler Herkunft waren (D'Acremont et al., 2014).

Abbildung 9: Verteilung aller Diagnosen von 133 fiebernden Kindern in Tansania (D'Acremont et al., 2014).



Immer wieder ist Tansania von Dengue-Virus-Ausbrüchen betroffen. Im Jahr 1985 wurde eine Epidemie mit dem Dengue-Virus 3 auf der Insel Pemba registriert (Gubler et al., 1986). Seitdem treten immer wieder neue Dengue-Virus-Ausbrüche auf. Besonders betroffen ist die Küstenregion um Dar es Salaam und Tanga (Budodo et al., 2020; Public Library of Science, 2016). Mehrere Studien untersuchten die Seroprävalenz von Dengue-Fieber während interepidemischer Perioden. Keine dieser Studien konnte akute Dengue-Virus-Infektionen nachweisen (Budodo et al., 2020; Hertz et al., 2012; Kajeguka et al., 2016). In Bezug auf vergangene Dengue-Virus-Infektionen bieten die serologischen Daten aus Tansania uneinheitliche Ergebnisse. Während eine Studie in der Region Manyara und Morogoro keine frühere Exposition gegenüber dem Dengue-Virus nachweisen konnte, fand eine weitere Studie in Nord-Tansania unter allen Probanden eine Prävalenz von Dengue-IgG-Antikörpern von 11 % (Budodo et al., 2020; Hertz et al., 2012).

Seit der Entdeckung des Chikungunya-Virus im Jahr 1952 in Tansania zirkuliert es bis heute aktiv in Teilen des Landes (Budodo et al., 2020; Caglioti et al., 2013). Akute Chikungunya-Virus-Infektionen konnten in den letzten Jahren im Rahmen mehrerer Studien aufgedeckt werden. Zusätzlich fanden serologische Tests sowohl IgM- als auch IgG-Antikörper gegen das Chikungunya-Virus (Budodo et al., 2020; Hertz et al., 2012; Kajeguka et al., 2016).

Das Rift-Valley-Fieber-Virus erlangte durch einen Ausbruch im Jahr 2007 in Nord-, Zentral-, und Süd-Tansania großes Aufsehen. Neben der hohen Morbidität der Bevölkerung waren auch die Krankheits- und Todesfälle von Nutztieren dramatisch gestiegen (Bloland et al., 2010; Budodo et al., 2020).

Die Erkrankung durch das West-Nil-Fieber-Virus zählt zu den seltenen arboviralen Erkrankungen in Tansania. Dennoch zirkuliert das Virus vorwiegend im Norden des Landes, und akute Fälle konnten im Zeitraum von 2014-2015 detektiert werden (Faustine, Sabuni, Ndaro, Paul, & Chilongola, 2017; Hercik et al., 2017).

Die Gefahr des Gelbfieber-Virus wird durch die schnelle Ausbreitung des Virus während eines Ausbruchs in Angola im Jahr 2015 deutlich. Innerhalb kürzester Zeit erreichte das Gelbfieber-Virus die Nachbarländer Kongo und Kenia und schaffte sogar den Sprung nach China (Q. A. Ahmed & Memish, 2017).

Sowohl dem O'nyong nyong-Virus als auch dem Zika-Virus werden endemisches Vorkommen in Subsahara-Afrika zugesprochen (Boyer et al., 2018; Rezza, Chen, & Weaver, 2017).

Die Vielfalt der Fieberursachen, von denen die wenigsten anhand von klinischen Symptomen diagnostiziert werden können, verlangt die weitere Erforschung von arboviralen Infektionen und die Entwicklung von POCT (D'Acremont et al., 2014).

2.5 Fokus Burkina Faso

Abbildung 10: Karte von Burkina Faso mit dem Studienort Ouagadougou. Modifiziert (Central Intelligence Agency, 2020a)



Burkina Faso ist ein westafrikanisches Land, welches im Jahr 1960 die Unabhängigkeit von den Franzosen erlangte. Angrenzende Länder sind: Ghana, Elfenbeinküste, Mali, Niger, Benin und Togo.

Ouagadougou ist die Hauptstadt von Burkina Faso und der Studienort, an dem die Proben im Rahmen dieser Promotionsarbeit gesammelt wurden.

Die offizielle Landessprache ist Französisch, wobei 90 % der Bevölkerung lokale, afrikanische Sprachen sprechen.

Knapp 21 Millionen Menschen leben in Burkina Faso (Stand: 2020), von denen etwa ein Drittel in Städten angesiedelt ist. Die Gesellschaftsstruktur ist maßgeblich von jungen Menschen und einem schnellen Wachstum geprägt (Wachstumsrate: 3 %). Durchschnittlich bekommt jede Frau im Laufe ihres Lebens 6 Kinder.

Die Lebenserwartung liegt bei Frauen im Mittel bei 64,5 Jahren und bei Männern bei 60,9 Jahren. Damit liegt Burkina Faso im weltweiten Vergleich am Ende der Rangliste auf Platz 208 und 5 Plätze hinter Tansania.

Malariainfektionen und Erkrankungen des respiratorischen Systems stellen die häufigsten Todesursachen dar (Central Intelligence Agency, 2020a; Institute for Health Metrics and Evaluation, 2017).

2.5.1 Epidemiologie

Malaria spielt als bedeutendste parasitäre Erkrankung der Welt eine große Rolle in Burkina Faso. Die Erkrankung tritt holoendemisch auf, verstärkt während oder kurz nach der Regenzeit zwischen Juni und Oktober. Die meisten Malariainfektionen

werden durch *Plasmodium falciparum* verursacht (Müller et al., 2001; Traoré, 2013; White et al., 2014).

Seit 1925 wurden mehrere Dengue-Virus-Ausbrüche in Burkina Faso erfasst (Amarasinghe, Kuritsky, Letson, & Margolis, 2011). Zuletzt kam es im Jahr 2017 zu einem großen Ausbruch mit knapp 6000 bestätigten Dengue-Fieber-Fällen. Diese wiederkehrenden Epidemien verdeutlichen, welche wichtige Rolle das Virus spielt, auch wenn seine Epidemiologie in Afrika weitestgehend unbekannt ist und Dengue-Fieber unterdiagnostiziert wird (Lim ID et al., 2019; WHO, 2018a).

Eine Studie von 2016 bestätigte, dass *Aedes aegypti* die vorherrschende Mosquitoart in Burkina Faso ist. Damit ist die Grundvoraussetzung für das Vorkommen von Arboviren in Burkina Faso gegeben. Tatsächlich gelang die Isolation von Gelbfieber-Viren aus Moskitos in den Jahren 1983-1986. Zudem konnten in den letzten Jahren mehrere Gelbfieber-Virus- und Zika-Virus-Ausbrüche in der Region um Ouagadougou erfasst werden (Ouattara et al., 2019; Robert et al., 1993).

2.6 Hypothesen

- Am Studienort Sengerema wird Malaria überdiagnostiziert und übertherapiert.
- Am Studienort Sengerema kommen arbovirale Infektionen, besonders Dengue-Fieber-Infektionen vor.
- Akute Dengue-Fieber-Infektionen können mittels NS1-Antigen-Schnelltest in Sengerema diagnostiziert werden.
- Dried Blood Spots können zur Konservierung von Dengue-Virus-RNA herangezogen werden.
- Das Studiendesign aus Sengerema kann auf Burkina Faso übertragen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 2: Allgemeine Materialien

Material	Firma	Herkunft
Handschuhe	SATRA Technology	Northamptonshire, UK
OP- Maske	Farstar medical GmbH	Barsbüttel, DE
Pipetten	Eppendorf Research	Hamburg, DE
Pipettenspitzen	2-100 µl Biosphere Filter Tips	Nümbrecht, DE
	100-1000 µl Biosphere Filter Tips	Nümbrecht, DE
	10 µl Safe Seal SurPhob Spitzen, Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, DE
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, DE
Aufbewahrungsboxen Mikroröhren + Einsätze	Ratiolab	Dreieich, DE

Tabelle 3: Verwendete Materialien in Tansania

Material	Firma	Herkunft
Digital Fieberthermometer	Med Comfort (AMPri)	Winsen, DE
Stethoskop	Littmann	Langenhorn, DE
Kinder-Pulsoxymeter	Oxygeno-HealthCare GmbH	Ingolstadt, DE
2 ml Einmalspritzen	B. Braun	Melsungen, DE
24G Venenkatheter	B. Braun	Melsungen, DE
21G Butterflies	B. Braun	Melsungen, DE
Unistik 3 Extra 21G Lanzetten	Owen Mumford Ltd.	Woodstock, Oxfordshire, UK
MultiStix Urin	Siemens	München, DE
octenisept	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, DE
Whatman 903 Protein Saver Card	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
NADAL™ Malaria 4	Nal von Minden GmbH	Moers, DE

Species Test (MRDT P.f./Pan)		
CareStart™ Malaria Pf/Pan Combo Test	American Access Bio Inc.	Somerset, NJ, USA
Panbio Dengue Early Rapid	Virotech Diagnostics GmbH	Rüsselsheim, DE
Desi Dry 5g Silica Gel Säckchen mit Indikator	ThoMar OHG	Lütau, DE
Plastic ziploc bag 4x6in.	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
BioPack 2 Kühlboxen für Transport	Air Sea Containers Ltd	UK

Tabelle 4: Verwendete Materialien für das Stanzen der Filterkarten und für das Eluieren der DBS

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Mixing Block MB-102	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, DE
Vortex Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, DE
Materialien		
Material	Firma	Herkunft
Stanzmatte	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Biopsiestanze (Ø3mm)	Kai Europe GmbH	Solingen, DE
Mikroschraubröhrchen 1,5 ml	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, DE
Mikroschraubröhrchen 2ml	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, DE
Cellstar Tubes 50ml	greiner bio-one	Kremsmünster, AU
Nukleasefreies Wasser, steril und autoklaviert, DEPC-behandelt (als H ₂ O bezeichnet)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE

Tabelle 5: Verwendete Materialien für die RNA-Extraktion

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Biosafe Holton LaminAir	ThermoFisher Scientific	Dreieich, DE
Thermomixer comfort (2ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Biofuge fresco	Heraeus, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Materialien		
Material	Firma	Herkunft
<i>High Pure Viral Nucleic Acid Kit</i>	Roche Diagnostics	Mannheim, DE
Binding Buffer		
Poly(A)		
Proteinase K		
Inhibitor Removal Buffer		
Wash Buffer		
Elution Buffer		
High Pure Spin Filter Tubes		
High Pure Collection Tubes		
Ethanol, 100%ig	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
Isopropanol	Merck AG	Darmstadt, DE
Positiv Kontrollen	Robert-Koch-Institut	Berlin, DE
Negativ Kontrolle (NaCl)	Biomérieux Deutschland GmbH	Nürtingen, DE
Nukleasefreies Wasser, steril und autoklaviert, DEPC- behandelt	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Reaktionsgefäß 1,6ml	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, DE
Mikroschraubröhrchen 0,5ml	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, DE

Tabelle 6: Verwendete Materialien für die Reverse Transkription

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Ultraviolett Sterilizing PCR Workstation	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen, DE
Mikrozentrifuge (Pico 17, PCR-Tubes)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Thermo-Cycler PTC-200 (RT+PCR)	GMI Inc.	Ramsey, MN USA
Mastercycler	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Materialien		
Material	Firma	Herkunft
dNTPSet PCR Grade, dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostics	Mannheim, DE
5x First Strand Buffer	Invitrogen	Carlsbad, CA USA
0,1M DTT	Invitrogen	Carlsbad, CA USA
Hexanukleotide Mix, 10x conc.	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Recombinant RNasin, Ribonuclease Inhibitor	Promega	Madison, WI USA
Super Script II Reverse Transcriptase 200U/μl	Invitrogen EC-Nummer 2.7.7.49	Carlsbad, CA USA

Tabelle 7: Verwendete Materialien für die Multiplex-PCR und die Singleplex-PCR

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Ultraviolett Sterilizing PCR Workstation	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen, DE
Mikrozentrifuge (Pico 17, PCR-Tubes)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Thermo-Cycler PTC-200 (RT+PCR)	GMI Inc.	Ramsey, MN USA
Materialien		
Material	Firma	Herkunft

Nukleasefreies Wasser, steril und autoklaviert, DEPC- behandelt	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
10x AccuPrime PCR Buffer I	Invitrogen	Carlsbad, CA USA
Digoxigenin-11-dUTP	Jena Bioscience	Jena, DE
AccuPrime Taq DNA Polymerase	Invitrogen EC-Nummer 2.7.7.7	Carlsbad, CA USA
MasterMix	Siehe Primer ausTabelle 11	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific

Tabelle 8: Verwendete Positivkontrollen für die RT-mPCR

Positivkontrollen		
Erreger	Bezogen von	Art der Probe
Dengue-Virus (DENV)	Bestand Labor pädiatrische Immunologie Mainz	Inaktivierter Zellkulturüberstand (Vero-Zell-Lysat)
West-Nil-Virus (WNV)	Sera Care Life Sciences	Inaktivierter Zellkulturüberstand WNV Lineage I #0410-0002
	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand Lineage Kunjin / New York
Zika-Virus (ZIKV)	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand (Lineage MR766, Vero-Zell- Lysat)
Gelbfieber-Virus (YFV)	Robert Koch Institut Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand
Semliki-Forest- Virus (SFV)	European Virus Archive goes Global (EVAg)	Mithilfe des 'QIAamp Viral RNA Mini Kit Qiagen' präparierte RNA aus Zellkulturüberstand
O'nyong-nyong- Virus (ONNV)	European Virus Archive goes Global (EVAg)	inaktivierter Zellkulturüberstand aus Vero-Zell-Lysat, Lineage Dakar 234
Chikungunya-Virus (CHIKV)	Institut for Virology- Universitätsklinikum Freiburg	gefriergetrocknete PCR- Probe, Lineage G10845

Rift-Valley-Virus (RVFV)	Robert Koch Institut, Berlin	Inaktivierter Zellkulturüberstand
Plasmodium falciparum	Discovery Life Sciences P.fal DLS16-11865 VB	Vollblut oder Serum von Malariapatienten, mikroskopisch überprüfte Proben mit hoher Erregerlast
Plasmodium vivax	P.viv DLS15-08486	
Plasmodium malariae	Serum P.mal Serum	

Tabelle 9: Verwendete Materialien für die Herstellung des Agarose-Gels

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Erlenmeyer Kolben 200/500ml	Simax	Prague, CZ
Elektrophorese-Schlitten+ Kämme	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, DE
Waage	AS Wägetechnik GmbH	Garching, DE
Mikrowelle	Electrolux Hausgeräte GmbH	Nürnberg, DE
Materialien		
Material	Firma	Herkunft
TBE-Puffer (0,5%ig) (Ampuwa+10% TBE Puffer)	Ampuwa: Fresenius kabi GmbH	Bad Homburg, DE
	TBE-Puffer: Invitrogen	Carlsbad, CA USA
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, DE
Ethidiumbromid 0,95mg/ml	Sigma Chemie GmbH	Deisenhofen, DE

Tabelle 10: Verwendete Materialien für die Agarose- Gelelektrophorese

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Elektrophorese-Einheit incl. Kammer, Schlitten + Kämme	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, DE
Ultraviolett- Transilluminator +	Biometra GmbH	Göttingen, DE

Fotodrucker		
Materialien		
Material	Firma	Herkunft
Nitrilhandschuhe	Microflex	Reno, NV US
Parafilm Laboratory Film	Bemis Company	Neenah, US
6xDNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA US
Längenstandard, pUC19 DNA/Mspl (HpaII)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA US

Tabelle 11: Verwendete Materialien für die ELISA-Hybridisierung

Geräte		
Gerät	Firma	Herkunft
Multipipette plus	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Combitips advanced 5ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Accu-jet	Brand GmbH+CO KG	Budenheim, DE
Serological pipette,sterile	Greiner bio-one	Kremsmünster, DE
Brutschrank (ELISA- Platten)	Heraeus, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
ELISA Washer + Reader	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Materialien		
Material	Firma	Herkunft
Hybridization Buffer	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Sonden (100pm/μl), siehe Tabelle 11	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, USA
Mini-Röhren 5 + 10ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, DE
StreptaWell High Bind, transparent,12x8-well	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Denaturierungslösung	Ampuwa: Fresenius kabi GmbH	Bad Homburg, DE
	0,2N NaOH: AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
	0,1% SDS: AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Konjugatpuffer	Ampuwa: Fresenius kabi	Bad Homburg, De

	GmbH	
	100mM Tris HCl: Merck GmbH	Darmstadt, DE
	150mM NaCl: Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
	anti-DIG-POD: Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
ABTS-Puffer (0,5%ig)	Ampuwa: Fresenius kabi GmbH	Bad Homburg, DE
	5ml ABTS Buffer: Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
	1 ABTS-Tablette: Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE

Tabelle 12: Verwendete Primer (Forward+Reverse) und Sonden. Modifiziert (Daniel, 2019)

		Sequenz 5' nach 3'		Fragment -länge	Literatur	
ARBOVIREN	Flaviviren	Dengue- Virus	DENV- Pan	Forw. (D1): TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG Rev. (D2): TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	511 bp	(Chien et al., 2006)
				Sonde: Mix aus DENV1-4		
			DENV1	Forw. (D1): TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG Rev. (TS1): CCCGTAACACTTTGATCGCT	208 bp	
				Sonde: TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGG		
			DENV2	Forw. (D1): TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG Rev (TS2): CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT	119 bp	
				Sonde: AAGAGACGTGAGCAGGAAGGAAGGGGGAGC		
			DENV3	Forw. (D1): TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG Rev. (TS3): TAACATCATCATGAGACAGAGC	288 bp	
				Sonde: TGAGAGATATTTCCAAGATACCCGGAGGAG		
			DENV4	Forw. (D1): TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG Rev. (TS4): TTCTCCCGTTTCAGGATGTTC	260 bp	
				Sonde: TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC		
		West-Nil- Virus	WNV	Forw.: CAGACCACGCTACGGCG Rev.: CTAGGGCCGCGTGGG	116 bp	(Kauffman et al., 2003)
				Sonde: TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT		
Zika-Virus	ZIKV	Forw.: CAGCTGGCATCATGAAGAAAYC Rev.1: CACTTGTCCCATCTTCTTCTCC Rev.2: CACCTGTCCCATCTTTTCTCC	100 bp	(Waggoner et al., 2016)		

Alphaviren				Sonde: CYGTTGTGGATGGAATAGTGG			
	Gelb- fieber- Virus	YFV	Forw.: GCACGGATGTAACAGACTGAAGA Rev.: CCAGGCCGAACCTGTCAT		83 bp	(Fernandes- Monteiro et al., 2015)	
			Sonde: CGACTGTGTGGTCCGGCCCTC				
	Semliki- Forest- Virus	SFV	Forw.: ACAGACTGTCACTGAGCAG Rev.: GTGACCATCTACTGCAGAGA		145 bp	(Puglia et al., 2013)	
			Sonde: GTGACCATCTACTGCAGAGA				
	O'Nyong- nyong- Virus	ONNV	Forw.: GCAGGGAGGCCAGGACAGT Rev.: GCCCCTTTTTCYTTGAGCCAGTA		148 bp	(Liu et al., 2016)	
			Sonde: TGTATTGCTCCTGCCGCTGG				
	Chikun- gunya- Virus	CHIKV	Forw.: TGATCCCGACTCAACCATCCT Rev.: GGCAAACGCAGTGGTACTTCCT		81 bp	(Panning, Grywna, Van Esbroeck, Emmerich, & Drosten, 2008)	
			Sonde: TCCGACATCATCCTCCTTGCTGGC				
	Bunyaviren	Rift-Valley- Fieber- Virus	RVFV	Forw.: TGAAAATTCCTGAGACACATGG Rev.: ACTTCCTTGCATCATCTGATG		69 bp	(Liu et al., 2016)
				Sonde: CACAAGTCCACACAGGCCCTTACAT			

PROTOZOEN	Plasmo- dium spp.	MAL- Pan (PLU3)	Forw.: GCTCTTTCTTGATTTCTTGGATG Rev.: AGCAGGTTAAGATCTCGTTTCG		100 bp	(Kamau, Alemayehu, Feghali, Saunders, & Ockenhouse , 2013)
			Sonde: ATGGCCGTTTTAGTTCGTG			
	P.falci- parum	P.FAL	Forw.: CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA Rev.: TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA		100bp	(Perandin et al., 2004)
			Sonde: TG TTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCA			
	P.vivax	P.VIV	Forw.: ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT Rev.: ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC		141bp	(Perandin et al., 2004)
			Sonde: TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC			
	P.malariae	P.MAL	Forw.: AGTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA Rev.: CAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA		166 bp	(Veron, Simon, & Carme, 2009)
			Sonde: ATGAGTGTTTCTTTAGATAGC			

3.2 Methoden

3.2.1 Etablierung der RT-mPCR

Die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Methoden wurden im Zuge mehrerer Vorarbeiten etabliert. Basierend auf einer RT-mPCR-Methode für respiratorische Erreger (Gröndahl et al., 1999) wurde eine RT-mPCR-Methode entwickelt, welche Malariaparasiten und 8 Arboviren detektieren kann (Daniel, 2019; Gröndahl et al., 1999; Huth et al., 2021; Klüber, 2016; Koliopoulos et al., 2021; Medina Montano, 2017)

3.2.1.1 Stanzen der Dried Blood Spots aus den Filterkarten

In dieser Studie wurden „Whatman 903“ Filterpapierkarten als Transportmedium für die Vollblutproben der Patienten verwendet. Der erste Schritt zur Analyse der gesammelten Patientenproben beinhaltete das Ausstanzen von Punches aus den Filterkarten. Dazu wurden mithilfe von Einmalbiopsiestanzen pro Patientenprobe jeweils 6 Punches mit einem Durchmesser von 3 mm ausgestanzt und in einem Mikroschraubröhrchen (1,5 ml) für den folgenden Elutionsschritt gesammelt. Falls weitere Punches aus den Filterkarten gewonnen werden konnten, wurden diese in Mikroschraubröhrchen (2 ml) zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren. Jedes Mikroschraubröhrchen wurde mit einem eindeutig dem Patienten zuzuordnenden Code versehen. Als Unterlage zum Stanzen diente eine Stanzmatte, die nach jeder Probe gründlich mit Terralin gereinigt wurde. Zur desinfizierenden Reinigung der Einmalbiopsiestanzen wurden diese für jeweils 1-2 min zuerst in Wasser, danach in eine Terralin-Lösung und abschließend wieder in Wasser gestellt. Jede Einmalbiopsiestanze wurde für ca. 10 Filterkarten verwendet.

3.2.1.2 Elution von Dried Blood Spots

Für die Elution der DBS wurde 300 µl Wasser in jedes Mikroschraubröhrchen (1,5 ml) mit jeweils 6 ausgestanzten Punches hinzugefügt. Das Herauslösen des getrockneten Vollbluts aus den Punches erfolgte, indem die Proben für 1 h bei 60 °C und 750 rpm in einem Mixing Block gestellt wurden. Alle 15 min wurde jede Probe mithilfe des Vortexers durchmischt. Nach vollendetem Elutionsvorgang wurde das gesamte Eluat (ca. 300 µl) in ein neues Mikroschraubröhrchen (1,5 ml) pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.1.3 Isolierung

Für den gesamten Vorgang der Nukleinsäureisolation wurde das „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ nach Angaben des Herstellers Roche Diagnostics GmbH verwendet.

Im Rahmen der Vorarbeiten von G. C. Medina-Montano (Medina Montano, 2017) wurden die Nukleinsäuren der Positivkontrollen isoliert und die Negativkontrollen, bestehend aus 200 µl 0,9 % NaCl, vorbereitet. Pro Isolierungsdurchgang mit 18 Proben wurde eine Positivkontrolle, bestehend aus 20 µl Isolat der Positivkontrolle und 200 µl Wasser, und zwei Negativkontrollen zum Ausschluss möglicher Kontaminationen mit isoliert. Alle folgenden Arbeitsschritte, in denen die Proben einem Pipettiervorgang unterzogen wurden, fanden unter der Sterilbank statt.

Im ersten Schritt wurde das Eluat der jeweiligen Probe, die Proteinase K, die Poly(A) sowie die Positivkontrolle aufgetaut. Die Arbeitslösung wurde mit „Binding Buffer“ und „Poly(A)“ im Verhältnis 50:1 frisch angesetzt. Anschließend wurde jede aufgetaute Eluatprobe mit jeweils 200 µl Arbeitslösung und 50 µl Proteinase K versehen und mit dem Vortexer durchmischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72 °C und 500 rpm in einem Thermomixer. Nachdem die Proben für 30 s bei 8000 UpM zentrifugiert wurden, erfolgte die Zugabe von 100 µl Isopropanol (Abweichung von den Herstellerangaben). Das gesamte Gemisch wurde nun in einen Filter pipettiert, der auf einem „Collection Tube“ steckte. Durch die anschließende Zentrifugierung für 1 min bei 8000 UpM, sammelte sich das gefilterte Gemisch im „Collection Tube“. Das Filtrat wurde verworfen, während der Filter auf einem neuen „Collection Tube“ für die weiteren Waschvorgänge verwendet wurde. Dabei wurde der Filter zunächst mit 500 µl „Inhibitor Removal Buffer“ benetzt, anschließend für 1 min bei 8000 UpM zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die folgenden zwei Waschvorgänge mit jeweils 450 µl „Wash Buffer“ wurden analog durchgeführt. Einzig die Umdrehungszahl beim zweiten Zentrifugieren erhöhte sich auf 13000 UpM. Als letzter Schritt wurden 50 µl in jeden Filter gegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 min folgte eine letzte Zentrifugierung für 1 min bei 8000 UpM. Das nun entstandene Filtrat ist das Ergebnis der RNA-Isolierung und wurde in Mikroschraubröhrchen (2 ml) bei -20 °C eingefroren oder direkt im Anschluss für die RT-mPCR verwendet.

Um Kontaminationen durch verunreinigte Arbeitsflächen vorzubeugen, wurden alle Arbeitsflächen abschließend mit Terralin behandelt und die UV-Lampe der Sterilbank zusätzlich für 30 min eingeschaltet.

3.2.1.4 Reverse Transkription

Der Schritt der Reversen Transkription erfolgte, um die isolierten Nukleinsäuren in cDNA umzuschreiben. Das Protokoll für die Zusammenstellung des Master-Mixes wurde gleichermaßen in der vorausgegangenen Arbeit von G. C. Medina-Montano verwendet (Medina Montano, 2017). Jeder Ansatz mit maximal 18 Proben enthielt zusätzlich eine Positivkontrolle, zwei im vorherigen Schritt isolierte Negativkontrollen und zwei Negativkontrollen, bestehend aus 15 µl H₂O und 4,5 µl H₂O + 10,5 µl Master-Mix.

Tabelle 13: Master-Mix Ansatz für die Reverse Transkription

Master Mix für 1 Probe		Ansatz	Mastercycler Programm
1,5 µl	dNTP (10 mM)	10,5 µl Master-Mix + 4,5 µl Probe, bzw. isolierte Negativkontrolle	1. 10 min → 25 °C
1 µl	5xRT rbx/MgCl ₂		2. 50 min → 42 °C
0,5 µl	0,1 M DTT		3. 5 min → 90 °C
0,25 µl	pdN6		
0,125 µl	RNasin		
0,125 µl	SuperScript II		

Die Herstellung des Master-Mixes erfolgte in der „Biosafety Cabin level 1“, welche anschließend mit Terralin und UV-Licht desinfiziert wurde.

3.2.1.5 Multiplex-PCR

Die Etablierung der in dieser Promotionsarbeit verwendeten mPCR begann mit der Masterarbeit von J. Klüber (2016), in der sie die Arboviren CHIKV, DENV und WNV in einem Master-Mix zusammenfasste (Klüber, 2016). Durch die darauffolgende Masterarbeit von G. C. Medina-Montano (2017) wurde das Panel um die Arboviren YFV, RVFV, ZIKV, SFV, ONNV und die 4 *Plasmodium* Spezies der Malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*) erweitert (Medina Montano, 2017).

Das Protokoll für die Zusammenstellung des Primer-Mixes und das Programm des Mastercyclers wurde in gleicher Weise aus der Publikation von B. Gröndahl et. al. (1999) übernommen und setzt sich wie in Tabelle 14 ersichtlich zusammen (Gröndahl et al., 1999).

Tabelle 14: Primer-Mix Ansatz für Multiplex-PCR

Primer Mix Multiplex-PCR für 1 Probe		Ansatz	Mastercycler-Programm
15,5 µl	DEPC H ₂ O	15 µl RT Produkt + 20 µl Primer-Mix	35 Zyklen: 94 °C für 30 s (5 min im ersten Zyklus) 55 °C für 20 s 72 °C für 40 s (10 min im letzten Zyklus) 4 °C → ∞
2,7 µl	10x Puffer		
0,5 µl	Accu-Prime Polymerase		
1,1 µl	Primer Mix(10 pm/µl)		
0,3 µl	Digoxigenin 11-dUTP		

3.2.1.6 Singleplex-PCR

Eine Singleplex-PCR wurde durchgeführt, wenn die Gelelektrophorese oder die ELISA-Hybridisierungsreaktion undeutliche Ergebnisse lieferte und eine spezifischere Detektion erfolgen sollte. Dazu wurde ein Primer-Mix, der nur die Primer für die fraglich vorhandenen Erreger enthält, nach den Vorgaben des Protokolls aus der Publikation von B. Gröndahl et.al. (1999) erstellt (Gröndahl et al., 1999).

Tabelle 15: Primer-Mix Ansatz für Singleplex-PCR

Primer-Mix Singleplex-PCR für 1 Probe		Ansatz	Mastercycler-Protokoll
11,6µl	DEPC H ₂ O	5µl RT Produkt + 15µl Primer- Mix	43 Zyklen: 94°C für 30s (5min im ersten Zyklus) 55°C für 20s 72°C für 40s (10min im letzten Zyklus) 4°C → ∞
2µl	10x Puffer		
0,4µl	AccuPrime taq-Polymerase		
0,8µl	Primer (Forw. + Rev. je 5,5pmol/µl)		
0,2µl	Digoxigenin 11-dUTP		

3.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese schließt sich an die RT-mPCR an, um die amplifizierten Nukleinsäuren nach ihrer Größe zu trennen und sie in Form von Banden auf dem Agarose-Gel sichtbar zu machen. Im Voraus wurde das Agarose-Gel gegossen. Dazu wurden 2 g Agarosepulver mit 100 ml 0,5 %igem TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben in einer Mikrowelle für ca. 4 min erhitzt. Sobald sich das Agarosepulver vollständig verflüssigt hatte, wurden 40 µl Ethidiumbromid

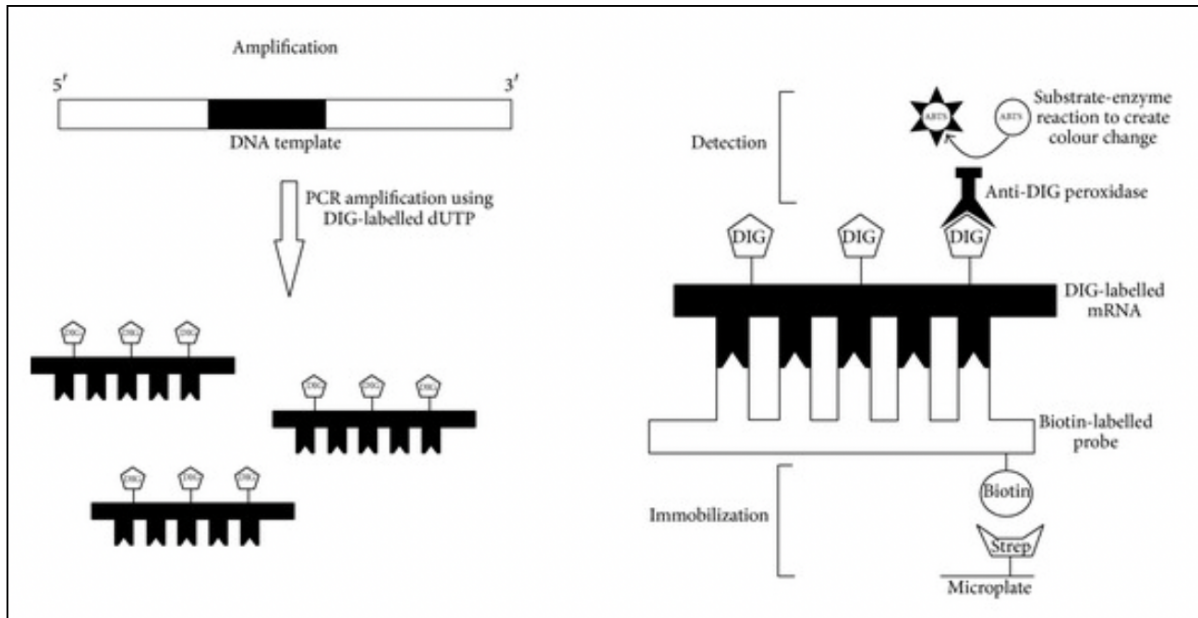
hinzugegeben und das fertige Gelgemisch in einen Schlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen.

Nach 30 min war das Gel ausgehärtet und die Kämmen konnten herausgenommen werden. Die entstandenen Taschen wurden mit 0,5 %igem TBE-Puffer befüllt. Auf einem Stück Parafilm wurde pro Probe ein ca. 1 µl großer Tropfen Auftragspuffer pipettiert, welcher für die Visualisierung der DNA-Migration während der Gelelektrophorese von Bedeutung ist. Anschließend wurden 10 µl des RT-mPCR Produkts der jeweiligen Probe mit einem dieser Tropfen gemischt und in eine Geltasche gegeben. In die erste Tasche wurden 3 µl des Längenstandards als Referenz pipettiert. Das mit den Proben beladene Gel wurde in die mit 0,5 %igem TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer gestellt. Bei 130 V wanderten die negativ geladenen Nukleinsäuren für 30 min zur positiven Anode und trennten sich dabei nach ihrer Ladung und Größe auf. Die Visualisierung der im Gel gelaufenen Banden erfolgte im Nachhinein unter einer UV-Lampe mithilfe des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids.

3.2.1.8 ELISA-Hybridisierungsreaktion

Die Banden der Agarose-Gelelektrophorese lieferten im Vergleich mit dem Längenstandard einen Verdacht, ob eine Infektion mit einem Arbovirus oder einer Plasmodium-Spezies stattgefunden hatte oder nicht. Jedoch konnte keine eindeutige Aussage bezüglich des spezifischen Erregers getroffen werden. Die ELISA-Hybridisierungsreaktion ist eine sehr sensitive und spezifische Immundetektion von Nukleinsäuren und wurde zur genaueren Identifikation der amplifizierten Nukleinsäuren herangezogen. Der biochemische Ablauf der ELISA-Hybridisierungsreaktion ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

Abbildung 11: Schematischer Ablauf der ELISA-Hybridisierungsreaktion



Die unter Anwesenheit von Digoxigenin-11-dUTP amplifizierten Nukleinsäuren werden zuerst denaturiert und hybridisieren dann mit biotinylierten Sonden an der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte. Durch die starke Affinität von Biotin zu Streptavidin, binden nur spezifische Erreger-Nukleinsäuren, während unspezifische PCR-Produkte in folgenden Waschvorgängen entfernt werden. Nach der Immobilisation wird ein Enzym-gekoppelter Digoxigenin-Antikörper zur Detektion hinzugegeben. Die Peroxidase katalysiert durch Zugabe des Substrates ABTS eine blau-grüne Farbumschlagsreaktion, welche durch ein Spektrophotometer messbar ist (Sue, Yeap, Omar, & Tan, 2014).

Im ersten Schritt erfolgte eine Denaturierung der PCR-Produkte, indem jede Probe mit 150 µl Denaturierungslösung inkubiert wurde.

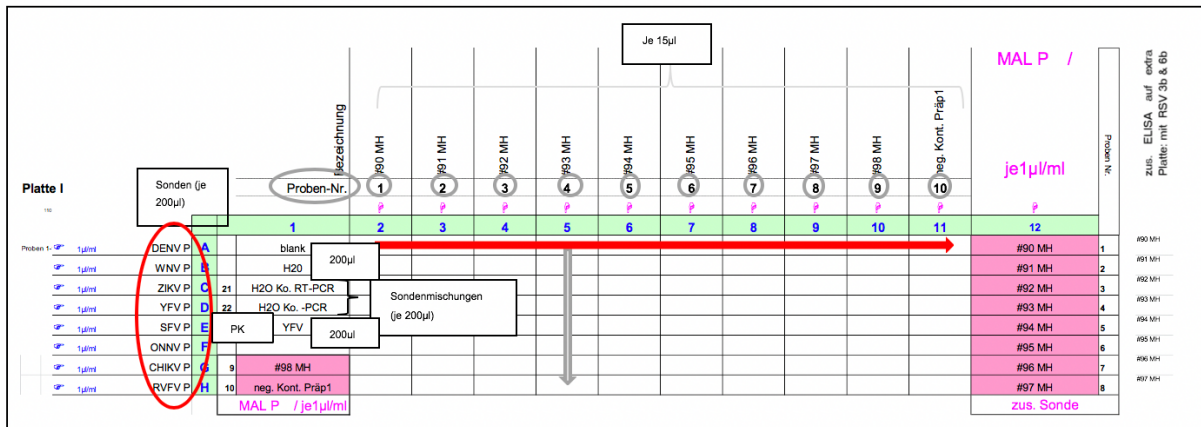
Für eine Mikrotiterplatte mit 96 Kammern wurde für jede Sonde eine Mischung aus 2 ml Hybridisierungspuffer und 2 µl der jeweiligen Sonde vorbereitet. Eine Platte wurde nach dem Pipettierschema in Abbildung 12 pipettiert, mit einer Folie verschlossen und für 1½ h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Platte mithilfe des Tecan-Washers gewaschen und zur Entfernung der Spülflüssigkeit ausgeklopft. Danach wurden 200 µl eines Gemischs aus 20 ml Konjugatpuffer und 4 µl Anti-DIG in jede Kammer bis auf die Kammer A1 pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 45 min im Brutschrank. Nachdem die Platte ein weiteres Mal dem Waschvorgang unterzogen wurde, wurden in jede Kammer 200 µl des ABTS-Substrates hinzugegeben. Die Farbumschlagsreaktion erfolgte während der letzten 10-minütigen Inkubation im Brutschrank.

Abschließend wurde die Stärke der Farbreaktion über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mithilfe des Tecan-Readers gemessen und gespeichert. Der Durchgang galt dabei als aussagekräftig, wenn die Negativkontrollen OD-Werte unter 0,1 bei 405 nm hatten. Bei OD-Werten zwischen 0,1-0,2 wurde eine Nachtestung in Form

einer singleplex-PCR durchgeführt. Alle OD-Werte $\geq 0,2$ galten als positive Ergebnisse.

Alle Arbeitsflächen wurden gründlich mit Terralin desinfiziert und der Tecan-Washer beim Ein- und Ausschalten durch Spülvorgänge gereinigt.

Abbildung 12: Schema zum Pipettieren einer ELISA-Mikrotiterplatte



In das Feld A1 wurde nur im letzten Schritt ABTS pipettiert, sodass dieses als Leerwert für das Spektrophotometer diente. In das Feld B1 wurde Hybridisierungspuffer pipettiert und in die Felder C1 und D1 ein Gemisch aus allen Sondenmischungen. Diese Felder dienen als Negativkontrollen, um mögliche Kontaminationen während der ELISA Hybridisierungsreaktion ausschließen zu können. Das Feld E1 enthält nur die Sonde der Positivkontrolle.

3.2.2 Forschungsprojekt Tansania

3.2.2.1 Hintergrund des Projekts und Ethik

Das Projekt zur Erhebung der Prävalenz von arboviralen Infektionen bei fiebernden Kindern mit Malaria ähnlichen Symptomen und der Etablierung einer Multiplex-PCR zur Detektion dieser Erreger in Zusammenarbeit mit dem Bugando Medical Center in Mwanza, Tansania, existiert seit 2016. Mittlerweile besteht eine offizielle Klinikpartnerschaft zwischen der Kinderklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, dem Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig und dem Bugando Medical Center in Mwanza, Tansania über die Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ). Erste Ziele der Klinikpartnerschaft, wie die Erweiterung des Panels der mPCR auf 9 pathogene Erreger, sind bereits erfolgreich erreicht worden. Die Kooperation verfolgt als weitere Ziele die kontinuierliche Erhebung eines großen, aussagekräftigen Patientenkollektivs über den Zeitraum von 2 Jahren, die Optimierung des Algorithmus zur Probengewinnung, -aufbewahrung und -auswertung, sowie die Implementierung der etablierten mPCR-Methode im Bugando Medical Center in Mwanza, Tansania.

Langfristiges Ziel ist die Simplifizierung der mPCR-Methode, um den klinischen Alltag in Tansania, bezogen auf die Diagnostik und Therapie von arboviralen Infektionen und Malaria, erheblich zu erleichtern.

Der Ethikantrag wurde zuerst von der Catholic University of Health and Allied Sciences (CUHAS) genehmigt und seit 2017 zusätzlich von dem National Institute for Medical Research (NIMRI). Beide Ethikanträge werden jährlich verlängert.

3.2.2.2 Studienort

Der Studienort für die Datenerhebung und Blutprobengewinnung dieser Promotionsarbeit befindet sich in Sengerema, in der Provinz Mwanza. Das Sengerema Designated District Hospital (SDDH) ist ein Missionskrankenhaus, das 1959 gegründet wurde und sich zurzeit unter der Leitung einer holländischen Missionsärztin befindet. Es umfasst 316 Betten und verfügt über einen großen Ambulanzbereich, der täglich von etwa 300-400 Menschen besucht wird. Das Krankenhaus umfasst 9 Stationen, aufgeteilt auf 2 internistische Stationen, 2 chirurgische Stationen, 1 pädiatrische Station, 1 Kreißsaal, 1 gynäkologische Station, 1 private Station und 1 ophthalmologische Station. Jährlich werden ca. 22.000 Patienten stationär behandelt (SDDH, 2017).

Die durchschnittliche Geburtenzahl in Tansania im Jahr 2017 von 5 Kindern pro Frau (Worldbank, 2017) verdeutlicht, welche große Bedeutung sowohl die „Under five Clinic“ für Früherkennungsuntersuchungen und Impfungen, die Kinderambulanz, als auch die Kinderstation mit 60 Betten hat.

Zusätzlich zu den Ambulanzen für Augen- und Zahnheilkunde besitzt das Krankenhaus Spezialambulanzen für Patienten mit Tuberkulose, HIV und Diabetes mellitus. Eine kleine radiologische Abteilung mit einem Röntgengerät ist neben einer Apotheke und einem Labor ebenfalls vorhanden. Die Labordiagnostik beschränkt sich auf die Durchführung eines kleinen und großen Blutbildes, die mikroskopische Beurteilung von Stuhl-, Urin-, und Liquorproben, die Durchführung eines Widal-Tests sowie eines Malaria-Schnelltests.

Das Krankenhauspersonal setzt sich aus den Krankenpflegern/innen, den „Clinical Officers“ im Ambulanzbereich und den 7 angestellten Ärzten/innen zusammen.

Durch eine enge Kooperation mit den holländischen Universitäten in Nijmegen und Amsterdam wird das Krankenhaus nicht nur finanziell unterstützt, sondern auch personell durch holländische Studenten/innen im Zuge ihres Auslandspraktikums.

3.2.2.3 Studienpopulation

Die Studienpopulation umfasste alle Kinder zwischen 3 Monaten und 12 Jahren, die im Zuge einer fieberhaften Erkrankung die Ambulanz aufsuchten oder eine stationäre Einweisung erhielten. Einschlusskriterium war eine axilläre Temperatur von mindestens 38 °C zum Zeitpunkt der Untersuchung. Eine Malariainfektion sollte als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen worden sein.

Als Ausschlusskriterien galten alle lebensbedrohlichen Erkrankungen, die eine intensivmedizinische Versorgung des Kindes verlangten.

3.2.2.4 Ablauf der Datenerhebung und Probengewinnung

Bevor ein Kind in die Studie eingeschlossen wurde, wurde die erziehungsberechtigte Begleitperson ausführlich über das Studiendesign aufgeklärt. Dazu wurde ein Aufklärungsbogen in der Nationalsprache Suaheli sowie in Englisch ausgehändigt, der alle geplanten Untersuchungen und Labordiagnostiken erläuterte. Im Falle, dass die Kinder alt genug waren, selbstständige Entscheidungen treffen zu können, wurden sie in den Aufklärungsprozess mit einbezogen. Die erziehungsberechtigten Begleitpersonen erteilten durch einen Fingerabdruck oder durch Unterzeichnen des Aufklärungsbogens die Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden alle Kinder, die oben genannte Einschlusskriterien erfüllten, nach Einbeziehung der Einverständniserklärung im Zeitraum von Oktober 2017 bis März 2018 in die Studie eingeschlossen. Dabei wurde ein Großteil der Kinder aus dem ambulanten Bereich rekrutiert.

Die Datenerhebung begann mit einer körperlichen Untersuchung der Kinder. Diese reichte vom Erfassen allgemeiner Vitalparameter wie Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Atemfrequenz, Größe und Gewicht bis hin zu der Palpation von Leber und Milz und der Auskultation von Lunge und Herz. Der Fokus lag dabei besonders auf möglichen Ursachen der Fieberentstehung. Mithilfe eines Fragebogens wurden Daten bezüglich des Krankheitsbeginns, vorliegender Symptome sowie der Familien,- und Medikamentenanamnese erhoben. Anschließend erfolgte eine Blutentnahme für die Durchführung eines Malaria-Schnelltests und für das Beträufeln der Filterpapierkarten. Da der krankenhausesinterne Malaria-Schnelltest, CareStart™-Malaria Pf/Pan Combo Test, in Untersuchungen vorheriger Doktoranden konkordante Ergebnisse lieferte, wurde bei den meisten Patienten nur einer der beiden Schnelltests durchgeführt. Jede Filterpapierkarte enthält 5 runde Spots, die ein Füllungsvermögen von 75-80 µl

aufweisen (Klüber, 2016). Das Patientenblut wurde entweder nach Desinfektion durch einen Lanzettenpikser an der Fingerspitze oder durch eine Venenpunktion gewonnen. Sofern eine Venenpunktion gelang, wurde das gewonnene Blut ebenfalls für das Erstellen eines großen Blutbildes und für die Durchführung eines Dengue-Schnelltests verwendet. Der Dengue-Schnelltest beruht auf dem Nachweis des NS1-Antigens des Dengue-Virus aus Serum oder Plasma. Demzufolge wurde das venöse Vollblut zur Gewinnung von Serum oder Plasma zentrifugiert (Abbott GmbH & Co. KG, n.d.). Die Restbestände wurden in 2 ml Mikroschraubröhrchen eingefroren.

Bei Verdacht einer Harnwegsinfektion als Fieberursache, wurde bei geglückter Urinbeschaffung ein Urinsticktest durchgeführt.

Alle Ergebnisse und Befunde wurden den Begleitpersonen mitgeteilt und nahmen Einfluss auf das weitere Therapieverfahren.

Bei 8 Kindern wurde das Studiendesign dahingehend abgewandelt, dass den Eltern nach erfolgter Aufklärung und Einverständniserklärung ebenfalls Blut abgenommen wurde und sie anamnestiziert wurden. Der Fokus lag auf der Erhebung der Anzahl an Malaria-Infektionen und anderer fieberhafter Erkrankungen in der Vergangenheit. Das Ziel dieser 8 Mutter-Kind-Paare war es, die Antikörperlast zwischen Mutter und Kind zu vergleichen und dadurch Kenntnisse über das Auftreten von DENV und CHIKV zu erlangen.

Die mit Vollblut beträufelten Filterpapierkarten wurden zum Trocknen für ca. 24 h bei Raumtemperatur offen gelagert. Anschließend wurden sie zusammen mit Silica Gel Säckchen in Plastiktüten verpackt und für die weitere Zeit vor Licht und Feuchtigkeit geschützt gelagert. Die Silica Gel Trockensäckchen wurden alle 3 Monate ausgetauscht, um ein trockenes Milieu für die Filterkarten zu gewährleisten.

Die Lagerung der Serum-, und Plasmaproben erfolgte in 2 ml Mikroschraubröhrchen, die bei ca. -10 °C eingefroren wurden.

Zusätzlich zu den Patientendaten wurden über den Studienzeitraum hinweg alle stationär aufgenommen Kinder mit ihren Aufnahmediagnosen dokumentiert. Dadurch konnte eine Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diagnosen auf der Kinderstation erstellt werden.

3.2.2.5 Serologische Tests

Die Serum-, und Plasmaproben, die im Laufe der Studienperiode gesammelt und eingefroren gelagert wurden, dienten der serologischen Bestimmung von Dengue-, und Chikungunya-Antikörpern. Die Durchführung dieser serologischen Diagnostik erfolgte durch das Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig von der Abteilung unter der Leitung von PD Dr. Sebastian Ulbert. Die Testungen basierten auf Grundlage der von Rockstroh et al. (2015) entwickelten Methode zur Reduktion von Antikörper-Kreuzreaktionen zwischen Flaviviren. Die Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Flaviviren entsteht vor allem durch die strukturelle Ähnlichkeit des Envelope-Virusproteins in der Fusion-loop-Domäne. Die entwickelte Methode verwendet für die ELISA-Hybridisierungsreaktion Antigene mit einer Punktmutation in der Fusion-loop-Domäne. Durch diese Modifizierung der Fusion-loop-Domäne konnte die Bindung von kreuzreaktiven Antikörpern deutlich gesenkt werden, wodurch die Sensitivität der serologischen Testungen gestiegen ist (Rockstroh et al., 2015).

Dem Fraunhofer Institut wurden pro Probe 100 µl Plasma und/oder Serum auf Trockeneis zugeschickt, woraufhin das Institut die Detektion von Anti-DENV-IgM/IgG sowie Anti-CHIKV-IgG vornahm. Das Verfahren der ELISA-Hybridisierungsreaktion wurde für alle Proben in zwei voneinander getrennten Versuchen wiederholt und die Mittelwerte der Ergebnisse als OD-Werte bei einer Wellenlänge von 450-520 nm ausgewertet. Der Cut-off Wert lag für Anti-DENV-IgM bei 0,3101, für Anti-DENV-IgG bei 0,3323 und für Anti-CHIKV-IgG bei 0,2112.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten aus Tansania

4.1.1 Probanden

Die Generierung der Studienpopulation erfolgte zwischen Oktober 2017 bis März 2018. In diesem Zeitraum wurden Daten und Blutproben von 135 Kindern und 8 Erwachsenen gesammelt. Somit ergab sich eine Probandenanzahl von insgesamt 143 Patienten.

4.1.2 Allgemeine Patientendaten

Von den 135 herangezogenen Kindern waren 55 % männlich und 45 % weiblich. Der Median des Alters ergab 16 Monate. Die Altersspanne erstreckte sich von einem Minimum von 3 Monaten bis zu einem Maximum von 96 Monaten (8 Jahren).

Bis auf 4 Probanden, die aus der etwa 60 km entfernten Stadt Geita stammten, waren alle anderen Probanden in der Region Sengerema wohnhaft. Der Stamm der Sukuma hat seine Hauptausbreitung entlang des südlichen Viktoriasees, womit für die Mehrheit der Probanden (71%) die Sukuma-Stammeszugehörigkeit besteht.

4.1.3 Daten der körperlichen Untersuchung

4.1.3.1 Ernährungszustand

Der Ernährungszustand der 134 Kindern wurde anhand von Z-Score Tabellen der World Health Organization (WHO) ermittelt. Hierzu wurden jeweils für Mädchen und für Jungs separate Tabellen für die verschiedenen Altersgruppen 0-2 Jahren, 2–5 Jahren und über 5 Jahren herangezogen (WHO, 2021). Das altersbezogene Gewicht wurde als normal angesehen, wenn es sich innerhalb des Bereichs der doppelten Standardabweichung um den Mittelwert und demnach innerhalb von 95,44 % befand.

Einen an der Normalverteilung gemessenen überdurchschnittlich guten Ernährungszustand wiesen 8 Kinder auf, da sie einen length for weight/height-Wert oberhalb der +2 Standardabweichung hatten. Von 17 Kindern hingegen lag das Gewicht zum Zeitpunkt der Untersuchung unterhalb des Normalbereichs, d.h. des Bereichs der doppelten Standardabweichung um den Mittelwert, was auf Unterernährung der Kinder schließen ließ.

4.1.3.2 Vitalparameter

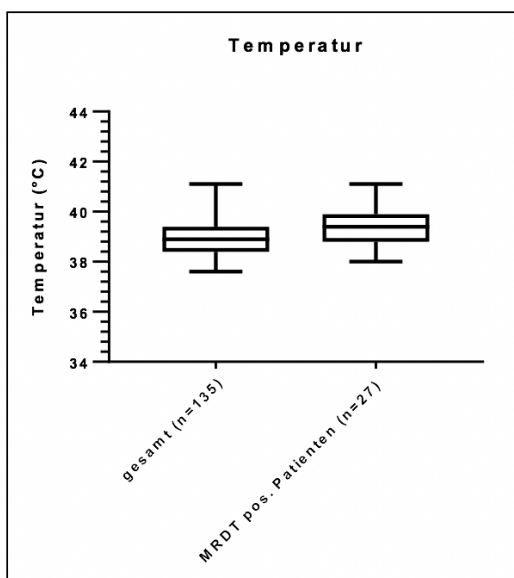
Die Atemfrequenz konnte von 130 Kindern ermittelt werden und wies einen Median von 49 Atemzügen pro Minute auf. Im Vergleich zu einer normofrequenten Atmung eines Kleinkindes (20-30 Atemzüge/min) liegt dieser Wert deutlich über der Norm.

Der Median der Pulswerte dieser Kinder ergab eine Herzfrequenz von 156 Herzschlägen pro Minute. Auch dieser Wert liegt über den Normwerten von 100-120 Schlägen pro Minute für Kinder zwischen 0-6 Jahren.

Die Sauerstoffsättigung wurde von 127 der 130 Kinder mittels eines speziellen Kinder-Pulsoxymeters erfasst und ergab einen Median von 96 %, was einer normgerechten Beladung der Erythrozyten mit Sauerstoff entspricht. Unterhalb der Norm lagen 13 Kinder mit einer Sauerstoffsättigung unter 90 %. Von diesen Kindern erhielten 10 (77 %) die Diagnose einer Pneumonie. Bei den restlichen 3 Kindern mit sehr niedriger Sauerstoffsättigung wurde bei 2 Kindern eine Malariainfektion diagnostiziert und 1 Kind litt an einer Sichelzellanämie-Krise.

Die axilläre Temperatur wurde von allen 135 Kindern der Studie ermittelt und betrug gemäß den Einschlusskriterien mindestens 38 °C. Somit ergab sich ein Median von 38,9 °C. Hingegen liegt der Median der Temperatur von Probanden, die einen positiven MRDT aufwiesen, mit 39,4 °C deutlich über dem entsprechenden Median der Gesamtheit der Probanden. Abbildung 13 liefert einen Vergleich zwischen der mittleren Temperatur der Kinder mit positivem MRDT und der Gesamtpopulation (n=135).

Abbildung 13: Vergleich zwischen der mittleren Temperatur der Gesamtpopulation und der MRDT-positiven Probanden



Zur Analyse wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt, welcher einen p-Wert von $p < 0,05$ ($p = 0,0133$) lieferte und somit einen signifikanten Unterschied zwischen dem Temperaturdurchschnittswert der Gesamtpopulation und dem der MRDT-positiven Probanden aufzeigte.

4.1.3.3 Impfstatus und chronische Erkrankungen

Der Impfstatus wurde von 122 Kindern entweder anhand des Impfausweises oder durch mündliche Auskunft der Begleitpersonen bestimmt. Bei 53 Kindern (43 %) konnte eine altersentsprechende, vollständige Immunisierung festgestellt werden.

Bei 2 von 135 Kindern konnte eine chronische Vorerkrankung anamnestiziert werden. Eines der Kinder wies einen angeborenen Herzfehler auf, während das andere an einer Hämoglobinopathie litt.

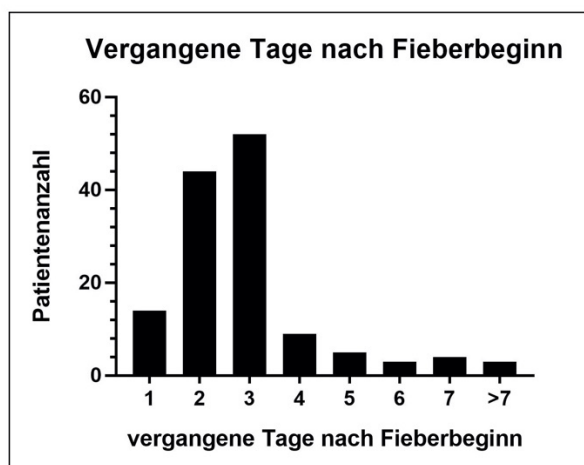
Des Weiteren wiesen 5 Kinder eine Sichelzellanämie auf und 2 Kinder waren an einer HIV-Infektion erkrankt.

4.1.3.4 Fieberbeginn

Das Balkendiagramm in Abbildung 14 zeigt zusammenfassend für alle 135 Patienten die Zeit (angegeben in Anzahl der Tage), die zwischen Ausbruch des Fiebers bei einem Patienten und Vorstellung des Patienten im Krankenhaus verstrichen ist. Am häufigsten (52 Patienten) gaben Patienten oder ihre Begleitpersonen an, dass der Fieberbeginn 3 Tage zurück lag. Zweithäufigste Angabe (43 Patienten) war ein Fieberbeginn vor 2 Tagen. Es berechnete sich ein Median der Zeitdifferenz von Fieberbeginn bis zum Aufsuchen des Krankenhauses von 3 Tagen.

Insgesamt wurden von 110 Patienten Blutproben entnommen, die sich innerhalb der ersten 3 Tage nach Fieberbeginn und somit während der virämischen Phase der Erkrankung befanden.

Abbildung 14: Vergangene Tage nach Fieberbeginn



4.1.3.5 Symptome

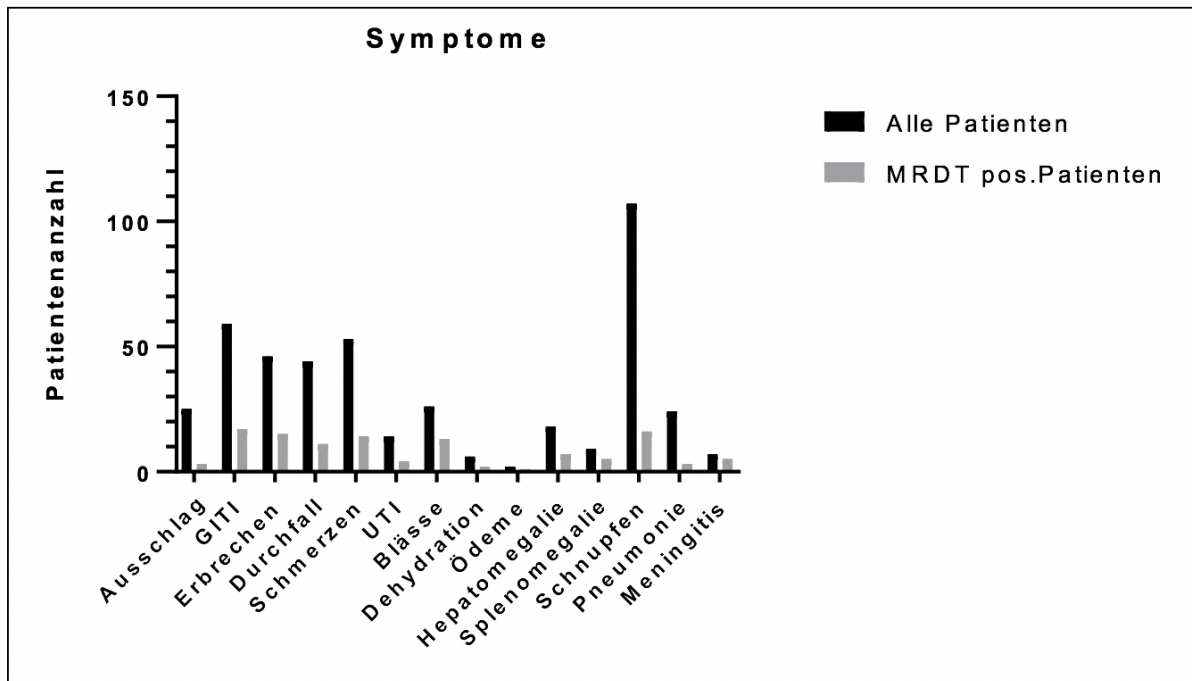
Die Erhebung der Symptome erfolgte anhand der mündlichen Auskunft der Begleitpersonen sowie der körperlichen Untersuchung der Kinder. Als häufigste Symptome traten bei 109 von 135 Patienten Schnupfen und Husten auf. Als zweithäufigstes Symptom wiesen 59 Kinder eine gastrointestinale Infektion mit Erbrechen und/oder Durchfall auf. Besonders regelmäßig wurden außerdem Bauch- und Kopfschmerzen angegeben.

Abbildung 15 vergleicht die gesamte Patientenpopulation mit den MRDT-positiven Patienten hinsichtlich der aufgetretenen Symptome. Das Balkendiagramm veranschaulicht die Häufigkeit der vorkommenden Symptome in den zwei betrachteten Patientengruppen. Kinder, die laut MRDT eine Malariainfektion hatten, zeigten als häufigstes Symptom gastrointestinale Beschwerden wie Durchfall und Erbrechen. Anhand der Schleimhautfarbe des Unterlids konnte bei etwa 50 % der Malariapatienten eine Anämie festgestellt werden.

Die zerebrale Malaria ist eine schwere Verlaufsform, die meistens bei einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* auftritt (White et al., 2014). Manifestationsarten dieser zerebralen Malaria sind positive Meningismuszeichen, Konvulsionen bis hin zu einem komatösen Zustand. Von allen eingeschlossenen 135 Patienten präsentierten sich 7 Patienten mit Symptomen, die auf ein zerebrales Geschehen hindeuteten. Von diesen 7 Patienten hatten wiederum 5 (71 %) einen positiven Malariaschnelltest.

Aus den gesammelten Daten ergibt sich außerdem, dass die Mehrheit der MRDT-positiven Patienten (60 %) erkältungsähnliche Symptome wie Husten und Schnupfen zeigten.

Abbildung 15: Symptome



4.1.4 Daten der Laboruntersuchungen

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit war es möglich, bei allen eingeschlossenen Probanden einen Malaria-Schnelltest durchzuführen. Eine venöse Blutentnahme gelang bei 91 Patienten. Bei diesen Patienten erfolgte nach der Gewinnung von Plasma oder Serum zusätzlich ein Dengue-Schnelltest. Bei 75 Patienten konnte ein großes Blutbild erstellt werden.

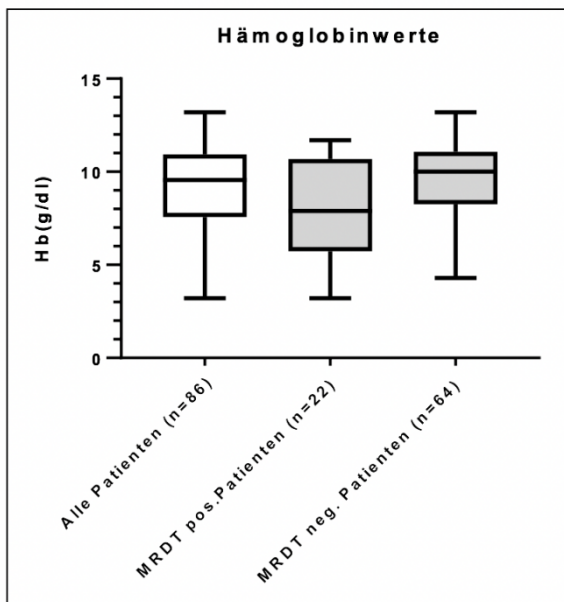
4.1.4.1 Hämoglobinwerte

Der Hämoglobinnormwert (Hb-Wert) für Kinder zwischen 4 Monaten und 7 Jahren befindet sich in etwa zwischen 10-14 g/dl. Bei Werten im Bereich von 5-9 g/dl wird eine leichte Anämie diagnostiziert. Dies war bei knapp der Hälfte aller MRDT-positiven Kinder (48 %) der Fall. Eine schwere Anämie zeigt sich bei Werten unter 5 g/dl.

Der Median aller Probanden ergab einen Hb-Wert von 9,9 g/dl und befindet sich somit an der Untergrenze des Normbereichs. Von 75 erhobenen Hb-Werten zeigten sich 32 Kinder mit Werten unter 9 g/dl, welche dadurch definitionsgemäß an einer leichten Anämie litten. Bei 4 Kindern ergab das große Blutbild Hb-Werte unter 5 g/dl. Diese Patienten erhielten schnellstmöglich eine Bluttransfusion.

Hervorzuheben ist, dass der Median der Hb-Werte von MRDT-positiven Patienten (7,9 g/dl) im Vergleich zu dem Hb-Median von MRDT-negativen Patienten (9,9 g/dl) deutlich niedriger ausfiel. Dies verdeutlicht der Boxplot in Abbildung 16.

Abbildung 16: Hämoglobinwerte



4.1.4.2 Weitere Blutwerte

Im Rahmen der Blutbilddiagnostik wurde neben den Hämoglobinwerten der Hämatokrit (%) sowie die Anzahl der Leukozyten (1/nl), der Erythrozyten ($10^6/\text{ml}$), der Thrombozyten (1/nl), der Lymphozyten (%), der neutrophilen Granulozyten (%), der Monozyten (%) ermittelt, genauso wie MCH (pg), MCV (fl) sowie MCHC (g/dl) bestimmt.

Besondere Betrachtung erfahren die Thrombozytenwerte. Es wird davon ausgegangen, dass sich Normwerte zwischen 150-350 /nl befinden. Vor diesem Hintergrund konnten 15 Probanden erfasst werden, welche einen Wert <150 /nl und demnach eine Thrombozytopenie aufwiesen. Hervorzuheben ist, dass sich unter diesen 15 Probanden 11 Kinder mit positivem MRDT befanden.

4.1.5 Testergebnisse

Alle 135 in die Studie aufgenommenen Probanden erhielten einen Malaria-Schnelltest. Im Zuge der Vorarbeit von vorherigen Doktoranden ergaben sich deckungsgleiche Ergebnisse des NADALTM- MRDTs und des CareStartTM- MRDTs. Auch resultierte aus den Testauswertungen von 33 Probanden, bei welchen sowohl der NADALTM-Schnelltest als auch der CareStartTM-Schnelltest, der vor Ort im

Krankenhaus verfügbar war, durchgeführt wurden, eine Kongruenz der Ergebnisse beider Schnelltests von 100%. Daher wurde die Wahl des Tests zur Diagnostik als irrelevant angenommen.

Um die Sensitivität und Spezifität der Malaria-Schnelltests zu ermitteln, wurden die Ergebnisse der Schnelltests den Ergebnissen der RT-mPCR gegenübergestellt. Hierbei wurde angenommen, dass das Verfahren der RT-mPCR die genaueren Daten liefert und somit als Referenz dient.

Tabelle 18 zeigt die Konkordanz der Ergebnisse des MRDTs im Vergleich zur mPCR.

Die Interpretation des errechneten Cohen's κ wurde mithilfe des Statistikprogramms vorgenommen (Idiostatics, 2020). Demnach lässt ein Cohen's κ Wert von 0,876 auf eine annähernd perfekte Übereinstimmung der Ergebnisse des MRDTs mit den Ergebnissen der RT-mPCR schließen.

Tabelle 16: Ergebnisse der Malaria-Schnelltests und der RT-mPCR

	NADAL TM - MRDT	CareStart TM - MRDT	MRDT gesamt	Blutausstrich	RT- mPCR
Anzahl der Durchführungen	119	47	135	2	135
Positive Ergebnisse	23	15	27	2	22
Negative Ergebnisse	96	32	108	0	113

Tabelle 17: Sensitivität und Spezifität der Malaria-Schnelltests

	MRDT pos.	MRDT neg.	
PCR pos. (krank)	22	0	Sensitivität 100%
PCR neg. (nicht krank)	5	113	Spezifität 96%

Tabelle 18: Konkordanz zwischen MRDT und RT-mPCR-ELISA

	konkordant		diskordant		Konkordanz (%)	Cohen's κ
	+/+	-/-	+/-	-/+		
MRDT	22/22	108/113	5/113	0/22	96,3%	0,876

		MRDT		Summe	Wahrscheinlichkeit
		Neg.	Pos.		
PCR	Neg.	108	5	113	84%
	Pos.	0	22	22	16%
Summe		108	27	135	
Wahrscheinlichkeit		80%	20%		

Berechnung der Häufigkeit der Übereinstimmung P_0 :

$$P_0 = \frac{108 + 22}{135} = 0,963$$

Berechnung der Häufigkeit der zufälligen Übereinstimmung P_e :

$$P_e = 0,8 \times 0,84 + 0,2 \times 0,16 = 0,704$$

Berechnung von *Cohen's* κ

$$Cohen's \kappa = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e} = \frac{0,963 - 0,704}{1 - 0,704} = 0,875$$

Tabelle18: Berechnung des Cohen's κ als statistisches Maß zur Beurteilung der Übereinstimmung von MRDT und PCR (Idiostatics, 2020).

Interpretation:

- 0,01-0,20 => leichte Übereinstimmung
- 0,21-0,40 => angemessene Übereinstimmung
- 0,41-0,60 => moderate Übereinstimmung
- 0,61-0,80 => wesentliche Übereinstimmung
- 0,81-1,00 => ausgezeichnete Übereinstimmung

Zusätzlich wurde bei 91 Patienten ein Dengue-Schnelltest durchgeführt, welcher bei allen Patienten negativ ausfiel.

Der „Dicke Tropfen“ als Malariadiagnostikverfahren wurde bei keinem Probanden im „Sengerema Designated District Hospital“ angewendet. Jedoch wurden 2 Kinder im Vorfeld in einem kleinen Gesundheitszentrum mittels einer Lichtmikroskopie ihres Blutaussstrichs positiv auf Malaria getestet. Die nachfolgend durchgeführten Schnelltests und die Analyse mittels der RT-mPCR Methode bestätigten hingegen die vermuteten Malariainfektionen nicht.

4.1.6 Prämedikation und getroffene Maßnahmen des Krankenhauses

4.1.6.1 Prämedikation

Die Erhebung der Daten zur Prämedikation basierte auf den mündlichen Angaben der Begleitpersonen. Wie Abbildung 17 zeigt, erhielten insgesamt 115 (85 %) von 135 Kindern eine Prämedikation. Davon nahmen 40 Kinder (30 %) Antibiotika (AB), 38 (28 %) Anti-Malaria-Medikamente und 98 (73 %) Schmerzmittel ein. Am

häufigsten wurden dabei Cotrimoxazol und Amoxicillin als Antibiotika eingesetzt, während ausschließlich Artemether-Lumefantrin als Anti-Malaria-Medikation und Paracetamol als Schmerzmittel eingenommen wurden.

Interessante Ergebnisse liefert der Vergleich zwischen der Anzahl an Kindern, die im Zuge der Prämedikation Antibiotika und Anti-Malaria-Medikamente erhielten, und den Kindern, die nach Konsultation eines Arztes oder Clinical Officers Antibiotika oder Anti-Malaria-Medikamente verschrieben bekommen haben. Es stellt sich heraus, dass lediglich ein geringer Anteil der Kinder ohne Erfordernis im Vorhinein Antibiotikum eingenommen haben. Nur 11 von 40 Kindern (27 %), die zum Zeitpunkt der Studienaufnahme bereits Antibiotika eingenommen hatten, bekamen kein Antibiotikum im Zuge ihrer ambulanten oder stationären Behandlung verabreicht. Somit wurden 29 von 40 Kindern (73 %) bereits durch die vorherige Antibiotikaeinnahme adäquat therapiert.

Die Ergebnisse zur vorherigen Einnahme von Anti-Malaria-Medikamenten führen jedoch zu gegensätzlichen Schlussfolgerungen. Nur 10 von 38 Kindern (26 %) nahmen als Prämedikation Anti-Malaria-Medikamente ein, die nachträglich indiziert wurden. Den restlichen 28 Kindern wurden demnach ohne Erfordernis Anti-Malaria-Medikamente verabreicht.

Eine anschauliche Zusammenfassung der indizierten und nicht indizierten Gaben von Antibiotika, Anti-Malaria-Medikamenten und Schmerzmitteln im Zuge der Prämedikation liefert Abbildung 18.

Abbildung 17: Prämedikation

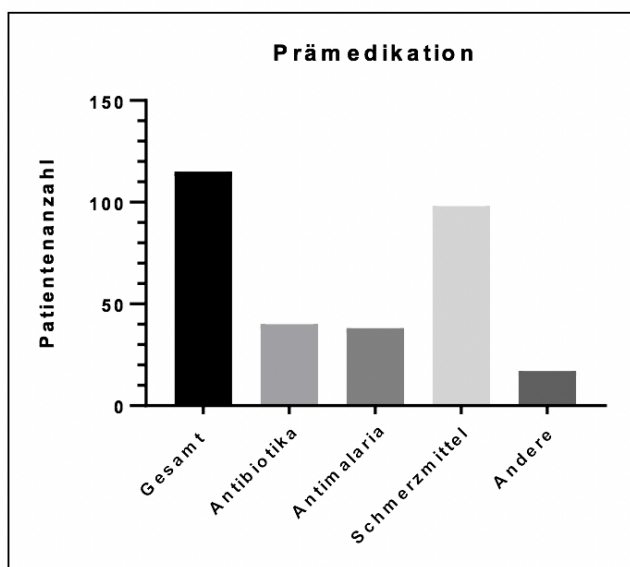
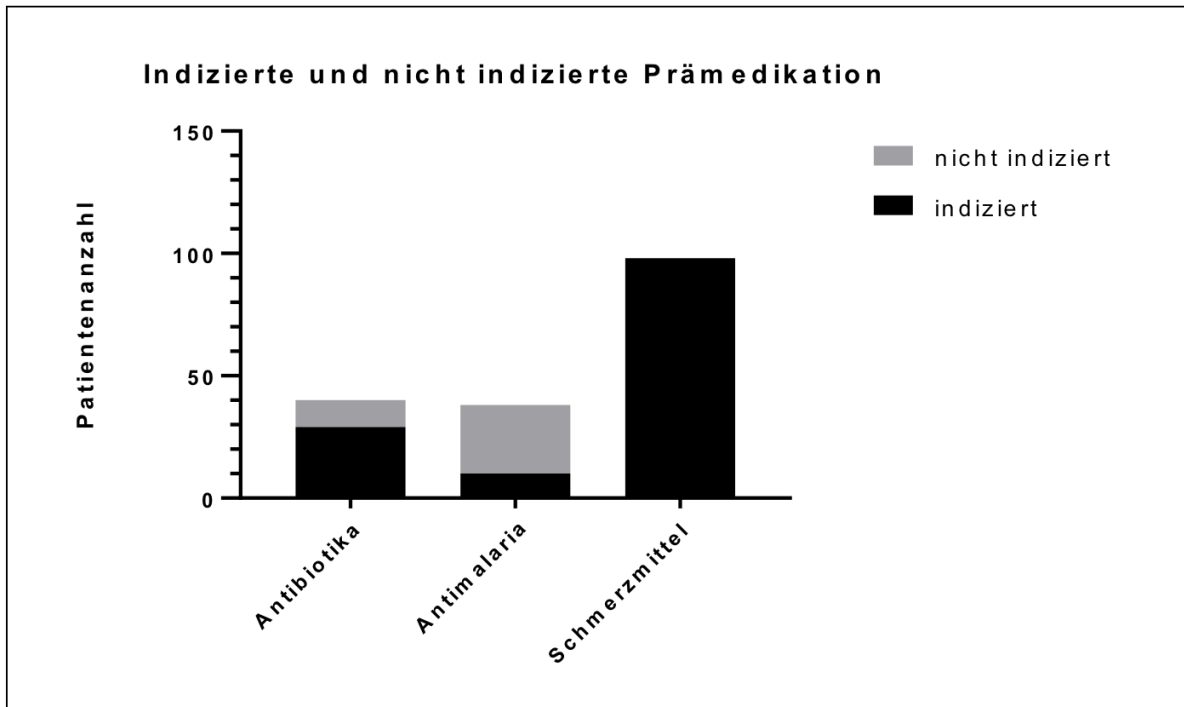


Abbildung 18: Indizierte und nicht indizierte Prämedikation



4.1.6.2 Maßnahmen im Krankenhaus

Die Maßnahmen, die von den Clinical Officers oder Ärzten nach vollständiger Untersuchung der Patienten getroffen wurden, beinhalteten das Ausstellen einer Arbeitsdiagnose, die Verordnung der Medikamente und die ggf. notwendige stationäre Einweisung.

4.1.6.2.1 Arbeitsdiagnosen

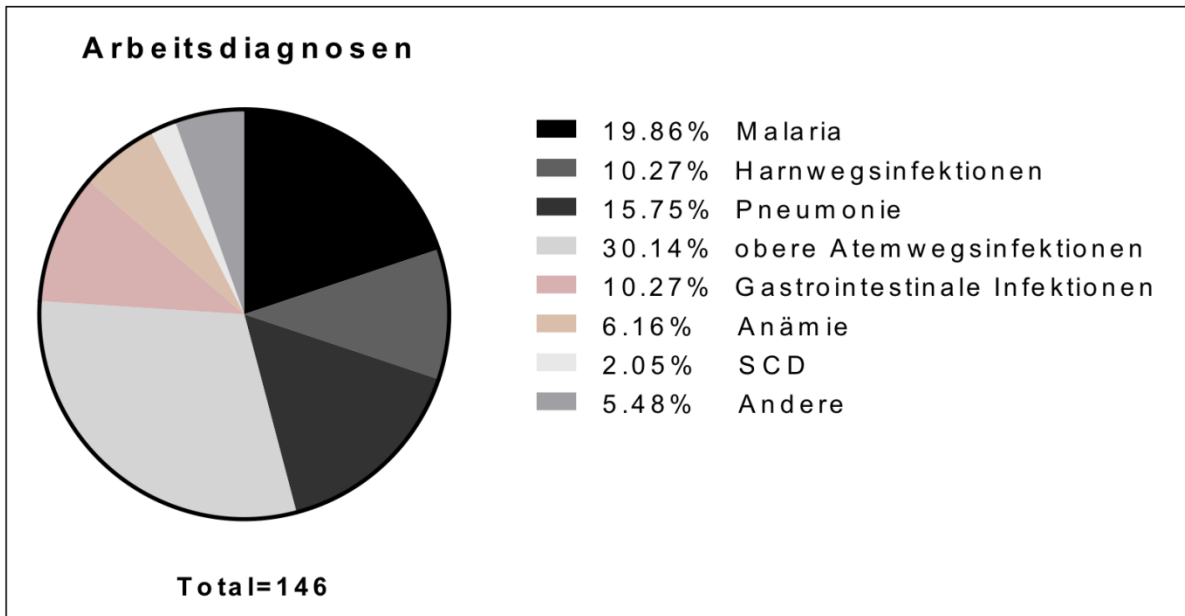
Die Arbeitsdiagnose wurde auf Grundlage der Ergebnisse der körperlichen und laboratorischen Untersuchungen gestellt. Die prozentuale Verteilung der ausgestellten Arbeitsdiagnosen wird in Abbildung 19 mithilfe eines Kreisdiagramms veranschaulicht.

Insgesamt lagen 147 Diagnosen von lediglich 135 Probanden vor, woraus sich ergibt, dass 12 Patienten eine Doppeldiagnose erhielten.

Als häufigstes Krankheitsbild wurden obere Atemwegsinfektionen (etwa 30 %) diagnostiziert. Mit 20 % stellten Malariainfektionen den zweitgrößten Anteil an allen gestellten Arbeitsdiagnosen dar. Am dritthäufigsten wurde mit 16 % die Pneumonie diagnostiziert.

Bei den 12 Patienten mit einer Doppeldiagnose ist herauszuheben, dass 9 von ihnen mit Malaria assoziiert waren. Von diesen Malariapatienten litten 7 gleichzeitig an einer Anämie und bei 2 Patienten wurde zusätzlich eine Pneumonie diagnostiziert.

Abbildung 19: Arbeitsdiagnosen



4.1.6.2.2 Verordnete Medikamente

Abbildung 21 gibt einen Überblick über alle im Zuge einer ambulanten oder stationären Behandlung verordneten Medikamente. Hervorzuheben ist der außerordentlich hohe Anteil an verschriebenen Antibiotika. Von allen 135 Kindern erhielten 96 (71 %) eine Antibiotikatherapie. Am häufigsten wurde auf das Aminopenicillin Amoxicillin zurückgegriffen.

Interessante Erkenntnisse liefert Tabelle 19, welche die Anzahl der Antibiotikaeinsätze innerhalb der einzelnen Arbeitsdiagnosen betrachtet. Patienten, die an einer oberen Atemwegsinfektion litten, bekamen in 91 % der Fälle Antibiotika verschrieben. Des Weiteren ist Tabelle 19 und Abbildung 20 zu entnehmen, dass 17 % der Patienten mit einer Malariadiagnose zusätzlich zu einer Anti-Malaria-Therapie einer Antibiotika-Therapie unterzogen wurden.

Zu erwähnen ist, dass alle Patienten mit einer Pneumonie oder einem Harnwegsinfekt mit Antibiotika behandelt wurden und die Therapie in diesen Fällen leitliniengerecht durchgeführt wurde.

Wie Abbildung 21 zeigt, wurde bei 132 Patienten Schmerzmittel eingesetzt. Dabei wurde bis auf eine Ausnahme ausschließlich das Nichtopioid-Analgetikum Paracetamol verwendet.

Zur Therapie einer Malariainfektion wurde in 18 Fällen eine Kombination aus Artemeter-Lumefantrin und Artesunat herangezogen. Diese Patienten zeigten Symptome wie Blässe, Hepato- und Splenomegalie, die auf einen schwerwiegenden Krankheitsverlauf hinweisen, sodass die beschriebene kombinierte Therapieform indiziert war.

Bei 11 weiteren Malariapatienten wurde eine Monotherapie mit Artemeter-Lumefantrin verwendet. Diese zählt als Standardtherapie für eine unkomplizierte Malariainfektion (WHO, 2013a).

Tabelle 19: Antibiotikaeinsätze bei verschiedenen Arbeitsdiagnosen

Arbeitsdiagnose	Anzahl (insgesamt)	Anteil der AB-Einsätze: Absolute Anzahl (prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamtzahl)
Obere Atemwegsinfektion	44	40 (91%)
Malaria	29	5 (17%)
Pneumonie	23	23 (100%)
Harnwegsinfekt	15	15 (100%)
Gastrointestinaler Infekt	15	7 (47%)
Anämie	9	5 (56%)
Sichelzellanämie	3	2 (67%)

Abbildung 20: Antibiotikaeinsätze bei verschiedenen Arbeitsdiagnosen

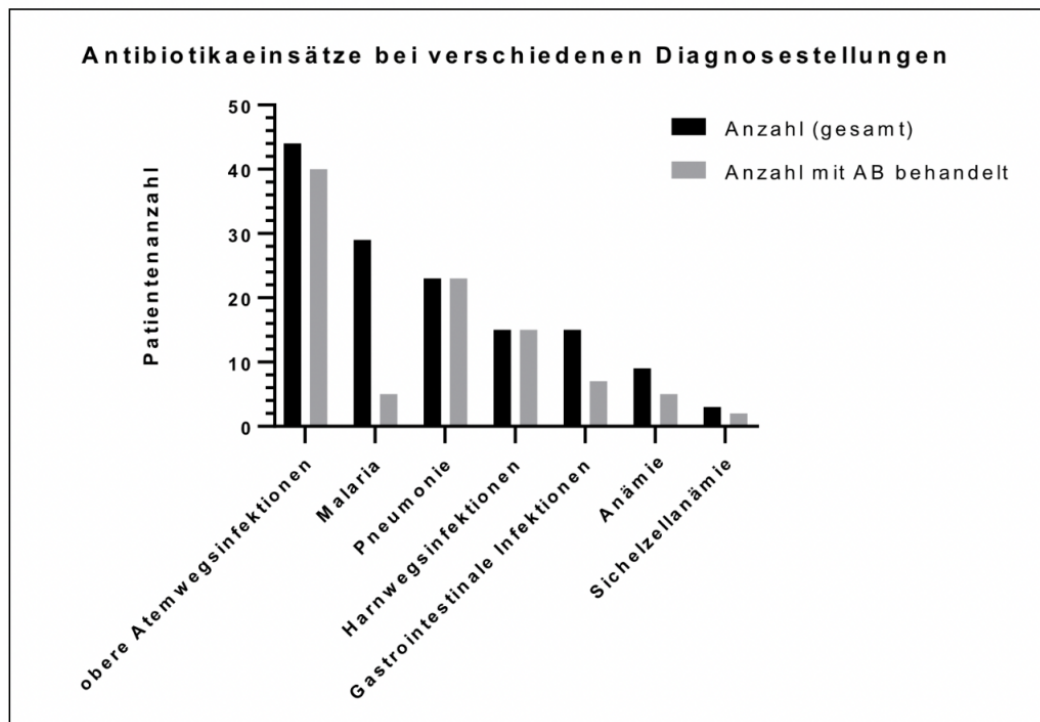
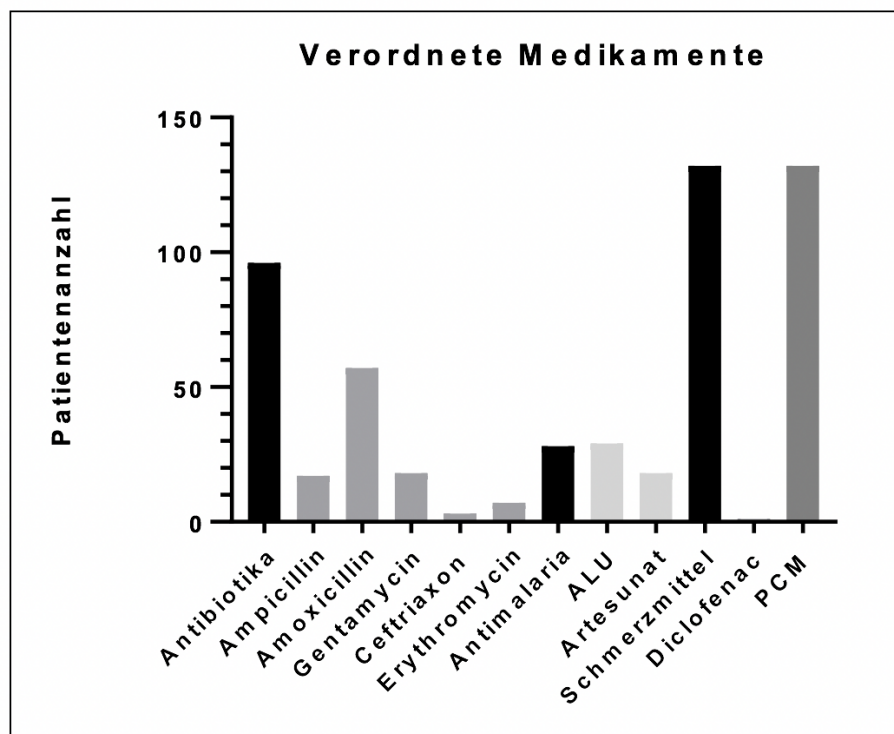


Abbildung 21: Verordnete Medikamente



4.1.6.2.3 Follow-up

Das „Follow-up“ beinhaltet die Dokumentation der Medikamentenverordnung während des stationären Aufenthaltes sowie der Aufenthaltsdauer im Krankenhaus. Die Erhebung dieser Daten konnte zu Teilen nur unvollständig durchgeführt werden, da die Akzenttransparenz unzureichend gewährleistet war. Dadurch konnte das

genaue Entlassungsdatum nicht bei jedem stationären Patienten sicher datiert werden.

Während der gesamten Studiendauer wurden von allen eingeschlossenen Patienten 32 Patienten stationär aufgenommen. Der Median der Aufenthaltsdauer betrug 5,5 Tage. Der häufigste Grund für eine stationäre Behandlung stellte mit 13 Fällen eine Malariainfektion dar, die teilweise zusammen mit einer transfusionspflichtigen Anämie auftrat. Am zweithäufigsten wurden Kinder aufgrund einer schweren Pneumonie behandelt. In einem dieser Fälle reichten die vorhandenen Therapiemöglichkeiten nicht aus, sodass der Patient mit schwerer Pneumonie in das Bugando Medical Center verlegt wurde.

4.1.7 Aufnahmediagnosen der Kinderstation von Januar bis Dezember 2017

Das Sengerema Designated District Hospital veröffentlicht jährlich einen zusammenfassenden Bericht über die gesamte Krankenhausstatistik. Dieser Report liefert unter anderem Informationen über die Aufnahmediagnosen und Todesfälle auf der Kinderstation im Jahr 2017. Insgesamt wurde von Januar bis Dezember 2017 eine Anzahl von 2660 Kindern stationär behandelt, von denen 129 im Krankenhaus verstarben.

Im Folgenden sollen die am häufigsten diagnostizierten Krankheiten erläutert und mit den ausgestellten Arbeitsdiagnosen der Studienpopulation verglichen werden. Dadurch kann eine Schätzung für die Inzidenz häufiger Kinderkrankheiten in der Distriktregion Sengerema vorgenommen werden. Abbildung 22 veranschaulicht die Verteilungen des Auftretens der 8 häufigsten Aufnahmediagnosen im Jahr 2017. Am häufigsten wurde mit 30,11 % Pneumonien diagnostiziert. An zweiter Stelle befindet sich mit 25,23 % die Malariadiagnose, während dritthäufigste Aufnahmediagnose mit 18,08 % die akute Durchfallerkrankung war.

Tabelle 20 liefert einen Vergleich zwischen allen pädiatrischen Arbeitsdiagnosen im Jahr 2017 und den gestellten Diagnosen während des Studienzeitraums. Aus diesem Vergleich geht hervor, dass die Diagnosen obere und untere Atemwegsinfektionen, Malaria, Harnwegsinfektionen und gastrointestinale Infektionen sowohl in der Studienpopulation als auch in der Gesamtpopulation der stationären Patienten im Jahr 2017 als die 7 häufigsten Diagnosen auftraten.

Die höchsten Inzidenzen erreichten die Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege. Jedoch stellen in beiden Populationen Malariadiagnosen einen

annähernd gleich hohen Anteil dar. Neben den hohen Inzidenzraten von Malaria und Atemwegsinfektionen lag außerdem die Mortalitätsrate infolge von Malaria bei einem drastischen Wert von 4 % und infolge von Atemwegsinfektionen bei 2 %.

Abbildung 22: Aufnahmediagnosen 2017

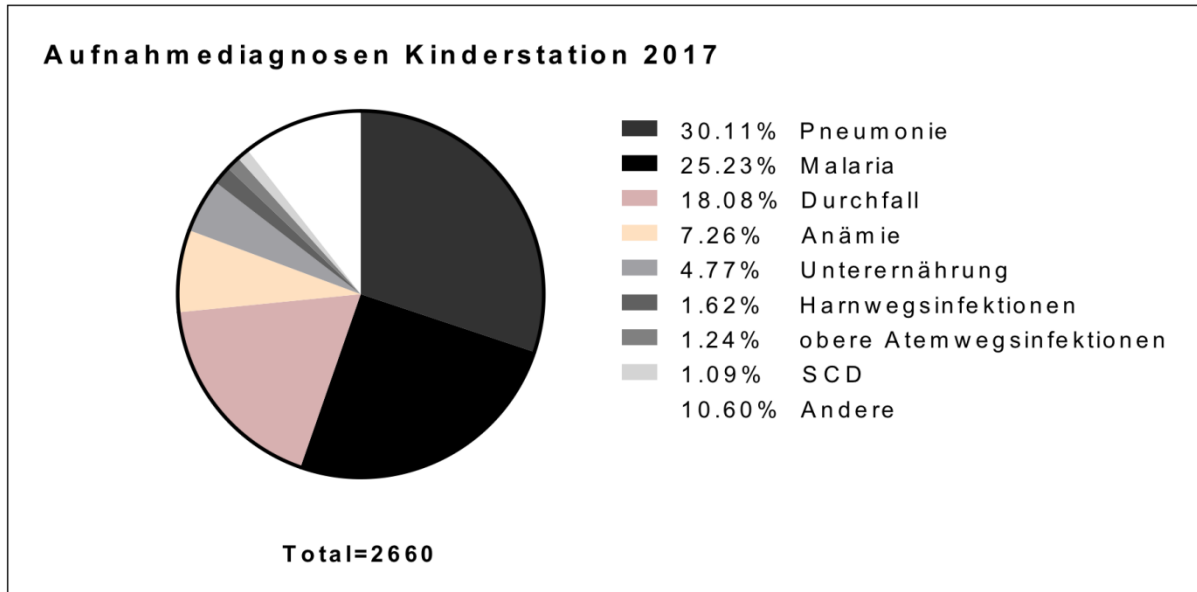


Tabelle 20: Vergleich zwischen den 7 häufigsten Aufnahmediagnosen im Jahr 2017 und den 7 häufigsten Arbeitsdiagnosen während der Studienlaufzeit

	Studienlaufzeit (Okt. 2017-März 2018) N=135 Kinder	Jahr 2017 N=2660 Kinder
1	Obere Atemwegsinfektionen (32,6%)	Pneumonie (30,1%)
2	Malaria (21,5%)	Malaria (25,2%)
3	Pneumonie (17,0%)	GITI (17,9%)
4	Harnwegsinfektionen (11,1%)	Anämie (7,3%)
5	GITI (11,1%)	Unterernährung (4,7%)
6	Anämie (6,7%)	Harnwegsinfektionen (1,6%)
7	SCD (2,2%)	Obere Atemwegsinfektionen (1,2%)

4.2 Auswertung der Dried Blood Spots

4.2.1 Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode

Im Zeitraum von April bis Oktober 2018 wurden die „Dried Blood Spots“ Proben auf den Filterpapierkarten aller 135 eingeschlossenen Kinder sowie der 8 Erwachsenen ausgewertet. Die bis zur Auswertung trocken gelagerten Proben wurden auf das Vorhandensein von Malariaparasiten oder Arboviren getestet. Dazu wurde die in Abschnitt 4.2.1 beschriebene RT-mPCR-ELISA-Methode angewendet.

Gesetzt den Fall, dass die Positivkontrollen nicht positiv waren oder die Negativkontrollen nicht negativ waren, wurde der kontaminierte Durchgang wiederholt. Schwach positive oder undeutliche Ergebnisse wurden mithilfe einer singleplex-PCR hinsichtlich des potentiellen Erregers nachgetestet. Die singleplex-PCR bestätigte oder verwarf in solchen Fällen aufgrund ihrer höheren Spezifität den vorherigen Verdacht.

Im Folgenden wird beispielhaft das Ergebnis der Gelelektrophorese der Proben 1-9 für alle Proben aus Tansania dokumentiert. Abbildung 23 zeigt hierzu das unmittelbar nach der Gelelektrophorese unter der UV-Lampe entstandene Bild.

In diesem Durchlauf wurde als Positivkontrolle das O'nyong nyong-Virus verwendet. Als Negativkontrollen dienten einmalig NaCl und zweimal H₂O.

Da die Positivkontrolle durch ihre eindeutige Bande ein positives Ergebnis anzeigte und die Negativkontrollen keine Banden aufwiesen, ist davon auszugehen, dass es sich um einen fehlerfreien Durchgang mit aussagekräftigen Ergebnissen handelte.

Bei Probe 2 tauchte eine deutliche Bande auf, die Aufschluss darüber lieferte, dass ein Primer des verwendeten mPCR-Panels gebunden hat und Nukleinsäure amplifiziert wurde. Allein auf Grundlage der Gelelektrophorese-Banden kann noch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, um welchen speziellen Erreger es sich handelte.

Zur Spezifizierung der Gelelektrophorese-Banden ist die ELISA-Hybridisierungsreaktion unerlässlich. In Abbildung 24 sind exemplarisch für alle gewonnenen Proben die Ergebnisse der ELISA-Hybridisierungsreaktion der Proben 1-9 dargestellt. Die Durchführung und die Auswertung dieses Verfahrens erfolgten wie in Abschnitt 4.2.1.8. beschrieben.

Das auf diese Weise gewonnene Ergebnis stimmt mit der Gelelektrophorese in Abbildung 23 übereinstimmt. Probe 2 erwies sich durch die enzymatische Grünfärbung eindeutig als malariapositiv. Alle restlichen Proben dieses Durchgangs waren hinsichtlich Malaria und Arboviren negativ.

Bei der Bearbeitung der insgesamt 143 Proben ergaben die RT-mPCR-Tests mit folgender ELISA-Hybridisierungsreaktion bei 22 Patienten konkordante positive Ergebnisse hinsichtlich Malaria. Alle Nachtestungen der Proben mit OD-Werte im Grenzbereich zwischen 0,1-0,2 Einheiten lieferten bei der spezifischen singleplex-PCR negative Ergebnisse.

4.2.1.1 Nachtestung der Probe 28 auf das Zika-Virus

Die Probe 28 erwies sich in der ELISA-Hybridisierungsreaktion als stark positiv hinsichtlich des Zika-Virus. Da demgegenüber jedoch die zugehörige Gelelektrophorese keine Bande aufwies, wurde für besagte Probe erneut Material aus der Filterpapierkarte ausgestanzt, um nachfolgend beide Proben 28.1 und 28.2 mithilfe einer singleplex-PCR auf das Vorliegen einer Zika-Virus-Infektion zu testen. Hierbei lieferte die Probe 28.1 ein positives Ergebnis, während die Probe 28.2 negativ ausfiel. Zur Sicherstellung einer Zika-Virus-Infektion wurde nachfolgend eine Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurde ein Sequenzierungs-Kit der Firma eurofins Genomics verwendet.

Die Sequenzierung lieferte im Hinblick auf eine Zika-Virus-Infektion negative Ergebnisse, sodass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Kontamination der Probe 28.1 handelte.

4.2.1.2 Auswertung der Proben aus Dar Es Salaam

Durch den Kontakt zu einer in der IST Clinic in Dar Es Salaam praktizierenden Ärztin, konnten 10 Vollblutproben auf Filterpapierkarten von Erwachsenen mit einer Dengue-Virus-Infektion an das immunologische und infektiologische Labor der Kinderklinik Mainz geschickt werden, um dort im Rahmen dieser Promotionsarbeit gemäß der RT-mPCR-ELISA-Methode ausgewertet zu werden.

Die Proben wurden im Zeitraum von August 2017 bis April 2018 in der IST-Clinic gesammelt und aufbewahrt. Über die Firma der verwendeten Filterpapierkarten konnte keine Information gewonnen werden. Unter den Patienten befanden sich 8 Frauen und 2 Männer im Alter zwischen 17 und 64 Jahren. Alle Patienten wiesen einen positiven Dengue-Schnelltest auf.

Bei 3 dieser Patienten wurde vom Schweizer Tropeninstitut in Genf eine Dengue-Virus-Infektion mit dem Virus-Typ 3 bestätigt. Dazu wurde eine Real-time multiplex-PCR (Fast-track DIAGNOSTICS Dengue differentiation®) zur Detektion der Dengue-Virus-Typen 1,2,3 und 4 verwendet (Boillat-Blanco, 2018).

Die Gelelektrophorese der RT-mPCR, die im Zuge dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurde, lieferte undeutliche, unspezifische Banden. Zudem ergab die ELISA-Hybridisierungsreaktion weder für das Dengue-Virus noch für andere Arboviren oder für Malaria positive Ergebnisse. Infolgedessen wurde eine singleplex-PCR für das Dengue-Virus durchgeführt, welche ebenfalls negative Ergebnisse lieferte.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese. In keiner der 10 Proben ist eine Nukleinsäurebande zu sehen, sodass davon auszugehen ist, dass die isolierten Blutproben keine Dengue-Virus-RNA enthielten. Zu diskutieren bleibt daher, weshalb die Dengue-Virus-RNA nicht mittels der RT-mPCR-ELISA-Methode detektiert werden konnte.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass 22 Patienten aus Tansania sowohl ein positives Ergebnis für Malaria in der Gelelektrophorese als auch in der ELISA-Hybridisierungsreaktion aufwiesen und diese Patienten ebenfalls einen positiven Malaria-Schnelltest zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten.

Jedoch konnten weder aus der Studienpopulation aus Sengerema noch aus den 10 Proben aus Dar es Salaam Arboviren detektiert werden.

Abbildung 23: Gelelektrophorese der Proben 1-9

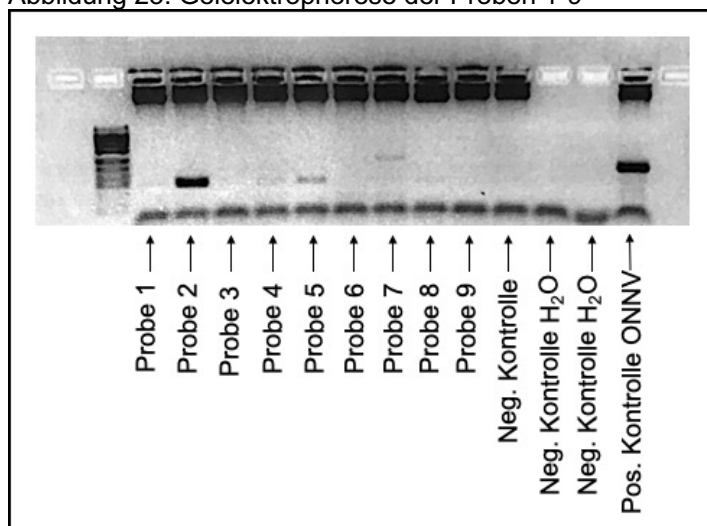
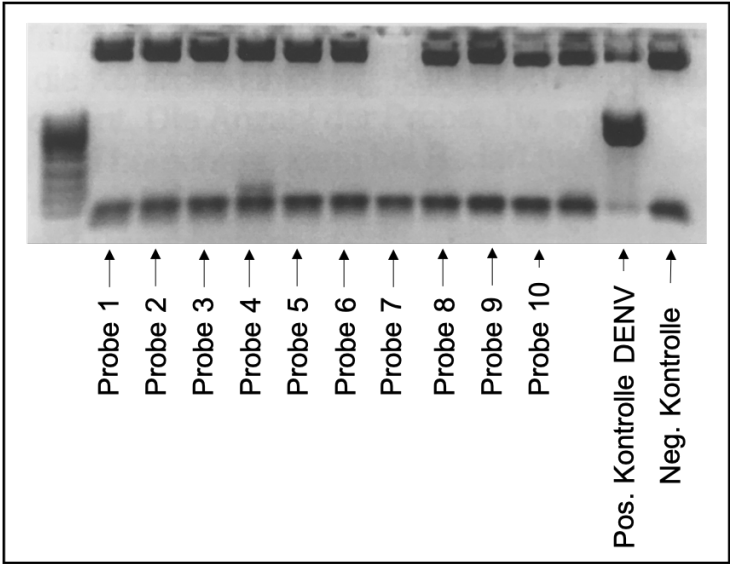


Abbildung 24: Gelelektrophorese der Proben 1-10 aus Dar es Salaam



4.3 Auswertung der serologischen Daten

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden insgesamt 97 Serumproben von 89 Kindern und 8 Eltern zur serologischen Testung an das Fraunhofer Institut (FHI) in Leipzig gesendet. In die statistische Auswertung wurden nicht alle 89 Kinder, sondern lediglich 87 Kinder eingeschlossen, da 2 Probanden ein Alter unter 6 Monaten aufwiesen und damit die Einschlusskriterien nicht erfüllten. Grund für dieses Kriterium ist die Annahme, dass mögliche positive AK-Testungen bei Kindern unter 6 Monaten auf das Vorliegen von maternalen Antikörpern zurückzuführen sein kann.

Wie in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben, wurde die Bestimmung von Anti-DENV-IgG/IgM und Anti-CHIKV-IgG vorgenommen.

Im Rahmen der Promotionsarbeit von T. Daniel (2019) wurde die Erkenntnis gewonnen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit eine akute Malariainfektion die Dengue-Antikörperreaktion beeinflusst. Zur Verifizierung dieser Theorie nahm das FHI eine weitere serologische Untersuchung einiger MRDT-positiven und MRDT-negativen Proben der Studienpopulation von T. Daniel (2019) aus Sengerema vor. Die Ergebnisse dieser weiterführenden Testung zeigten, dass bei Proben mit akuter Malariainfektion Antikörperreaktionen auf nicht humanpathogene Erreger stattfanden, wodurch eine generell unspezifische Antikörperreaktion bei malariapositiven Probanden angenommen werden kann (Daniel, 2019). Die serologischen Daten von Patienten mit akuter Malariainfektion sind daher unter Vorbehalt zu betrachten.

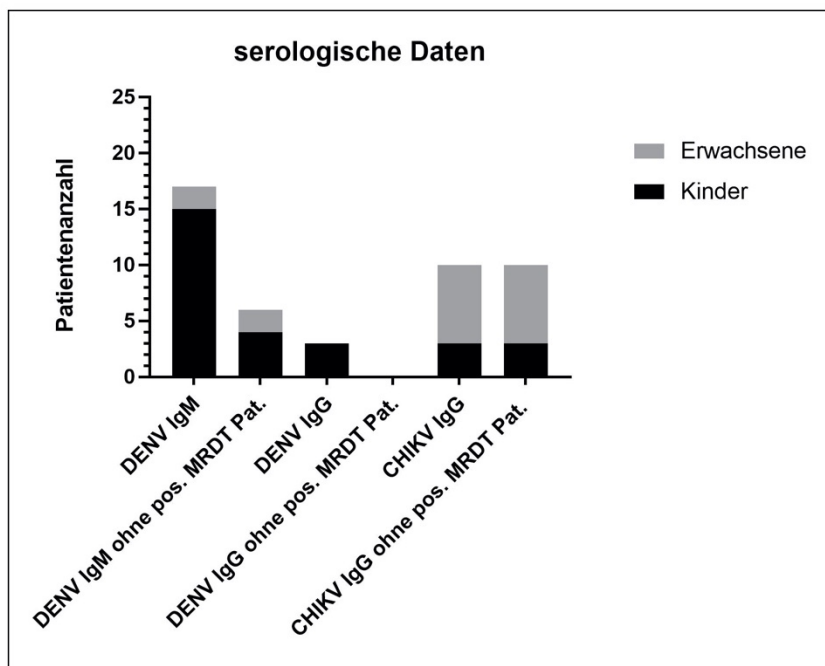
Abbildung 25 zeigt in Form eines Balkendiagramms die Ergebnisse der serologischen Tests, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durch das FHI durchgeführt wurden. Das Diagramm verdeutlicht die Gesamtanzahl an Antikörperreaktionen gegen das DENV und das CHIKV sowie zusätzlich separat die Anzahl an Antikörperreaktionen der Patienten ohne positiven MRDT. Die Subtraktion der Patienten mit positiven MRDT diente dazu, die unspezifischen Antikörperreaktionen herauszurechnen und die serologischen Daten dadurch aussagekräftiger zu gestalten.

Ohne Herausrechnen der Patienten mit positivem MRDT wurden bei 15 Kindern (17,2 %) und 2 Erwachsenen Anti-DENV-IgM, bei 3 Kindern (3,4 %) Anti-DENV-IgG sowie bei 3 Kindern (3,4 %) und 7 Erwachsenen Anti-CHIKV-IgG detektiert.

Besonders bezüglich der Antikörperreaktionen gegen das Dengue-Virus veränderte sich das Verhältnis zwischen positiven und negativen Testergebnissen merklich bei gezielter Missachtung der Patienten mit positiven MRDT. Somit ergab sich nach der Subtraktion eine verlässlichere Anzahl von 4 Kindern (4,6 %) und 2 Erwachsenen mit

Anti-DENV-IgM, während alle Probanden negative Anti-DENV-IgG zeigten. Die Anzahl an Kindern und Erwachsenen mit Anti-CHIKV-IgG hat sich durch das Herausrechnen der MRDT-positiven Patienten hingegen nicht verändert.

Abbildung 25: Ergebnisse der serologischen Tests



4.4 Auswertung der Daten der erwachsenen Probanden

Die Population der im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführten Studie umfasst zusätzlich zu den 135 Kindern 8 erwachsene Elternteile der Kinder. Im Zeitraum von Anfang Februar bis Ende März 2018 wurde bei diesen Probanden nach ausführlicher Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung eine venöse Blutentnahme durchgeführt.

Das primäre Ziel dieser Blutgewinnung war es, einen serologischen Vergleich der Dengue- und Chikungunya-Antikörperlast zwischen den Erwachsenen und den Kindern, die im selben Expositionsgebiet leben, aufstellen zu können. Diese Daten über die Seroprävalenz in den verschiedenen Altersstufen geben Aufschlüsse bezüglich des endemischen Auftretens dieser Arboviren in der Region um den Viktoriasee.

4.4.1 Allgemeine Daten der Probanden und Probengewinnung

Die allgemeinen personenbezogenen Daten der Probanden wurden mithilfe eines im Rahmen dieser Promotionsarbeit erstellten Fragebogens ermittelt (siehe Kp.10.4). Bei den 8 erwachsenen Probanden mit Durchschnittsalter von 35 Jahren handelte es sich um einen Vater und 7 Mütter, die alle eine Blutsverwandschaft zu den zugehörigen Kindern aufwiesen. Sie gaben alle eine unauffällige Anamnese bezüglich chronischer Vorerkrankungen, HIV-Infektionen und syndromaler Erkrankungen an. Alle Probanden schliefen regelmäßig unter einem Moskitonetz. Zusätzlich lieferte der Fragebogen Auskunft über den Zeitpunkt der letzten fieberhaften Erkrankung sowie über die aufgetretenen Symptome einer in der Vergangenheit angenommenen Malariainfektion.

Einige Fragen konnten nur ungenügend beantwortet werden, was vorwiegend an der mangelnden Erinnerungsfähigkeit lag.

Von allen Probanden gaben 3 an, innerhalb der letzten 4 Wochen an einem fieberhaften Infekt erkrankt zu sein, während ein Proband die Zeitspanne seit der letzten fiebrigen Infektion auf 1 Jahr und 2 Probanden auf mehrere Jahre schätzten. Demgegenüber gaben 2 Probanden an, noch nie Fiebersymptome erlitten zu haben. Auf die Frage nach der Anzahl vergangener Malariainfektionen bezeugten 3 Probanden, sie seien noch nie an Malaria erkrankt zu sein. Hingegen waren 3 Erwachsene einmalig betroffen und jeweils ein Proband war zweimalig bzw. dreimalig betroffen. Bei 4 der 5 in der Vergangenheit an Malaria erkrankten Probanden wurden die Malariainfektionen mit Arthemeter/Lumefantrin therapiert und

ein Proband erhielt die Kombination aus Sulfadoxin und Pyrimethamin. Lediglich 1 erwachsener Proband wurde einmalig stationär in einem kleinen Gesundheitszentrum behandelt.

Als häufigste Symptome während einer der vergangenen Malariainfektionen wurden Kopf- und Bauchschmerzen sowie einmalig Harnwegsbeschwerden geschildert.

Das entnommene Blut der Erwachsenen wurde zur Konservierung auf die „Whatman 903 Protein Saver Cards“ geträufelt und auf gleiche Weise wie die Filterpapierkarten der Kinder gelagert. Zusätzlich wurde ein Teil des venösen Bluts zentrifugiert und das dadurch gewonnene Serum/Plasma in Mikroschraubröhrchen eingefroren.

4.4.2 Testergebnisse

Das gewonnene Blut aller 8 erwachsenen Probanden wurde genutzt, um einen Malaria-Schnelltest vor Ort durchzuführen und die RT-mPCR-ELISA-Methode in Deutschland anzuwenden. Zusätzlich wurde nachträglich eine serologische Analyse der Proben auf Anti-DENV-IgG/IgM und Anti-CHIKV-IgG durch das Fraunhofer Institut durchgeführt.

Alle Probanden zeigten sowohl im Malaria-Schnelltest als auch in der RT-mPCR-ELISA-Methode negative Ergebnisse, woraus sich schließen lässt, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei keinem der Erwachsenen eine akute Malariainfektion bestand.

Die serologische Auswertung der Blutproben wurde auf gleiche Weise wie die Serumproben der Kinder durch das FHI vorgenommen, wodurch sich nachfolgend gelistete Ergebnisse ergaben. Von allen 8 Probanden wiesen 2 Anti-DENV-IgM auf, während keiner der Probanden in Folge einer akuten Dengue-Virus-Infektion Anti-DENV-IgG zeigte.

Hervorzuhebende Ergebnisse lieferte die serologische Analyse der Blutproben der Erwachsenen in Hinblick auf Anti-CHIKV-IgG. Insgesamt traten bei 7 von 8 Probanden positive CHIKV-IgG-Antikörperreaktionen auf, was eine Seropositivität von 87,5 % der Erwachsenen ergibt. Im Vergleich dazu zeigten die serologischen Daten der Kinder nur eine Seropositivität bezüglich Anti-CHIKV-IgG von 3,4 %.

4.5 Daten aus Burkina Faso

4.5.1 Studienpopulation

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde neben der Studienpopulation in Sengerema (Tansania) weitere Probanden in Ouagadougou, der Hauptstadt Burkina Fasos, generiert und die Daten gleichermaßen ausgewertet. Unter der Leitung von F. Schumacher wurden von mehreren Ärzten im Hôpital Saint Camille de Ouagadougou im Zeitraum von November 2017 bis März 2018 anamnestische Daten und Blutproben von insgesamt 114 Kinder als Probanden für die Studie herangezogen.

Nach Überprüfung derselben Einschlusskriterien wie für die Studienpopulation aus Sengerema (siehe Kp.4.2.2.3) reduzierte sich die Probandenanzahl von 114 auf 73, da 39 Kinder aufgrund einer axillären Körpertemperatur unter 38 °C herausgerechnet werden mussten.

4.5.2 Datenerhebung und Probengewinnung

Die Erhebung der Daten beruhte auf den gleichen Fragebögen, welche auch für die Erfassung der Daten in Sengerema angewendet wurden (siehe Kp. 10.2). Die Vollblutproben wurden mithilfe der gleichen Filterpapierkarten zur Auswertung nach Deutschland transportiert. Einziger Unterschied im Transport war, dass den Filterpapierkarten keine Trockenkügelchen beigegeben wurden und somit die trockenen Lagerungsverhältnisse nicht sichergestellt werden konnten. Zu diskutieren bleibt, ob das Fehlen der Trockenkügelchen einen Unterschied in Bezug auf die Konservierungsfähigkeit der Filterkarten beigetragen hat.

Vor Ort wurde in Abweichung zur Probengewinnung in Sengerema eine zusätzliche serologische Dengue-Virus-Diagnostik durchgeführt. Dazu wurde neben einem NS1-Antigen-Schnelltest die Last an Anti-DENV-IgG/IgG serologisch bestimmt. Die weitere Datenermittlung mittels Malaria-Schnelltest, Urinstix und Blutbilddiagnostik deckte sich mit der in Sengerema angewendeten Methode (siehe Kp.4.2.2.4).

4.5.3 Allgemeine Patientendaten und Daten der klinischen Untersuchung

Die Auswertung der allgemeinen Daten der Patienten und der Befunde ihrer klinischen Untersuchung wurde sowohl für die gesamte Studienpopulation von 114 Kindern als auch separat für die auf Grundlage des Einschlusskriteriums korrigierte Studienpopulation von 73 Kindern durchgeführt. Dadurch lässt sich ein möglicher Einfluss der Einschlusskriterien, besonders der axillären Temperatur zum Zeitpunkt der Datenerhebung, auf die Studienergebnisse untersuchen.

Da die Methode zur Datenauswertung deckungsgleich mit derjenigen aus Tansania ist, wurden die Ergebnisse einfachheitshalber in der nachfolgenden Tabelle 21 zusammengefasst und mit den Ergebnissen aus Tansania gegenübergestellt. Auf diese Weise konnten gravierende Unterschiede zwischen den beiden betrachteten Studienpopulationen einfach und deutlich hervorgehoben werden.

Tabelle 21: Auswertung und Vergleich der Daten aus Burkina Faso mit den Daten aus Sengerema

	Burkina Faso				Tansania	
	N=114		N=73		N=135	
Allgemeine Daten						
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀
	55%	45%	60%	40%	55%	45%
Alter (Median) (Monate)	43,5		37		16	
Unterernährung (Anzahl)	35 (30,7%)		23 (31,5%)		17 (12,6%)	
Atemfrequenz (Atemzüge/min)	24		26		49	
Herzfrequenz (Herzschläge/min)	106		110		156	
Temperatur (°C)	38,0		38,5		38,9	
Impfstatus/Vorerkrankungen						
Impfstatus aktuell (Anzahl)	99 (86,8%)		63 (86,3%)		53 (39,3%)	
Chronische Erkrankungen	0		0		2 (1,5%)	
Sichelzellanämie	0		0		5 (3,7%)	
HIV-Infektion	1 (0,9%)		1 (1,4%)		2 (1,5%)	
Syndromale Erkrankungen	0		0		2 (1,5%)	

Prämedikation			
Anzahl	106 (93,0%)	68 (93,2%)	115 (85,2%)
Antibiotikabehandlungen (Anzahl)	41 (38,7%)	24 (35,3%)	40 (34,8%)
Antimalaria-Medikation (Anzahl)	17 (16,0%)	13 (19,1%)	38 (33,0%)
Einsatz von Schmerzmittel (Anzahl)	105 (99,1%)	67 (98,5%)	98 (85,2%)
Symptome			
Zeitspanne seit Beginn: (Median) (Tagen)	3	4	3
Hautausschlag (Anzahl)	2 (1,8%)	2 (2,7%)	25 (18,5%)
Gastrointestinale Symptome (Anzahl)	47 (41,2%)	25 (34,2%)	59 (43,7%)
Schmerzen (Anzahl)	77 (67,5%)	44 (60,3%)	53 (39,3%)
Harnwegsinfekt (Anzahl)	3 (2,6%)	1 (1,4%)	14 (10,4%)
Blässe (Anzahl)	6 (5,3%)	4 (5,5%)	26 (19,3%)
Dehydrierung (Anzahl)	9 (7,9%)	3 (4,1%)	6 (4,4%)
Ödeme (Anzahl)	4 (3,5%)	3 (4,1%)	2 (1,5%)
Hepatomegalie (Anzahl)	10 (8,8%)	7 (9,6%)	18 (13,3%)
Splenomegalie (Anzahl)	2 (1,8%)	1 (1,4%)	9 (6,7%)

Erkältung (Anzahl)	66 (57,9%)		48 (65,8%)		107 (79,3%)
Pneumonie (Anzahl)	14 (12,3%)		9 (12,3%)		24 (17,8%)
Meningitis (Anzahl)	0		0		7 (5,2%)
Testergebnisse					
Positive MRDTs (Anzahl)	111		73		135
	25 (22,5%)		18 (24,7%)		27 (20,0%)
Positive PCR (Anzahl)	114		73		135
	40 (36,0%)		26 (35,6%)		22 (16,3%)
Positive Dengue- Schnelltests (Anzahl)	113		72		91
	8 (7,1%)		8 (11,1%)		0
Positive Dengue- Serologie (Anzahl)	IgM	IgG	IgM	IgG	
	7	15	4	13	
	(6,2%)	(13,3%)	(5,6%)	(18,1%)	
Hb (g/dl) (Median)	11,70		11,50		9,55
Arbeitsdiagnosen (Anzahl)					
Dengue-Fieber	15 (13,2%)		12 (16,4%)		0
Typhus Fieber	4 (3,5%)		3 (4,1%)		0
Malaria	21 (18,4%)		15 (20,5%)		29 (21,5%)
Harnwegsinfekt	6 (5,3%)		4 (5,5%)		15 (11,1%)
Pneumonie	17 (14,9%)		12 (16,4%)		23 (17,0%)
Oberer Atemwegsinfekt	27 (23,7%)		16 (21,9%)		44 (32,6%)
Gastrointestinaler Infekt	33 (28,9%)		15 (20,5%)		15 (11,1%)
Anämie	0		0		9 (6,7%)
Sepsis	0		0		0
Sichelzellanämie	0		0		3 (2,2%)
Maßnahmen					
Antibiotika (Anzahl)	32 (28,1%)		22 (30,1%)		96 (71,1%)
Antimalariamedikation (Anzahl)	23 (20,2%)		18 (24,7%)		28 (20,7%)
Schmerzmittel (Anzahl)	101 (88,6%)		66 (90,4%)		132 (97,8%)

Stationäre Aufnahme (Anzahl)	50 (43,9%)	31 (42,5%)	41 (30,4%)
Aufenthaltsdauer (Tage) (Median)	3	3	5,5

Tabelle 22: Konkordanz zwischen MRDT und RT-mPCR-ELISA (Burkina Faso)

		MRDT		Summe	Wahrscheinlichkeit
		Neg.	Pos.		
PCR	Neg.	42	5	47	64%
	Pos.	13	13	26	36%
Summe		55	18	73	
Wahrscheinlichkeit		75%	25%		

Berechnung der Häufigkeit der Übereinstimmung P_0 :

$$P_0 = \frac{42 + 13}{73} = 0,75$$

Berechnung der Häufigkeit der zufälligen Übereinstimmung P_e

$$P_e = 0,75 \times 0,64 + 0,25 \times 0,36 = 0,57$$

Berechnung von *Cohen's K*:

$$Cohen's K = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e} = \frac{0,75 - 0,57}{1 - 0,57} = 0,42$$

Tabelle 22: Berechnung des Cohen's kappa als statistisches Maß zur Beurteilung der Übereinstimmung von MRDT und PCR (Idiostatics, 2020).

Interpretation:

- 0,01-0,20 => leichte Übereinstimmung
- 0,21-0,40 => angemessene Übereinstimmung
- 0,41-0,60 => moderate Übereinstimmung
- 0,61-0,80 => wesentliche Übereinstimmung
- 0,81-1,00 => ausgezeichnete Übereinstimmung

5 Diskussion

5.1 Klinische Daten aus Sengerema

5.1.1 Probanden

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine Probandenanzahl von 135 Kindern und 8 Erwachsenen generiert. Im Vergleich zu anderen Studien in Tansania mit ähnlichem Forschungshintergrund stellt dies eine verhältnismäßig kleine Populationsgröße dar (D'Acremont et al., 2014). Trotzdem lieferte der generierte Datensatz aussagekräftige Ergebnisse. Der Zeitraum der Probengewinnung von Oktober 2017 bis März 2018 umfasst die Trockenzeit und die kleine Regenzeit von Oktober bis November. Jedoch konnte das Auftreten von jahreszeitlichen Schwankungen in den Ergebnissen der Datenauswertung nicht ausgeschlossen werden.

5.1.2 Daten der körperlichen Untersuchung

5.1.2.1 *Ernährungszustand*

Die Daten hinsichtlich des Ernährungszustands der Kinder zeigen, dass 8 Kinder überdurchschnittlich gut ernährt waren und 17 Kinder untergewichtig.

Eine Studie aus der Kilimanjaro Region in Tansania von 2012 verdeutlicht, dass für Kinder mit einem Lebensalter über 12 Monate im Vergleich zu Babys unter 12 Monaten ein erhöhtes Risiko besteht, an einer Unterernährung zu leiden (Abubakar et al., 2012). Die Daten dieser Promotionsarbeit spiegeln dies wider, denn 13 von 17 unterernährten Kindern (76,5 %) hatten das erste Lebensjahr vollendet, wohingegen sich 7 von 8 überdurchschnittlich gut genährten Kindern (87,5 %) im ersten Lebensjahr befanden. Gründe für das ungleichverteilte Auftreten von Unterernährung in verschiedenen Altersstufen gibt es mehrere. Unter anderem haben schwere Erkrankungen im Kindesalter einen negativen Einfluss und gleichzeitig das Stillen im ersten Lebensjahr einen positiven Einfluss auf den Ernährungszustand (Abubakar et al., 2012).

5.1.2.2 *Vitalparameter*

Anhand der Daten der gemessenen Atem- und Herzfrequenzen konnte festgestellt werden, dass die Kinder im Durchschnitt eine Tachypnoe und Tachykardie aufwiesen, welche mit großer Wahrscheinlichkeit im Zuge der fieberhaften

Erkrankung auftraten oder aber Ausdruck der stressbehafteten Situation sind, in der sich das Kind während der körperlichen Untersuchung befand.

Erhöhte Atem- und Herzfrequenzen, Körpertemperaturen von über 39 °C und eine Sauerstoffsättigung von weniger als 94 % sind vitale Warnzeichen einer ernsthaften Erkrankung (Thompson et al., 2009).

Deckungsgleiche Ergebnisse liefern die Daten dieser Promotionsarbeit. Alle 13 Kinder mit einer Sauerstoffsättigung unterhalb 90 % litten an ernsthaften Erkrankungen wie Pneumonien, Malariainfektionen oder Sichelzellanämie-Krisen. Zudem lag die Körpertemperatur der Kinder mit nachgewiesener Malariainfektion durchschnittlich über der Körpertemperatur der Kinder ohne Malariaerkrankung.

5.1.2.3 Impfstatus und chronische Erkrankungen

Die Ergebnisse der Erhebung des Impfstatus sind mit Vorsicht zu interpretieren, da die Dokumentation des Impfausweises unzuverlässig und von wechselnden Einrichtungen wie Krankenhäusern, Health Centers oder Dispensaries erfolgte. Die Tatsache, dass nur bei 43 % der Kinder eine vollständige Immunisierung erfasst werden konnte, hängt vermutlich auch damit zusammen, dass viele Daten nur anhand von mündlichen Angaben erhoben werden konnten und eine sprachliche Barriere den Datenaustausch erschwerte.

Das nationale Immunisierungsprogramm Tansanias ist eines der besten Afrikas. Aus einer Rezension von 2017 kann entnommen werden, dass >90 % der Kinder zwischen 2010-2014 eine dreifache Gabe der Impfstoffe gegen Tetanus, Diphtherie, Pertussis, Hepatitis B und *Haemophilus influenzae* Typ B erhielten. Tansania ist weiterhin bemüht, das Impfprogramm zu verbessern und besonders in den ländlichen Regionen eine höhere Immunisierungsrate zu erzielen (Lyimo et al., 2017).

Das Diagnostizieren einer chronischen Erkrankung stellte sich als schwierig heraus, da einem Verdacht auf eine chronische Erkrankung aufgrund von mangelnden Diagnostikmöglichkeiten nicht nachgegangen werden konnte. Im Allgemeinen fehlen in Sengerema regelmäßige Routineuntersuchungen im Kindesalter, sodass viele chronische Erkrankungen unentdeckt bleiben.

5.1.2.4 Fieberbeginn

Die Detektion von Nukleinsäuren mittels der RT-mPCR kann nur erfolgen, wenn die Blutproben während der virämischen Phase der Viruserkrankung gewonnen wurden (Leon et al., 2018). Die höchste Viruslast im Blut des Patienten liegt an Tag 2 und 3 nach Symptombeginn vor (Muller, Depelsenaire, & Young, 2017; WHO, 2009). Demzufolge liefern die Daten über den Fiebereintritt der Probanden wichtige Informationen über die Höhe der potentiellen Viruslast und die daraus resultierende mögliche Detektierbarkeit. Die Mehrheit der Blutproben (110 Proben) wurde während der virämischen Phase entnommen. Demnach ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der RT-mPCR in Bezug auf mögliche Virusinfektionen aussagekräftig sind.

5.1.2.5 Symptome

Legt man besonderes Augenmerk auf die Symptome von Patienten mit einer Malariainfektion, wird deutlich, dass neben Fieber unspezifische gastrointestinale Beschwerden und allgemeines Unwohlsein im Vordergrund stehen. Diese Ergebnisse sind mit der Tatsache konkordant, dass eine Malariaerkrankung meistens mit unspezifischen Symptomen beginnt und besonders Kinder diffuse Symptommanifestationen zeigen (Mwangi et al., 2005; White et al., 2014).

Ebenfalls bemerkenswert ist, dass etwa 60 % der Kinder mit einer Malariadiagnose im Zuge der Anamnese Erkältungssymptome angaben. Ähnlich hohe Werte liefern die Daten aus einer Studie von D'Acremont et al. (D'Acremont et al., 2014).

Zu beachten bleibt, dass Malaria selbst als Risikofaktor für bakterielle Infektionen angesehen wird und deswegen in der Regel etwa 5-8 % der Kinder mit schweren Malariaerkrankungen Koinfektionen mit bakteriellen Erregern aufweisen (Bronzan et al., 2007; Mtove et al., 2011). Die Daten dieser Promotionsarbeit bestätigen dies dahingehend, dass bei knapp 7 % aller Probanden mit einer Malariadiagnose zusätzlich eine Pneumonie diagnostiziert wurde. Offen bleibt jedoch, ob es sich dabei tatsächlich um bakterielle Infektionen handelte oder ob die Beschwerden viraler Herkunft waren. Dennoch ist Tatsache, dass aufgrund der unspezifischen Symptome eine rein klinische Malariadiagnose unzulässig ist und besonders bakterielle Koinfektionen nicht außer Acht gelassen werden sollten (Graz, Willcox, Szeless, & Rougemont, 2011; Scott et al., 2011; G. E. A. Strøm, Haanshuus, Fataki, Langeland, & Blomberg, 2013)

5.1.3 Daten der laboratorischen Investigationen

In der Erhebung der Blutbilddaten ergaben sich Komplikationen, da die Laborgerätschaften nicht ordnungsgemäß in Stand gehalten wurden und teilweise für mehrere Wochen aufgrund von Reparaturen ausfielen. Somit sind die Daten unter Vorbehalt zu interpretieren.

5.1.3.1 Hämoglobinwerte

In den meisten Fällen manifestiert sich eine Malariainfektion mitunter durch eine leicht- bis schwerwiegende Anämie (White et al., 2014). Dadurch lässt sich plausibel erklären, dass 48 % aller MRDT-positiven Patienten einen Hämoglobinwert unter 9 g/dl aufwiesen und damit an einer Anämie litten.

Begründet wird die Anämie dadurch, dass die Immunfunktion und filtrative Clearance der Milz die von Parasiten befallenen Erythrozyten und die nichtinfizierten Erythrozyten entfernt (Buffet et al., 2011).

5.1.3.2 Weitere Blutwerte

Von allen Blutwerten kommt den Daten der Thrombozytenzahlen eine besonders große Bedeutung zu und werden daher im Folgenden diskutiert.

Eine Malariainfektion kann Gerinnungsstörungen zur Folge haben, da es häufig schon bei leichten Verläufen zu Thrombozytopenien kommt (White et al., 2014). In diesem Kontext werden die erfassten Thrombozytenwerte der MRDT-positiven Patienten mit den Werten der gesamten Population verglichen. Anhand der Daten kann bestätigt werden, dass Thrombozytopenien häufig im Rahmen einer Malariainfektion auftreten.

Schlussfolgernd können Blutwerte, besonders Erythrozyten- und Thrombozytenwerte, hilfreich zur Diagnostik einer Malariainfektion sein.

5.1.4 Testergebnisse

5.1.4.1 Malaria-Schnelltests

Im Krankenhaus in Sengerema wird nach der WHO-Leitlinie standardmäßig bei jedem fieberhaften Patienten ein Malaria-Schnelltest durchgeführt (WHO, 2012). Die Ergebnisse der durchgeführten MRDTs im Rahmen dieser Promotionsarbeit bestätigen die Angaben des Herstellers bezüglich der Sensitivität und der Spezifität des Tests (nal von minden GmbH, 2016). Es konnte eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 96 % festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass

MRDTs verlässliche Diagnostikverfahren darstellen. Vorteile der MRDTs sind, dass sie ohne große Expertise auch in ländlichen Regionen leicht durchzuführen sind und sie ein verlässliches Ergebnis innerhalb von 5-20 min liefern (Murphy et al., 2013). Die Testergebnisse sind vor dem Hintergrund zu beurteilen, dass die vorgeschriebene Wartezeit bis zum endgültigen Testergebnis vom Klinikpersonal nur selten eingehalten wurde.

Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass Antigene der Parasiten, vor allem das Antigen HRP2, über mehrere Wochen nach erfolgreicher Therapie im Blut persistieren (Mayxay, Pukrittayakamee, Chotivanich, Looareesuwan, & White, 2001; N. Singh & Shukla, 2002). Folglich können Schnelltests während dieser Zeit falsch-positive Ergebnisse liefern. Die Dauer der MRDT-Positivität ist abhängig vom verwendeten Schnelltest und dem jeweiligen Zielantigen. Außerdem zeigte eine Studie, dass Kinder eine längere MDRT-Positivität aufweisen als Erwachsene und dass die anhaltende Positivität besonders nach einer Artemisinin-Kombinationstherapie auftritt (Dalrymple, Arambepola, Gething, & Cameron, 2018). Die Daten dieser Arbeit können dahingehend interpretiert werden, dass die 5 Kinder mit positivem Malaria-Schnelltest, jedoch negativem mPCR-Ergebnis keine aktive Malariainfektion aufwiesen. Das in diesen Fällen vorliegende falsch-positive MRDT-Ergebnis ist auf die persistierende Antigenämie zurückzuführen. Auffallend ist zudem, dass 3 dieser 5 Kinder anamnestisch angaben, vor der Konsultation im Krankenhaus Artemisinin-Kombinationstherapien (Artemether-Lumefantrin) eingenommen zu haben. Dies hatte vermutlich einen verlängernden Einfluss auf die MRDT-Positivität.

5.1.4.2 Lichtmikroskopie

Obwohl die Lichtmikroskopie als Goldstandard zur Diagnose von Malaria gilt wurde diese Diagnostikmethode im Studienort Sengerema nicht angewendet. Grund dafür ist vermutlich die einfachere Handhabung der Schnelltests (Kiemde et al., 2017; Murphy et al., 2013). Jedoch kamen 2 Probanden mit einem Lichtmikroskopieergebnis von einem ländlich gelegenen Gesundheitszentrum. Die Tatsache, dass in ländlichen kleinen Zentren zum Malarianachweis häufiger die Lichtmikroskopie eingesetzt wird, könnte darauf zurückzuführen sein, dass dieses Verfahren günstiger ist als die Schnelltests (B. Singh & Daneshvar, 2013).

Laut den Ergebnissen einer Studie von Kahama-Maró et al. (2011) liefert die Lichtmikroskopie vermehrt falsch-positive Ergebnisse, was zur Folge hat, dass

Malaria überdiagnostiziert wird (Kahama-Maró, D'Acremont, Mtasiwa, Genton, & Lengeler, 2011). Parallelen können zu den Ergebnissen der Blutaussstriche der zwei Probanden aus Sengerema gezogen werden. Diese wiesen jeweils ein positives Ergebnis auf, welches weder durch einen Schnelltest noch durch das RT-mPCR-ELISA-Verfahren bestätigt werden konnte, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese Ergebnisse falsch-positiv waren und folglich die Kinder fälschlicherweise die Diagnose Malaria erhielten. Gründe für die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen der Lichtmikroskopie könnten die fehlende Schulung des Personals und der mangelhafte Standard der Laborausstattung in ländlichen Regionen sein (Ashraf et al., 2012). Es sollte darüber diskutiert werden, ob die Schnelltests die Lichtmikroskopie flächendeckend in allen Gesundheitsebenen ersetzen sollten, so wie es im Sengerema Designated District Hospital bereits der Fall ist.

5.1.4.3 Dengue-Schnelltest

Die Problematik bei der Durchführung der Dengue-Schnelltests bestand darin, das benötigte Serum zu gewinnen. Besonders bei sehr jungen Säuglingen gestaltete sich die Venenpunktion schwierig, sodass nicht bei jedem Probanden Serum entnommen und ein Dengue-Schnelltest durchgeführt werden konnte.

Das Ergebnis dieser Promotionsarbeit, dass kein aktiver Dengue-Fieber-Fall gefunden wurde und dass das Dengue-Virus vermutlich zur Zeit der Probengewinnung nicht aktiv in Sengerema zirkulierte, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien. Es kann davon ausgegangen werden, dass Dengue-Virus-Infektionen nur während der Ausbrüche gehäuft auftreten, wohingegen sie in den Zwischenzeiten lediglich einen geringen Teil der arboviralen Infektionen ausmachen (Budodo et al., 2020; Hertz et al., 2012; Kajeguka et al., 2016).

Die Abwesenheit der Dengue-Viren während des Zeitraums der Probenentnahme hat zur Folge, dass die postulierte Hypothese, dass sich mit NS1-Antigen-Schnelltests aktive Dengue-Fieber-Fälle detektieren lassen, nicht bestätigt werden kann. Für ein tieferes Verständnis der Epidemiologie des Dengue-Virus bedarf es weiterer Forschung.

5.1.5 Prämedikation

Bei der Erfassung der Prämedikation entstanden Komplikationen zum einen dadurch, dass die Begleitpersonen nicht zwangsläufig die Eltern waren und diese demnach nicht ausreichend über die vorherigen Medikamenteneinnahmen informiert waren. Zum anderen zeigte sich eine sprachliche Hürde, da ein und dasselbe Medikament in verschiedenen Stammessprachen unterschiedlich benannt wird.

Die Erfassung der Prämedikation spielt dahingehend eine Rolle, dass in ländlichen Regionen bis zu 70 % der Patienten mit Verdacht auf eine Malariainfektion aufgrund von langen Wegen bis ins nächste Krankenhaus ohne fachmännische Anweisung eigenständig Medikamente kaufen und einnehmen (Hume et al., 2008). Ähnliche Zahlen liefern die Daten dieser Promotionsarbeit, denn 85 % aller Kinder hatten bereits zu Hause Medikamente eingenommen.

Die vorzeitige Selbstmedikation mit Antibiotika, die in den meisten Fällen nachträglich von einem Arzt als sinnvoll angesehen und weiter verordnet wurde, kann kontrovers diskutiert und beurteilt werden. Zwar kann durch die vorzeitige Antibiotika-Einnahme eine bakterielle Infektion frühzeitig therapiert werden, wodurch sich ein schwerer Verlauf verhindern lässt. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass die meisten Infektionen bei Kindern viralen Ursprungs sind und Antibiotika in diesen Fällen wirkungslos sind (D'Acremont et al., 2014).

Hinsichtlich der Prämedikation mit Anti-Malaria-Medikamenten gilt, dass bei 74 % der Kandidaten die Medikation als nicht erforderlich vom Arzt angesehen wurde. Diese Tatsache bestätigt die Sinnhaftigkeit der neuen WHO-Leitlinie, nach der eine Malaria-Medikation nur nach vorangegangenen Test begonnen werden sollte (WHO, 2013b).

5.1.6 Maßnahmen im Krankenhaus

5.1.6.1 Gestellte Arbeitsdiagnosen

Am häufigsten wurden bei den Probanden respiratorische Infekte diagnostiziert. Gleiche Ergebnisse liefern die Daten einer Studie von D'Acremont et al. (D'Acremont et al., 2014)

Die zweithäufigste Diagnose bildete Malaria. Dadurch wird bestätigt, dass diese parasitäre Erkrankung immer noch eine große Rolle in Endemiegebieten wie Tansania spielt (White et al., 2014).

5.1.6.2 Verordnete Medikamente

Zu diskutieren ist der hohe Anteil an verordneten Antibiotika unter allen Probanden.

Negativ zu bewerten ist die Tatsache, dass 91 % aller Kinder mit einem oberen Atemwegsinfekt eine Antibiotikagabe erhielten. Obere Atemwegsinfektionen werden in den meisten Fällen durch Viren hervorgerufen, sodass eine symptomatisch Behandlung einer Antibiotikatherapie vorzuziehen ist (WHO, 2013a). Demnach erhielten fast alle Kinder mit der Diagnose einer oberen Atemwegsinfektion eine nicht leitliniengerechte Therapie und wurden einer überflüssigen Gabe von Antibiotika ausgesetzt. Die großzügige Behandlung mit Antibiotika bei Kindern liefert in den meisten Fällen keinen Nutzen, sondern fördert stattdessen die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen (D'Acremont et al., 2014; Hazir et al., 2011).

Der Einsatz von Antibiotika im Fall eines Verdachts auf eine Malariainfektion sollte unter dem Gesichtspunkt betrachtet werden, dass es mehrere Ursachen für Fieber gibt und die verschiedenen Krankheiten durch überlappende Symptome nur schwer voneinander zu differenzieren sind. Für die Medikation mit Antibiotika bei Malariaverdacht spricht jedoch, dass bakterielle Infektionen nicht selten zusammen mit einer Malariainfektion auftreten (Mtove et al., 2011). Das Ergebnis dieser Arbeit, dass 17 % der Patienten mit einer Malariaerkrankung zusätzlich ein Antibiotikum erhielten, ist unter diesem Aspekt und nach WHO-Leitlinie gerechtfertigt und als sinnvoll zu betrachten (WHO, 2015).

Abschließend kann die These aufgestellt werden, dass die großzügige Gabe von Antibiotika auch damit zusammenhängt, dass viele Menschen in ländlichen Regionen große Distanzen bis ins nächste Krankenhaus überwinden müssen. Eine adäquate Verlaufskontrolle einer Erkrankung ist dadurch nicht gewährleistet, weshalb vorsorglich frühzeitig Antibiotika zum Einsatz kommen.

5.2 Auswertung der Dried Blood Spots

5.2.1 Diskussion der Malaria-Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode

Die RT-mPCR-ELISA-Methode zählt als die sensitivste Diagnostikmethode zur Detektion von Malariaparasiten, weshalb in dieser Studie die Ergebnisse der ELISA-Methode als Referenzergebnis verwendet wurden (Fançony, Sebastião, Pires, Gamboa, & Nery, 2013). Von allen 135 eingeschlossenen Kindern wiesen 27 einen positiven Malaria-Schnelltest auf, wovon wiederum 22 mithilfe der RT-mPCR-Methode als positiv bestätigt wurden. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass schwach positive RT-mPCR-Ergebnisse durch asymptomatische Parasitämien zustande kommen können. Weiterhin ist das Verfahren sehr anfällig für Kontaminationen (Murphy et al., 2013), was auch bei der Auswertung der Blutproben im Rahmen dieser Promotionsarbeit deutlich wurde. Mehrfach mussten RT-mPCR-Durchläufe wiederholt werden, da Kontaminationen auftraten, was eine Wiederholung der Durchläufe nach vorausgehender vollständiger Grundreinigung aller Instrumente und Arbeitsflächen erforderte. Die Bestimmung des Cohen's κ lieferte die Erkenntnis, dass die Ergebnisse der RT-mPCR und der Schnelltests einwandfrei übereinstimmen. Demnach kann hier der Schluss gezogen werden, wie auch in anderen Studien, dass MRDTs eine verlässliche Alternative zur RT-mPCR darstellen (Nkonya, Tarimo, & Kishimba, 2016).

Die These, dass Malaria am Studienort Sengerema überdiagnostiziert und übertherapiert wird, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Insgesamt erhielten 29 Kinder eine Malariadiagnose, von denen 27 Kinder einen positiven Schnelltest und 2 Kinder ein positives Ergebnis im Blutaussstrich aus einem anderen Gesundheitszentrum aufwiesen. Als POCT werden in Sengerema standardmäßig vor Behandlungsbeginn Malaria-Schnelltests durchgeführt. Da konsequent nur bei positivem Schnelltest eine Anti-Malaria-Therapie begonnen wurde, trat keine Übertherapie auf.

Nicht zu vernachlässigen ist jedoch der hohe Anteil an Überdiagnostik und Übertherapie in anderen Gesundheitszentren sowie im häuslichen Umfeld, wo keine Schnelltests verfügbar sind und eine Diagnose anhand von klinischen Symptomen oder vermehrt fehlerbehafteten Lichtmikroskopie-Ergebnissen erfolgt (Hume et al., 2008; Reyburn et al., 2004).

Schlussendlich kann aus den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit das gleiche Fazit wie in der Studie von D'Acremont et al. Aus dem Jahr 2011 gezogen werden:

„MRDTs verhindern Fehldiagnosen und unnötige Malariabehandlungen“. Demnach sollte die Implementierung der Schnelltests zusammen mit der nötigen Personalschulung in allen Gesundheitsbereichen Tansanias fortgesetzt werden (D'Acremont et al., 2011)

5.2.2 Diskussion der Dengue-Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode

Hinsichtlich der Detektion von Dengue-Viren wurde die RT-mPCR-ELISA-Methode als Referenz verwendet. Die Ergebnisse der DBS waren alle in Bezug auf das Dengue-Virus negativ. Die Tatsache, dass auch alle NS1-Antigen-Schnelltests negativ ausfielen, bekräftigte die Annahme, dass keiner Probanden aus Sengerema an Dengue-Fieber erkrankt war.

Zu diskutieren sind die Ergebnisse der 10 Proben aus Dar es Salaam.

Die 10 Probanden wiesen zum Zeitpunkt der Probengewinnung einen positiven NS1-Antigen-Schnelltest auf. Weiterhin wurden akute Dengue-Virus-Infektionen bei 3 von ihnen durch das Schweizer Tropeninstitut mithilfe einer Real-time-mPCR bestätigt. Jedoch gelang es im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht, das Dengue-Virus aus den Proben zu isolieren und zu detektieren.

Die Ergebnisse einer Studie von Dauner et al. (2015) zeigen ebenfalls auf, dass die RNA von Dengue-Viren nur über einen geringen Zeitraum hinweg auf Filterpapierkarten stabil und detektierbar bleibt. Als potentielle Ursachen hierfür werden in der Studie mehrere Aspekte in Erwägung gezogen. Eine Hypothese der genannten Studie ist, dass eine Adhäsion zwischen der Nukleinsäure und dem Stabilisierungsprodukt der Filterpapierkarte zu einer verringerten Elution führt (Dauner et al., 2015). Zudem variieren die Elutionsmethoden und es besteht die Gefahr, dass sich durch bestimmte Verfahren eine nicht ausreichende Menge Nukleinsäure aus den Filterpapierkarten herauslöst (Smit et al., 2014).

Einfluss auf die Qualität der Filterpapierkarten haben sowohl die Menge an Blut auf den Spots und Kontaminationen als auch Umweltfaktoren wie Feuchtigkeit, Temperatur und Schimmelbefall (Smit et al., 2014). Eine falsche Lagerung der Filterpapierkarten wirkt sich ebenfalls nachteilig auf die Qualität der Proben aus (Snijdewind et al., 2012). So wurden beispielsweise die Proben aus Dar es Salaam auf unbekanntem Filterpapierpapier ohne Trockenkügelchen versendet. Dies stellt eine mögliche Fehlerquelle dar und könnte Grund für den gescheiterten Nachweis von Dengue-Virus-RNA durch die ELISA-Methode sein.

Die anfangs formulierte These, dass Filterpapierkarten ein geeignetes Konservierungsverfahren von Dengue-Virus-RNA darstellen, konnte auf Grundlage der oben diskutierten Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Das RT-mPCR-ELISA-Verfahren konnte keine Arboviren detektieren. Daraus ist zu schließen, dass die nachzuweisenden Arboviren im Zeitraum der Probengewinnung nicht oder nur in sehr geringem Maße endemisch waren. Zusätzlich sollte die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass die angewendete RT-mPCR-Methode aus DBS auf Filterpapierkarten, wie auch bei Dengue-Viren, Schwierigkeiten bei der Detektion von Arboviren aufweist. Diesbezüglich liefern jedoch die Daten anderer Studien konträre Ergebnisse, da sie den DBS in Bezug auf die Detektion von Viren, inklusive dem Dengue-Virus, eine gute Funktionalität zuschreiben (Anders et al., 2012; Prado et al., 2005).

Um valide beurteilen zu können, ob die betrachteten Arboviren im Studienort Sengerema tatsächlich nicht aktiv zirkulieren oder ob die Filterpapierkarten eine ungeeignete Konservierungsmethode darstellen, bedarf es weiterer Forschungen.

Allgemein sind die Banden der Gelelektrophorese mit Vorsicht zu bewerten, da durch kleinste Verunreinigungen unspezifisch amplifizierte Nukleinsäurebanden entstehen können. Dadurch lässt sich auch die Beobachtung erklären, dass mehrere Proben eine positive Bande in der Gelelektrophorese aufwiesen, welche sich jedoch im Rahmen der ELISA-Hybridisierungsreaktion als negative Ergebnisse herausstellten.

5.3 Auswertung der serologischen Daten

Die serologische Auswertung der Daten dieser Promotionsarbeit erfolgte durch das Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie. Untersucht wurden Anti-DENV-IgG/IgM und Anti-CHIKV-IgG.

Verschiedene Flaviviren weisen ähnliche Strukturproteine auf, wodurch es bei der antikörperbasierten Diagnostik zu Kreuzreaktivitäten und daraus resultierend zu falschen Ergebnissen kommen kann (Domingo et al., 2015). Indem das Fraunhofer Institut eine Methode mit rekombinanten, mutierten Proteinen anwandte, konnte die Kreuzreaktivität zwischen den Flaviviren reduziert werden (Rockstroh et al., 2015).

Zusätzlich muss beachtet werden, dass Malariaparasiten ebenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen in der serologischen Untersuchung von Dengue-Antikörpern führen können (Hunsperger et al., 2009). Die serologischen Testungen im Rahmen der Promotionsarbeit von T. Daniel bestätigen besagte Kreuzreaktivität zwischen einer akuten Malariainfektion und Dengue-Virus seropositiven Patienten (Daniel, 2019).

Folglich sollten alle serologischen Daten erst nach Abzug der MRDT-positiven Patienten in Bezug auf das Dengue-Virus beurteilt werden, wobei sie auch trotz dessen unter Vorbehalt zu betrachten sind.

Im Vergleich zu den genannten Problematiken bei der Auswertung der Daten der Anti-DENV-IgG/IgM erscheint die Beurteilung der Ergebnisse der IgG-Antikörper gegen das Chikungunya-Virus verlässlicher. Zum einen gehört das CHIKV nicht zur Gruppe der Flaviviren und ist demnach vermutlich von deren Kreuzreaktivität ausgeschlossen, zum anderen zeigen die Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen MRDT-positiven Patienten und positiven Anti-CHIKV-IgG.

Die Tatsache, dass 3,4 % der Kinder und 70 % der Erwachsenen einen Anti-CHIKV-IgG-Titer aufwiesen, lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Chikungunya-Virus in Sengerema prävalent ist. Interessant ist hierbei die Verteilung des Anti-CHIKV-IgG-Titers zwischen den Kindern und den Erwachsenen. So zeigt sich, dass die Seropositivität mit zunehmendem Alter der Probanden ansteigt. Gleiche Ergebnisse liefert eine Studie von Weller et al. aus dem Jahr 2014 (Weller et al., 2014).

Um die Vermutung zu stützen, dass das Chikungunya-Virus im Studienort Sengerema aktiv zirkuliert, sollten weitere Daten gesammelt und die Entwicklungen eines verlässlichen Chikungunya-Schnelltests gefördert werden.

Die Hypothese, dass arbovirale Infektionen im Umkreis von Sengerema auftreten, kann nur teilweise bestätigt werden.

In Bezug auf das Dengue-Virus liefern weder die Ergebnisse des NS1-Antigen-Schnelltests noch die Ergebnisse der RT-mPCR-ELISA-Methode oder die der serologischen Auswertung Anhaltspunkte dafür, dass das Dengue-Virus in Sengerema zur Zeit der Probengewinnung prävalent war. Die Ergebnisse einer Studie von Mweya et al. weisen jedoch darauf hin, dass neben den Küstenregionen auch Städte nahe des Viktoriasees zu den Dengue-Risikogebieten zählen. Es wird angenommen, dass dort auch schon während des letzten Dengue-Fieber-Ausbruchs 2014 vereinzelt Dengue-Virus-Infektionen vorkamen (Mweya, Kimera, Stanley, Misinzo, & Mboera, 2016).

Bezüglich des Chikungunya-Virus liefern die serologischen Daten Ergebnisse, die ein Auftreten des Virus und damit die postulierte These bestätigen. Es existieren mehrere Quellen, die eine aktive Zirkulation des CHIKV ebenfalls bekräftigen (Chipwaza et al., 2014; Kajeguka et al., 2016; Pialoux et al., 2007).

5.4 Auswertung der Daten der erwachsenen Probanden

Da arbovirale Infektionen als Ursache einer fieberhaften Erkrankung in Tansania häufig übersehen oder fälschlicherweise als Malaria diagnostiziert und therapiert werden, sind weitere Erkenntnisse über deren Vorkommen von großer Bedeutung für die zielgerichtete Behandlung der Patienten (Weller et al., 2014). In Hinblick darauf lieferten die anamnestischen Daten der Erwachsenen über ihre vergangenen Malariainfektionen neben der serologischen Auswertung deren Blutproben wichtige Informationen.

5.4.1 Allgemeine Daten der erwachsenen Probanden

Die anamnestischen Daten sind vor dem Hintergrund zu bewerten, dass sowohl die Sprachbarriere als auch die teilweise unvollständigen Erinnerungen der Patienten Fehlerquellen in Bezug auf die Richtigkeit der Daten darstellten. Zudem muss beachtet werden, dass besonders in ländlichen Regionen nur im Notfall ein Krankenhaus aufgesucht wird und somit fieberhafte Erkrankungen in den meisten Fällen ohne Diagnose bleiben und stattdessen mit freiverkäuflichen Medikamenten oder Naturheilmitteln behandelt werden (Amexo et al., 2004).

Während 4 Erwachsene einen milden Malaria-Krankheitsverlauf in der Vergangenheit schilderten, gaben 3 Probanden an, noch nie an einer Malariainfektion erkrankt gewesen zu sein. Diese Ergebnisse sind mit der Tatsache konkordant, dass eine Malariainfektion mit zunehmendem Alter häufig subklinischer verläuft und der Körper eine zunehmende Resistenz gegenüber den Parasiten entwickelt (Marsh, 1992; Murphy et al., 2013).

5.4.2 Testergebnisse

Die serologischen Daten der Erwachsenen können genau wie bei denen der Kinder durch Fehlerquellen wie Kreuzreaktivitäten verfälscht werden, was bei der Bewertung der Testergebnisse der serologischen Daten zu beachten ist (siehe Kp. 6.3.).

Die Tatsache, dass 87,5 % der Erwachsenen eine positive CHIKV-Serologie aufwiesen, während nur 3,4 % der Kinder Anti-CHIKV-IgG hatten, führt zu dem Schluss, dass das Chikungunya-Virus in der Region um den Viktoriasee endemisch zirkuliert und dadurch die Seroprävalenz mit steigendem Alter zunimmt.

5.5 Daten aus Burkina Faso

Das in dieser Promotionsarbeit angewendete Studiendesign wurde auf einen anderen Studienort, Burkina Faso, übertragen. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die Studienergebnisse aus Sengerema auf andere Gebiete übertragen lassen, in denen Malaria endemisch auftritt und das Vorkommen von Arboviren teilweise bestätigt wurde. Zusätzlich wurde dadurch getestet, inwieweit das Model durch studienunabhängige Personen durchgeführt werden kann.

Die anfänglich gestellte Hypothese, dass das Studiendesign aus Sengerema auch auf Burkina Faso anwendbar ist, kann durch die gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Grund hierfür ist zum einen, dass bei der anamnestischen Datenerhebung der gravierende Fehler gemacht wurde, Kinder ungeachtet der axillären Temperatur in die Studie einzuschließen. Durch jene Missachtung der Prüfung der Einschlusskriterien im Vorhinein war die Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie bei einigen Kindern nicht erfüllt, sodass deren Daten nachträglich aus der Auswertung herausgenommen werden mussten.

Fehlerhaft waren außerdem die Lagerung und der Transport der Filterpapierkarten ohne Trockenkügelchen. Wie die Ergebnisse einer Studie von Snijdewind et al. (2012) zeigen, wirkt sich eine falsche Lagerung der Karten nachteilig auf die Qualität der Proben aus (Snijdewind et al., 2012). Vor diesem Hintergrund kann davon ausgegangen werden, dass das Fehlen der Trockenkügelchen die Konservierungsfähigkeit der Filterpapierkarten beeinträchtigte und deshalb die Auswertung der DBS unverwertbare Ergebnisse lieferte. Es konnte keine plausible Kausalität zwischen einem positiven Malaria-Schnelltest und einem positiven RT-mPCR-Ergebnis gefunden werden. Zudem lässt sich festhalten, dass bei den Patienten mit positivem Dengue-Schnelltest eine Infektion mit dem Dengue-Virus nicht bestätigt werden konnte und die meisten auch keinen serologischen Nachweis lieferten.

Offen bleibt, ob alleine die Art der Lagerung für die fehlerhaften Ergebnisse verantwortlich ist oder ob zusätzliche Fehler bei der Durchführung und Dokumentation der Studie auftraten.

5.6 Ausblick

Die Ergebnisse der Studie dieser Promotionsarbeit liefern wichtige epidemiologische Daten über das Auftreten von Malaria und Arboviren in Sengerema. Um saisonale Unterschiede aufzudecken und um das Zirkulationsverhalten der Arboviren tiefergehend zu verstehen, ist es erforderlich, diese Studie anhaltend fortzuführen.

Während die diagnostischen Methoden zur Detektion von Malariaparasiten sehr verlässliche Ergebnisse liefern, sollte die Diagnostik von Dengue-Viren verbessert werden und alternative Methoden in Betracht gezogen werden. Anhand der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die verwendeten Filterpapierkarten keine optimale Konservierungsmethode von Dengue-Viren darstellen. Alternativ zu Filterpapierkarten könnten ViveST-Röhrchen (ViveBio, Alpharetta, GA) oder RNASTable-Röhrchen (Biomatrix, San Diego, CA) verwendet werden. Sie haben den Vorteil, dass sie ein größeres Probenvolumen fassen können und sich die Proben bei Raumtemperatur transportieren lassen (Biomatrix, 2020; ViveBio, 2020). Laut den Ergebnissen der Studie von Dauner et al. (2015) stabilisieren diese zwei Alternativmethoden die RNA von Dengue-Viren besser als Filterpapierkarten (Dauner et al., 2015). Zur Bestätigung dieser Erkenntnis sind dahingehende Untersuchungen durchzuführen.

Im Hinblick auf die serologischen Daten dieser Promotionsarbeit und die Ergebnisse anderer Studien (Kajeguka et al., 2016), die eine aktive Zirkulation von CHIKV nahelegen, würde der Einsatz eines CHIKV-Schnelltests eine hilfreiche POCT-Methode darstellen. Laut neustem Entwicklungsstand wurde kürzlich ein CHIKV-E1-Antigen-Schnelltest entwickelt, der eine höhere Sensitivität und eine geringere Kreuzreaktivität gegenüber anderen Alphaviren aufweist als vorherige Schnelltests. Weitere Validierungsprozesse stehen jedoch noch aus, bevor der Schnelltest flächendeckend als Routinediagnostik eingesetzt werden kann (Suzuki et al., 2020). Dennoch bleibt die Hoffnung, dass Chikungunya-Virus-Infektionen dadurch in Zukunft verlässlicher diagnostiziert werden können und die verbesserte epidemiologische Datensammlung einen Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Verteilung und Bedeutsamkeit von Arboviren bringt.

„Schnelltests zum Nachweis bakterieller Infektionen sind in SSA noch nicht leicht zugänglich, und fieberhafte Patienten bekommen fast zufällig Antibiotika verschrieben, aus Angst, eine möglicherweise lebensbedrohliche Infektion zu verpassen“ (Dit et al., 2019). Auch die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zeigen

das Problem der übermäßigen Antibiotikatherapien auf. Um den Gebrauch von Antibiotika zu reduzieren, ist es erstens notwendig, das Bewusstsein für virale Differentialdiagnosen zu fördern, und zweitens, eine einfache und kostengünstige Diagnostikmethode für bakterielle Infektionen zu etablieren. Die flächendeckende Einführung eines Procalcitonin-Schnelltests in den Krankenhäusern könnte ein möglicher Lösungsansatz sein.

6 Zusammenfassung

Malaria ist trotz sinkender Fallzahlen weltweit immer noch die bedeutendste parasitäre Erkrankung des Menschen. Besonders Kinder in SSA sind von der Morbidität und Mortalität Malarias betroffen.

Neben Malaria spielen arbovirale Infektionen als Ursache fieberhafter Erkrankungen eine bedeutende Rolle in SSA. Aktive Zirkulationen von CHIKV und regelmäßige Dengue-Fieber-Ausbrüche sind in weiten Teilen Tansanias bekannt. Jedoch ist die epidemiologische Datenlage diesbezüglich schwach und lückenhaft.

Im Rahmen früherer Promotionsarbeiten wurde eine RT-mPCR-ELISA-Methode entwickelt, die Malariaparasiten und Arboviren aus DBS detektieren kann. Durch die Anwendung der RT-mPCR-ELISA-Methode sowie Malaria- und Dengue-Schnelltests konnten im Zuge dieser Arbeit wichtige epidemiologische Daten gewonnen werden.

Im Studienort Sengerema wurden Malaria-Schnelltests als Routinediagnostik eingesetzt und dadurch die WHO-Leitlinie nach dem „Test and Treat“-Prinzip gewissenhaft eingehalten. Folglich wurde Malaria weder maßgeblich überdiagnostiziert noch übertherapiert. Nach laboratorischer Auswertung der DBS ergab sich zudem eine exzellente Übereinstimmung der RT-mPCR-Ergebnisse mit den Ergebnissen der MRDTs. Die verwendeten Malaria-Schnelltests fungieren demnach als geeignete POCT-Methode. Die Verwendung von DBS zur einfachen Lagerung und zum Transport von Proben stellte sich im Hinblick auf Malariaparasiten als qualifizierte Konservierungsmethode heraus.

Die Studien dieser Promotionsarbeit zeigten, dass neben dem Einsatz von Antibiotikum im Falle von Malariainfektionen auch bei dem Großteil der Kinder mit einer nicht auf Malaria zurückzuführenden fieberhaften Erkrankung Antibiotika verschrieben wurde. Vor dem Hintergrund, dass die meisten fieberhaften Infekte im Kindesalter viralen Ursprungs sind, wurden somit viele dieser Kinder einer unnötigen Antibiotikatherapie ausgesetzt. Das fehlende Bewusstsein für virale Alternativdiagnosen zu Malaria führte dazu, dass virale Infektionen drastisch unterdiagnostiziert wurden und dass durch den unnötig hohen Einsatz von Antibiotika die Gefahr der Resistenzbildung eingegangen wurde.

Die Aufklärung über (arbo-)virale Infektionen im Kindesalter und die Einführung eines Procalcitonin-Schnelltests zur Diagnostik von schweren bakteriellen Infektionen könnte eine Senkung der Antibiotikaeinsätze bewirken.

Die Verbreitung von Dengue-Viren nimmt weltweit rasant zu, sodass die damit einhergehende arbovirale Infektion immer mehr an Bedeutung gewinnt. Um die Ausbreitung von Dengue-Viren im Studienort zu untersuchen, wurden Dengue-Schnelltests angewendet. Keiner der 91 durchgeführten Schnelltests lieferte ein positives Ergebnis. Dengue-Viren waren demnach zum Zeitpunkt der Probengewinnung in Sengerema nicht oder nur in sehr geringem Maße prävalent. Um ein mögliches Ausbruchsgeschehen zu registrieren, bedarf es einer kontinuierlichen Fortführung dieser Studie.

Die Auswertung der DBS bezüglich der Dengue-Viren ergab bei allen Probanden negative RT-mPCR-ELISA-Ergebnisse. Die Tatsache jedoch, dass 10 Proben aus Dar es Salaam, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung nachweislich Dengue positiv waren, ebenfalls negative Ergebnisse lieferten, stellt die Konservierungsfähigkeit der Filterpapierkarten für Dengue-Viren in Frage. Lange Lagerungszeiten sowie Umwelteinflüsse wie Temperatur und Feuchtigkeit beeinflussen die Qualität der Filterpapierkarten und damit die Konservierungsfähigkeit von Virus-RNA. Alternative Transport- und Lagerungsmöglichkeiten wie „ViveST“- oder „RNAstable“-Röhrchen sollten demnach in Erwägung gezogen und getestet werden.

Die angewendete RT-mPCR-ELISA-Methode konnte im gesamten Patientenkollektiv keine Arboviren detektieren.

Die serologischen Untersuchungen lieferten in Bezug auf das Dengue-Virus, aufgrund von Kreuzreaktivitäten unter Flaviviren und zwischen Dengue-Viren und Malariaparasiten, nicht verwertbare Daten. Die Bestimmung von Anti-CHIKV-IgG brachte verlässlichere Ergebnisse hervor, die auf ein aktives Vorkommen von CHIKV in Sengerema hindeuten.

Malaria und arbovirale Infektionen spielen auch in anderen Ländern in SSA eine bedeutende Rolle, so auch in Burkina Faso. Um auch dort wichtige epidemiologische Daten sammeln zu können, wurde das Studienmodell in einem Krankenhaus in der Hauptstadt Burkina Fasos angewendet. Die Übertragung des Studiendesigns auf den neuen Studienort ließ sich jedoch nur unter gravierenden Einschränkungen wie beispielsweise die fehlerhafte Lagerung und Transport der Filterpapierkarten

durchführen, sodass die generierten Daten keine verlässlichen Schlussfolgerungen zulassen.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott GmbH & Co. KG. (n.d.). Panbio Dengue early rapid. Retrieved from <https://www.alere.com/en/home/product-details/panbio-dengue-early-rapid.html>
- Ahmed, N. H., & Broor, S. (2014). *Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase*. Retrieved from <http://www.mrcindia.org/journal/issues/513194.pdf>
- Ahmed, Q. A., & Memish, Z. A. (2017). Yellow fever from Angola and Congo: a storm gathers. *Tropical Doctor*, 47(2), 92–96. <https://doi.org/10.1177/0049475517699726>
- Amarasinghe, A., Kuritsky, J. N., Letson, G. W., & Margolis, H. S. (2011). Dengue Virus Infection in Africa. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101515>
- Amexo, M., Tolhurst, R., Barnish, G., & Bates, I. (2004). Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet (London, England)*, 364(9448), 1896–1898. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17446-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17446-1)
- Anders, K. L., Indriani, C., Ahmad, R. A., Tantowijoyo, W., Arguni, E., Andari, B., ... Utarini, A. (2020). Update to the AWED (Applying Wolbachia to Eliminate Dengue) trial study protocol: a cluster randomised controlled trial in Yogyakarta, Indonesia. *Trials*, 21(1), 429. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04367-2>
- Anders, K. L., Minh Nguyet, N., Than Ha Quyen, N., Van Ngoc, T., Van Tram, T., Thi Gan, T., ... Giang, T. (2012). An Evaluation of Dried Blood Spots and Oral Swabs as Alternative Specimens for the Diagnosis of Dengue and Screening for Past Dengue Virus Exposure. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 87(1), 165–170. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0713>
- Ashraf, S., Kao, A., Hugo, C., Christophel, E. M., Fatunmbi, B., Luchavez, J., ... Bell, D. (2012). *Developing standards for malaria microscopy: external competency assessment for malaria microscopists in the Asia-Pacific*. *Malaria Journal* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-352>
- AWMF. (2016). *Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria*. Retrieved from www.dtg.org/institut.html
- Barnes, K. I., Watkins, W. M., & White, N. J. (2008). Antimalarial dosing regimens and drug resistance. *Trends in Parasitology*, 24(3), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.11.008>
- Basarab, M., Bowman, C., Aarons, E. J., & Cropley, I. (2016). Zika virus. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 352, i1049. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1049>

- Beckham, J. D., & Tyler, K. L. (2015, December). Arbovirus Infections. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000240>
- Berner, R., Bialek, R., Borte, M., Forster, J., Heininger, U., Liese, J., ... Scholz, H. (2013). *DGPI Handbuch*.
- Bharti, A. R., Patra, K. P., Chuquiyauri, R., Kosek, M., Gilman, R. H., Llanos-Cuentas, A., & Vinetz, J. M. (2007). *Short Report: Polymerase Chain Reaction Detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA from Stored Serum Samples: Implications for Retrospective Diagnosis of Malaria*. *Am. J. Trop. Med. Hyg* (Vol. 77). Retrieved from <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/77/3/0770444.pdf?expires=1601886035&id=id&accname=guest&checksum=484EC2353AD89DB96CF38C2A9A15EF9D>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Biomatrica. (2020). RNA stable® / LD - Biomatrica. Retrieved November 10, 2020, from <https://www.biomatrica.com/product/rnastable-ld/>
- Boland, P., Mohamed, M., Paweska, J., Omulo, S., Zeidner, N., Njenga, M. K., ... Gikundi, S. (2010). Epidemiologic and Clinical Aspects of a Rift Valley Fever Outbreak in Humans in Tanzania, 2007. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2_Suppl), 22–27. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0318>
- Boillat-Blanco, N. et al. (2018). Dengue Fever in Dar es Salaam, Tanzania: clinical features and outcome in populations of black and non-black racial category.
- Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., & Failloux, A.-B. (2018). An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*, 20(11–12), 646–660. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2018.01.006>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., ... Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Bronzan, R. N., Taylor, T. E., Mwenechanya, J., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., ... Graham, S. M. (2007). Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *The Journal of Infectious*

- Diseases*, 195(6), 895–904. <https://doi.org/10.1086/511437>
- Budodo, R. M., Horumpende, P. G., Mkumbaye, S. I., Mmbaga, B. T., Mwakapuja, R. S., & Chilongola ID, J. O. (2020). Serological evidence of exposure to Rift Valley, Dengue and Chikungunya Viruses among agropastoral communities in Manyara and Morogoro regions in Tanzania: A community survey. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008061>
- Buffet, P. A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., ... Mercereau-Puijalon, O. (2011). The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, 117(2), 381–392. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-202911>
- Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M. R., & Bordi, L. (2013). Chikungunya virus infection: An overview. *New Microbiologica*. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912863>
- Canier, L., Khim, N., Kim, S., Eam, R., Khean, C., Loch, K., ... Mé, D. (2015). Malaria PCR Detection in Cambodian Low-Transmission Settings: Dried Blood Spots versus Venous Blood Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 92(3), 573–577. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0614>
- CDC. (2018). Chikungunya virus.
- CDC. (2019a). Dengue.
- CDC. (2019b). Symptoms, Diagnosis, & Treatment. Retrieved October 3, 2020, from <https://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html>
- CDC. (2020a). CDC - Malaria - About Malaria. Retrieved from <https://www.cdc.gov/malaria/about/>
- CDC. (2020b). Signs and Symptoms | Rift Valley Fever | CDC. Retrieved October 5, 2020, from <https://www.cdc.gov/vhf/rvf/symptoms/index.html>
- Central Intelligence Agency. (2020a). Africa :: Burkina Faso — The World Factbook -. Retrieved October 9, 2020, from <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/uv.html>
- Central Intelligence Agency. (2020b). Africa :: Tanzania — The World Factbook -. Retrieved October 7, 2020, from <https://www.cia.gov/librarY/publications/the-world-factbook/geos/tz.html>
- Chen, L. H., & Wilson, M. E. (2010). Dengue and chikungunya infections in travelers. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(5), 438–444. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833c1d16>
- Chien, L. J., Liao, T. L., Shu, P. Y., Huang, J. H., Gubler, D. J., & Chang, G. J. J.

- (2006). Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1295–1304. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>
- Chipwaza, B., Mugasa, J. P., Selemani, M., Amuri, M., Mosha, F., Ngatunga, S. D., & Gwakisa, P. S. (2014). Dengue and Chikungunya Fever among Viral Diseases in Outpatient Febrile Children in Kilosa District Hospital, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3335. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003335>
- Corran, P. H., Cook, J., Lynch, C., Leendertse, H., Manjurano, A., Griffin, J., ... Riley, E. (2008). Malaria Journal Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-195>
- D'Acremont, V., Kahama-Maró, J., Swai, N., Mtasiwa, D., Genton, B., & Lengeler, C. (2011). *Reduction of anti-malarial consumption after rapid diagnostic tests implementation in Dar es Salaam: a before-after and cluster randomized controlled study. Malaria Journal* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-107>
- D'Acremont, V., Kilowoko, M., Kyungu, E., Philipina, S., Sangu, W., Kahama-Maró, J., ... Genton, B. (2014). Beyond Malaria — Causes of Fever in Outpatient Tanzanian Children. *New England Journal of Medicine*, 370(9), 809–817. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214482>
- D'Acremont, V., Lengeler, C., & Genton, B. (2010). Reduction in the proportion of fevers associated with *Plasmodium falciparum* parasitaemia in Africa: a systematic review. *Malaria Journal*, 9, 240. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-240>
- Dalrymple, U., Arambepola, R., Gething, P. W., & Cameron, E. (2018). How long do rapid diagnostic tests remain positive after anti-malarial treatment? *Malaria Journal*, 17(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2371-9>
- Dambach, P., Schleicher, M., Korir, P., Ouedraogo, S., Dambach, J., Sié, A., ... Becker, N. (2018). Nightly Biting Cycles of *Anopheles* Species in Rural Northwestern Burkina Faso. *Journal of Medical Entomology*, 55(4), 1027–1034. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy043>
- Daniel, T. (2019). *Etablierung einer Multiplex-PCR zur Diagnostik von arboviralen Infektionen und Malaria*. Promotionsarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Dauner, A. L., Gilliland, T. C., Mitra, I., Pal, S., Morrison, A. C., Hontz, R. D., ... Wu, S.-J. L. (2015). Evaluation of nucleic acid stabilization products for ambient

- temperature shipping and storage of viral RNA and antibody in a dried whole blood format. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 46–53. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0110>
- Dit, M., Bonko, A., Kiemde, F., Christian Tahita, M., Lompo, P., Some, A. M., ... Schallig, H. D. F. H. (2019). The effect of malaria rapid diagnostic tests results on antimicrobial prescription practices of health care workers in Burkina Faso. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 18, 5. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0304-2>
- Domingo, C., Alves, M. J., de Ory, F., Teichmann, A., Schmitz, H., Müller, R., & Niedrig, M. (2015). International external quality control assessment for the serological diagnosis of dengue infections. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0877-0>
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Duyen, H. T. L., Ngoc, T. V., Ha, D. T., Hang, V. T. T., Kieu, N. T. T., Young, P. R., ... Wills, B. A. (2011). Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(9), 1292–1300. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir014>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). *Aedes albopictus* - current known distribution: June 2018. Retrieved October 28, 2020, from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-june-2018>
- Fançony, C., Sebastião, Y. V., Pires, J. E., Gamboa, D., & Nery, S. V. (2013). Performance of microscopy and RDTs in the context of a malaria prevalence survey in Angola: a comparison using PCR as the gold standard. *Malaria Journal*, 12, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-284>
- Farzadegan, H., Quinn, T., & Polk, B. F. (1987). *CORRESPONDENCE Detecting Antibodies to Human Immunodeficiency Virus in Dried Blood on Filter Papers*. Retrieved from <https://academic.oup.com/jid/article/155/5/1073/794515>
- Faustine, N., Sabuni, E., Ndaro, A., Paul, E., & Chilongola, J. (2017). Chikungunya, Dengue and West Nile Virus Infections in Northern Tanzania. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 24(4), 1–7.

<https://doi.org/10.9734/JAMMR/2017/37234>

- Fernandes-Monteiro, A. G., Trindade, G. F., Yamamura, A. M. Y., Moreira, O. C., de Paula, V. S., Duarte, A. C. M., ... Lima, S. M. B. (2015). New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(7), 1865–1871. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.990854>
- Forrest, M. L., & Kwon, G. S. (2008). Clinical developments in drug delivery nanotechnology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(8), 861–862. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2008.02.013>
- Garcia, L. S. (2010). Malaria. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20513543/>
- Girard, M., Nelson, C. B., Picot, V., & Gubler, D. J. (2020). Arboviruses: A global public health threat. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.011>
- Graz, B., Willcox, M., Szeless, T., & Rougemont, A. (2011). “Test and treat” or presumptive treatment for malaria in high transmission situations? A reflection on the latest WHO guidelines. *Malaria Journal*, 10, 136. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-136>
- Gröndahl, B., Puppe, W., Hoppe, A., Kühne, I., Weigl, J. A. I., & Schmitt, H. J. (1999). Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: Feasibility study. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00485.x>
- Gubler, D. J., Sather, G. E., Kuno, G., & Cabral, J. R. (1986). Dengue 3 virus transmission in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(6), 1280–1284. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.1280>
- Guthrie, R., & Susi, A. (1963). A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics*, 32(3). Retrieved from <https://pediatrics.aappublications.org/content/32/3/338.long>
- Guy, B., & Jackson, N. (2016). Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.2>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews*.

- Microbiology*, 8(12 Suppl), S7-16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- Guzman, M. G., Kouri, G., Bravo, J., Valdes, L., Susanavazquez, (', & Halsteadt3, S. B. (2002). *Original Report Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections*. Retrieved from [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(02\)90072-X/pdf](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(02)90072-X/pdf)
- Hazir, T., Nisar, Y. Bin, Abbasi, S., Ashraf, Y. P., Khurshid, J., Tariq, P., ... Maqbool, S. (2011). Comparison of oral amoxicillin with placebo for the treatment of world health organization-defined nonsevere pneumonia in children aged 2-59 months: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial in pakistan. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(3), 293–300. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq142>
- Heilman, J. M., De Wolff, J., Beards, G. M., & Basden, B. J. (2014). Dengue fever: a Wikipedia clinical review. *Open Medicine: A Peer-Reviewed, Independent, Open-Access Journal*, 8(4), e105-15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25426178>
- Heintze, C., Velasco Garrido, M., & Kroeger, A. (2007). What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.08.007>
- Heitmann, A., Jansen, S., Lühken, R., Leggewie, M., Badusche, M., Pluskota, B., ... Tannich, E. (2017). Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. *Eurosurveillance*, 22(2), 30437. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.2.30437>
- Hercik, C., Cosmas, L., Mogeni, O. D., Wamola, N., Kohi, W., Omballa, V., ... Montgomery, J. M. (2017). A diagnostic and epidemiologic investigation of acute febrile illness (AFI) in Kilombero, Tanzania. *PLOS ONE*, 12(12), e0189712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189712>
- Hermesen, C. C., Telgt, D. S., Linders, E. H., van de Locht, L. A., Eling, W. M., Mensink, E. J., & Sauerwein, R. W. (2001). Detection of Plasmodium falciparum malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 118(2), 247–251. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00379-6](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00379-6)
- Herrera, R. de la C., Cabrera, M. V., García, S., & Gilart, M. (2006). IgM antibodies to dengue virus in dried blood on filter paper. *Clinica Chimica Acta*, 367(1–2), 204–206. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2005.12.042>

- Hertz, J. T., Munishi, O. M., Ooi, E. E., Howe, S., Lim, W. Y., Chow, A., ... Crump, J. A. (2012). Chikungunya and dengue fever among hospitalized febrile patients in Northern Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(1), 171–177. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0393>
- Hombach, J. (2007). *Temas de actualidad / Current topics Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages*. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* (Vol. 21). Retrieved from https://scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpsp/v21n4/11.pdf
- Hume, J. C., Barnish, G., Mangal, T., Armázio, L., Streat, E., & Bates, I. (2008). Malaria Journal Household cost of malaria overdiagnosis in rural Mozambique. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-33>
- Hunsperger, E. A., Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V. C., Sekaran, S. D., Enria, D. A., ... Peeling, R. W. (2009). Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3), 436–440. <https://doi.org/10.3201/eid1503.080923>
- Huth, P. F. B., Addo, M., Daniel, T., Groendahl, B., Hokororo, A., Koliopoulos, P., ... Kayange, N. (2021). Extensive Antibiotic and Antimalarial Prescription Rate among Children with Acute Febrile Diseases in the Lake Victoria Region, Tanzania. *Journal of Tropical Pediatrics*, 67(1). <https://doi.org/10.1093/tropej/fmaa135>
- Idiostatics. (2020). cohen-kappa-free-calculator. Retrieved from <https://idostatistics.com/cohen-kappa-free-calculator/>
- IHME, & GDB. (2017). Malaria.
- Institute for Health Metrics and Evaluation. (2017). Burkina Faso |. Retrieved October 9, 2020, from <http://www.healthdata.org/burkina-faso>
- Institute for Health Metrics and Evaluation. (2020). Tanzania. Retrieved October 7, 2020, from <http://www.healthdata.org/tanzania>
- Kahama-Maró, J., D'Acremont, V., Mtasiwa, D., Genton, B., & Lengeler, C. (2011). Low quality of routine microscopy for malaria at different levels of the health system in Dar es Salaam. *Malaria Journal*, 10(1), 332. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-332>
- Kajeguka, D. C., Kaaya, R. D., Mwakalinga, S., Ndossi, R., Ndaro, A., Chilongola, J. O., ... Alifrangis, M. (2016). Prevalence of dengue and chikungunya virus infections in north-eastern Tanzania: a cross sectional study among participants

- presenting with malaria-like symptoms. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1511-5>
- Kamau, E., Alemayehu, S., Feghali, K. C., Saunders, D., & Ockenhouse, C. F. (2013). Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. *PLoS ONE*, 8(8), e71539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071539>
- Kambris, Z., Blagborough, A. M., Pinto, S. B., Blagrove, M. S. C., Godfray, H. C. J., Sinden, R. E., & Sinkins, S. P. (2010). Wolbachia stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001143. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001143>
- Karunamoorthi, K. (2014). Malaria vaccine: a future hope to curtail the global malaria burden. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(5), 529–538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932383>
- Kauffman, E. B., Jones, S. A., Dupuis, A. P., Ngo, K. A., Bernard, K. A., & Kramer, L. D. (2003). Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3661–3667. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3661-3667.2003>
- Kiemde, F., Dit, M., Bonko, A., Christian Tahita, M., Lompo, P., Rouamba, T., ... Schallig, H. D. F. H. (2017). Accuracy of a Plasmodium falciparum specific histidine-rich protein 2 rapid diagnostic test in the context of the presence of non-malaria fevers, prior anti-malarial use and seasonal malaria transmission. *Malar J*, 16, 294. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1941-6>
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S. E., & Sachs, J. (2004). A GLOBAL INDEX REPRESENTING THE STABILITY OF MALARIA TRANSMISSION. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/70/5/0700486.pdf?expires=1599212414&id=id&accname=guest&checksum=BD7C22E9F43DB3641729AA355C7DDA00>
- Klüber, J. K. (2016). *Etablierung einer Multiplex-PCR zur Detektierung von Chikungunya, West Nil und Dengue*. Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Kobayashi, T., Chishimba, S., Shields, T., Hamapumbu, H., Mharakurwa, S., Thuma, P. E., ... Moss, W. J. (2012). Temporal and spatial patterns of serologic responses to Plasmodium falciparum antigens in a region of declining malaria transmission in southern Zambia. *Malaria Journal* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-438>
- Koliopoulos, P., Kayange, N. M., Daniel, T., Huth, F., Gröndahl, B., Medina-Montaña,

- G. C., ... Gehring, S. (2021). Multiplex-RT-PCR-ELISA panel for detecting mosquito-borne pathogens: Plasmodium sp. preserved and eluted from dried blood spots on sample cards. *Malaria Journal*, 20(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03595-4>
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *ELife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Lanciotti, R. S., Ludwig, M. L., Rwaguma, E. B., Lutwama, J. J., Kram, T. M., Karabatsos, N., ... Miller, B. R. (1998). Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology*, 252(1), 258–268. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9437>
- Leon, F., Meyer, A., Reynier, R., Blanc, E., Bruyère-Ostells, L., Brès, J.-C., ... Fournier-Wirth, C. (2018). An Innovative Multiplexed And Flexible Molecular Approach For The Differential Detection Of Arboviruses. *The Journal of Molecular Diagnostics*. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2018.08.005>
- Lim ID, J. K., Seydou, Y., Carabali, M., Barro, A., Lucien Dahourou, D., Sung Lee, K., ... ry Ridde, V. (2019). Clinical and epidemiologic characteristics associated with dengue during and outside the 2016 outbreak identified in health facility-based surveillance in Ouagadougou, Burkina Faso. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007882>
- Liu, J., Ochieng, C., Wiersma, S., Ströher, U., Towner, J. S., Whitmer, S., ... Fields, B. (2016). Development of a TaqMan array card for acute-febrile-illness outbreak investigation and surveillance of emerging pathogens, including ebola virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 49–58. <https://doi.org/10.1128/JCM.02257-15>
- Lwande, O. W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., & Bucht, G. (2020). Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 20(2), 71–81. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2486>
- Lyimo, D., Kamugisha, C., Yohana, E., Eshetu, M., Wallace, A., Ward, K., ... Hennessey, K. (2017). Improving the efficiency and standards of a National Immunization Program Review: lessons learnt from United Republic of Tanzania. *The Pan African Medical Journal*, 28, 209. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.209.10466>

- Marsh, K. (1992). Malaria-a neglected disease? *Parasitology*, 104 Suppl. <https://doi.org/10.1017/S0031182000075247>
- Martinet, J.-P., Ferté, H., Failloux, A.-B., Schaffner, F., & Depaquit, J. (2019). Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. <https://doi.org/10.3390/v11111059>
- Martins, M. M., Prata-Barbosa, A., & Cunha, A. J. L. A. da. (2020). Arboviral diseases in pediatrics. *Jornal de Pediatria*, 96, 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.JPED.2019.08.005>
- Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Looareesuwan, S., & White, N. J. (2001). Persistence of Plasmodium falciparum HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 179–182. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(01\)90156-7](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(01)90156-7)
- Mboera, L. E. G., Makundi, E. A., & Kitua, A. Y. (2007). Uncertainty in malaria control in Tanzania: Crossroads and challenges for future interventions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(SUPPL. 6), 112–118. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.112>
- Medina Montano, G. C. (2017). *Etablierung einer Multiplex-PCR zur Detektierung von Chikungunya , West Nil und Dengue*. Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Mei, J. V., Alexander, J. R., Adam, B. W., & Hannon, W. H. (2001). Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1631S-1636S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1631S>
- Minakawa, N., Dida, G. O., Sonye, G. O., Futami, K., & Njenga, S. M. (2012). Malaria Vectors in Lake Victoria and Adjacent Habitats in Western Kenya. *PLoS ONE*, 7(3), e32725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032725>
- Moody, A. (2002). Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(1), 66–78. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.1.66-78.2002>
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... O'Neill, S. L. (2009). A Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.11.042>
- Mtove, G., Amos, B., Nadjm, B., Hendriksen, I. C., Dondorp, A. M., Mwambuli, A., ... Deen, J. (2011). Decreasing incidence of severe malaria and community-acquired bacteraemia among hospitalized children in Muheza, north-eastern

- Tanzania, 2006-2010. *Malaria Journal*, 10(1), 320. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-320>
- Muller, D. A., Depelsenaire, A. C. I., & Young, P. R. (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl_2), S89–S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>
- Müller, O., Becher, H., van Zweeden, A. B., Ye, Y., Diallo, D. A., Konate, A. T., ... Garenne, M. (2001). Effect of zinc supplementation on malaria and other causes of morbidity in west African children: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 322(7302), 1567. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7302.1567>
- Muro, F., Reyburn, R., & Reyburn, H. (2015). Acute respiratory infection and bacteraemia as causes of non-malarial febrile illness in African children: a narrative review. *Pneumonia (Nathan Qld.)*, 6, 6–17. <https://doi.org/10.15172/pneu.2015.6/488>
- Murphy, S. C., Shott, J. P., Parikh, S., Etter, P., Prescott, W. R., & Stewart, V. A. (2013). Review Article: Malaria diagnostics in clinical trials. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 824–839. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0675>
- Mwangi, T. W., Mohammed, M., Dayo, H., Snow, R. W., & Marsh, K. (2005). Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 10(6), 530–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01439.x>
- Mweya, C. N., Kimera, S. I., Stanley, G., Misinzo, G., & Mboera, L. E. G. (2016). Climate Change Influences Potential Distribution of Infected *Aedes aegypti* Co-Occurrence with Dengue Epidemics Risk Areas in Tanzania. *PLOS ONE*, 11(9), e0162649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162649>
- nal von minden GmbH. (2016). *NADAL® Malaria 4 Species Test (test cassette) Gebrauchsanweisung* (Version 2.). nal von minden GmbH.
- National Bureau of Statistics. (2008). Tanzania HIV/AIDS and Malaria Indicator Survey (THMIS) report. Retrieved October 8, 2020, from <https://www.nbs.go.tz/index.php/en/census-surveys/health-statistics/hiv-and-malaria-survey/85-2007-08-tanzania-hiv-aids-and-malaria-indicator-survey-thmis-report>
- National Bureau of Statistics. (2012). Mwanza Region Basic Demographic and Socio-Economic Profile. Retrieved from <https://www.nbs.go.tz/index.php/en/regional->

profiles

- Nkonya, D. N., Tarimo, D. S., & Kishimba, R. S. (2016). Accuracy of clinical diagnosis and malaria rapid diagnostic test and its influence on the management of children with fever under reduced malaria burden in Misungwi district, Mwanza Tanzania. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.25.48.9401>
- Normile, D. (2013). Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science*, 342(6157), 415–415. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.342.6157.415>
- Ott, K. J. (1967). Malaria Parasites and Other Haemosporidia. P. C. C. Garnham. Blackwell, Oxford, England; Davis, Philadelphia, 1966. 1132 pp., illus. \$35. *Science*, 157(3792), 1029–1029. <https://doi.org/10.1126/science.157.3792.1029-a>
- Ouattara, L. P. E., Sangaré, I., Namountougou, M., Hien, A., Ouari, A., Soma, D. D., ... Dabiré, K. R. (2019). Surveys of Arboviruses Vectors in Four Cities Stretching Along a Railway Transect of Burkina Faso: Risk Transmission and Insecticide Susceptibility Status of Potential Vectors. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 140. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00140>
- Pal, S., Dauner, A. L., Mitra, I., Forshey, B. M., Garcia, P., Morrison, A. C., ... Wu, S. J. L. (2014). Evaluation of dengue ns1 antigen rapid tests and elisa kits using clinical samples. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113411>
- Palacpac, N. M. Q., Horii, T., & Duffy, P. E. (2020). Malaria vaccines: facing unknowns. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22143.1>
- Panning, M., Grywna, K., Van Esbroeck, M., Emmerich, P., & Drosten, C. (2008). Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 416–422. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>
- Papa, A., Karabaxoglou, D., & Kansouzidou, A. (2011). Acute West Nile virus neuroinvasive infections: cross-reactivity with dengue virus and tick-borne encephalitis virus. *Journal of Medical Virology*, 83(10), 1861–1865. <https://doi.org/10.1002/jmv.22180>
- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegriño, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., ... Yoksan, S. (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8(S12), S30–S37. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- Perandin, F., Manca, N., Calderaro, A., Piccolo, G., Galati, L., Ricci, L., ... Chezzi, C. (2004). Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of Plasmodium

- falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for Routine Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1214–1219. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1214-1219.2004>
- Pialoux, G., Gaüzère, B.-A., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(5), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
- Prado, I., Rosario, D., Bernardo, L., Álvarez, M., Rodríguez, R., Vázquez, S., & Guzmán, M. G. (2005). PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *Journal of Virological Methods*, 125(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2005.01.001>
- Public Library of Science. (2016). Outbreak of Dengue may be expected to increase in Tanzania. Retrieved from <https://medicalxpress.com/news/2016-09-outbreaks-dengue-tanzania.html>
- Puglia, A. L. P., Rezende, A. G., Jorge, S. A. C., Wagner, R., Pereira, C. A., & Astray, R. M. (2013). Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.058>
- Ranjit, S., & Kisson, N. (2011). Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatric Critical Care Medicine: A Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 12(1), 90–100. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181e911a7>
- Ratcliff, R. M., Chang, G., Kok, T., & Sloots, T. P. (2007). *Molecular Diagnosis of Medical Viruses. Curr. Issues Mol. Biol* (Vol. 9). Retrieved from www.cimb.org
- Reyburn, H., Mbatia, R., Drakeley, C., Carneiro, I., Mwakasungula, E., Mwerinde, O., ... Whitty, C. J. M. (2004). Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 329(7476), 1212. <https://doi.org/10.1136/bmj.38251.658229.55>
- Rezza, G., Chen, R., & Weaver, S. C. (2017). O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. *Pathogens and Global Health*, 111(6), 271–275. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1355431>
- RKI. (2015). RKI-Ratgeber Malaria.
- Robert, V., Lhuillier, M., Meunier, D., Sarthou, J. L., Monteny, N., Digoutte, J. P., ... Cordellier, R. (1993). [Yellow fever virus, dengue 2 and other arboviruses isolated from mosquitos, in Burkina Faso, from 1983 to 1986. Entomological and epidemiological considerations]. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*

- (1990), 86(2), 90–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102567>
- Rockstroh, A., Barzon, L., Pacenti, M., Palù, G., Niedrig, M., & Ulbert, S. (2015). Recombinant Envelope-Proteins with Mutations in the Conserved Fusion Loop Allow Specific Serological Diagnosis of Dengue-Infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004218. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004218>
- Ruche, G. La, Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., ... Gastellu-Etchegorry, M. (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance*, 15(39), 19676. <https://doi.org/10.2807/ese.15.39.19676-en>
- Sampath, A., & Padmanabhan, R. (2009). Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Research*, 81(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.08.004>
- Sardá, V., Kaslow, D. C., & Williamson, K. C. (2009). Approaches to malaria vaccine development using the retrospectroscope. *Infection and Immunity*, 77(8), 3130–3140. <https://doi.org/10.1128/IAI.00122-09>
- Schwartz, A., Baidjoe, A., Rosenthal, P. J., Dorsey, G., Bousema, T., & Greenhouse, B. (2015). The Effect of Storage and Extraction Methods on Amplification of Plasmodium falciparum DNA from Dried Blood Spots. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 92(5), 922–925. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0602>
- Scott, J. A. G., Berkley, J. A., Mwangi, I., Ochola, L., Uyoga, S., Macharia, A., ... Williams, T. N. (2011). Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet (London, England)*, 378(9799), 1316–1323. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60888-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60888-X)
- SDDH. (2017). *General Report*.
- Shaw, W. R., Marcenac, P., Childs, L. M., Buckee, C. O., Baldini, F., Sawadogo, S. P., ... Catteruccia, F. (2016). Wolbachia infections in natural Anopheles populations affect egg laying and negatively correlate with Plasmodium development. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11772>
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N., & Wills, B. (2012). Dengue. *New England Journal of Medicine*, 366(15), 1423–1432. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110265>
- Singh, B., & Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of Plasmodium

- knowlesi. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 165–184.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00079-12>
- Singh, N., & Shukla, M. M. (2002). *FIELD EVALUATION OF POSTTREATMENT SENSITIVITY FOR MONITORING PARASITE CLEARANCE OF PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA BY USE OF THE DETERMINE MALARIA PF TEST IN CENTRAL INDIA*. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/66/3/12139227.pdf?expires=1600720807&id=id&accname=guest&checksum=5EAA73EF2FD24D3D99492785469F4EDA>
- Singh, B., Cox-Singh, J., Miller, A. O., Abdullahl, M. S., Snounou, G., & Rahman, H. A. (1996). *Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers* (Vol. 90). Retrieved from <https://academic.oup.com/trstmh/article/90/5/519/1918691>
- Sinha, S., Medhi, B., & Sehgal, R. (2014). Challenges of drug-resistant malaria. *Parasite (Paris, France)*, 21, 61. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014059>
- Smit, P. W., Elliott, I., Peeling, R. W., Mabey, D., & Newton, P. N. (2014). Review Article: An Overview of the Clinical Use of Filter Paper in the Diagnosis of Tropical Diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 90(2), 195–210. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0463>
- Snijdewind, I. J. M., van Kampen, J. J. A., Fraaij, P. L. A., van der Ende, M. E., Osterhaus, A. D. M. E., & Gruters, R. A. (2012). Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Research*, 93(3), 309–321. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.12.011>
- Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., ... DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *The New England Journal of Medicine*, 379(4), 327–340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>
- Strøm, G. E. A., Haanshuus, C. G., Fataki, M., Langeland, N., & Blomberg, B. (2013). Challenges in diagnosing paediatric malaria in Dar es Salaam, Tanzania. *Malaria Journal*, 12(1), 228. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-228>
- Strøm, G. E., Haanshuus, C. G., Fataki, M., Langeland, N., & Blomberg, B. (2013). Challenges in diagnosing paediatric malaria in Dar es Salaam, Tanzania. *Malaria Journal*, 12, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-228>
- Sue, M. J., Yeap, S. K., Omar, A. R., & Tan, S. W. (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed Research International*, 2014, 653014.

<https://doi.org/10.1155/2014/653014>

- Suzuki, K., Huits, R., Phadungsombat, J., Tuekprakhon, A., Nakayama, E. E., van den Berg, R., ... Shioda, T. (2020). Promising application of monoclonal antibody against chikungunya virus E1-antigen across genotypes in immunochromatographic rapid diagnostic tests. *Virology Journal*, 17(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01364-4>
- Swarthout, T. D., Counihan, H., Kabangwa, R., Senga, K., & Van Den Broek, I. (2007). Malaria Journal Paracheck-Pf ® accuracy and recently treated Plasmodium falciparum infections: is there a risk of over-diagnosis? <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-58>
- The Lancet Infectious Diseases. (2019, June). Malaria vaccination: a major milestone. *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30222-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30222-1)
- Therrell, B. L., Hannon, W. H., Pass, K. A., Lorey, F., Brokopp, C., Eckman, J., ... Shapira, E. (1996). Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochemical and Molecular Medicine*, 57(2), 116–124. <https://doi.org/10.1006/bmme.1996.0017>
- Thompson, M., Coad, N., Harnden, A., Mayon-White, R., Perera, R., & Mant, D. (2009). How well do vital signs identify children with serious infections in paediatric emergency care? *Archives of Disease in Childhood*, 94(11), 888–893. <https://doi.org/10.1136/adc.2009.159095>
- Tomasello, D., & Schlagenhauf, P. (2013). Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 11(5), 274–284. <https://doi.org/10.1016/J.TMAID.2013.07.006>
- Traoré, C. (2013). *Epidemiology of malaria in a holoendemic area of rural Burkina Faso*. Retrieved from http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/4691/1/Corneille_Traor.pdf
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., Mcgee, C. E., & Higgs, S. (2007). A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
- Uwimana, A., Legrand, E., Stokes, B. H., Ndikumana, J.-L. M., Warsame, M., Umulisa, N., ... Menard, D. (2020). Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant Plasmodium falciparum kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nature Medicine*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1005-2>

- Vairo, F., Nicastrì, E., Meschi, S., Schepisi, M. S., Paglia, M. G., Bevilacqua, N., ... Ippolito, G. (2012). Seroprevalence of dengue infection: a cross-sectional survey in mainland Tanzania and on Pemba Island, Zanzibar. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(1), e44–e46. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2011.09.018>
- Venturi, G., Di Luca, M., Fortuna, C., Remoli, M. E., Riccardo, F., Severini, F., ... Rizzo, C. (2017). Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Eurosurveillance*, 22(39), 17–00646. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00646>
- Veron, V., Simon, S., & Carme, B. (2009). Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Experimental Parasitology*, 121(4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.012>
- ViveBio. (2020). ViveST | ViveBio Scientific. Retrieved November 10, 2020, from <https://vivebio.com/technology-2/technology/>
- Waggoner, J. J., Gresh, L., Mohamed-Hadley, A., Ballesteros, G., Vargas Davila, M. J., Tellez, Y., ... Pinsky, B. A. (2016). Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, Chikungunya, and dengue viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1295–1297. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326>
- Wang, Q.-Y., Patel, S. J., Vangrevelinghe, E., Xu, H. Y., Rao, R., Jaber, D., ... Vasudevan, S. G. (2009). A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1823–1831. <https://doi.org/10.1128/AAC.01148-08>
- Weaver, S. C., & Barrett, A. D. T. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(10), 789–801. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>
- Weller, N., Clowes, P., Dobler, G., Saathoff, E., Kroidl, I., Ntinginya, N. E., ... Heinrich, N. (2014). Seroprevalence of Alphavirus Antibodies in a Cross-Sectional Study in Southwestern Tanzania Suggests Endemic Circulation of Chikungunya. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002979>
- Wernsdorfer, W. H., & Payne, D. (1991). The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology & Therapeutics*, 50(1), 95–121. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90074-v](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90074-v)
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *The Lancet*, 383(9918), 723–735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)

- Whitehorn, J., & Farrar, J. (2010). Dengue. *British Medical Bulletin*, 95(1), 161–173.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldq019>
- WHO. (2009). *DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL*. Retrieved from www.who.int/tdr
- WHO. (2010). *WORLD MALARIA REPORT 2010*. Retrieved from https://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf?ua=1
- WHO. (2012). *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 4 (2012)*. Retrieved from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77748/9789241504720_eng.pdf;jsessionid=0918213C82578D383C73C27E10167B93?sequence=1
- WHO. (2013a). *HOSPITAL CARE FOR CHILDREN WHO ISBN 978 92 4 154837 3*. Retrieved from www.who.int/maternal_child_adolescent/en
- WHO. (2013b). T3: Test. Treat. Track. Scaling up diagnostic testing, treatment and surveillance for malaria. WHO. Retrieved from https://www.who.int/malaria/publications/atoz/t3_brochure/en/
- WHO. (2015). *FOR THE TREATMENT OF MALARIA GUIDELINES*. Retrieved from www.who.int
- WHO. (2018a). Burkina Faso: Dengue Fever. Retrieved from <https://www.who.int/csr/don/6-november-2017-dengue-burkina-faso/en/>
- WHO. (2018b). *World malaria report 2018. World Malaria Report*. Geneva: World Health Organization. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 1564403](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%2015644403)
- WHO. (2019). *World malaria report 2019. WHO Regional Office for Africa*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- WHO. (2021). childgrowth standards. Retrieved from https://www.who.int/childgrowth/standards/chts_wflh_boys_z/en/
- Wihokhoen, B., Dondorp, A. M., Turner, P., Woodrow, C. J., & Imwong, M. (2016). Use of Blood Smears and Dried Blood Spots for Polymerase Chain Reaction-Based Detection and Quantification of Bacterial Infection and Plasmodium falciparum in Severely Ill Febrile African Children. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 94(2), 322–326. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0532>
- Wilder-Smith, A., & Gubler, D. J. (2008). Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. *Medical Clinics of North America*, 92(6), 1377–1390. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2008.07.002>
- Wilder-Smith, A., Gubler, D. J., Weaver, S. C., Monath, T. P., Heymann, D. L., &

- Scott, T. W. (2017). Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(3), e101–e106. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30518-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30518-7)
- Williams, T. N. (2012). Balancing act: haemoglobinopathies and malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(6), 427–428. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70067-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70067-1)
- Worldbank. (2017). Birth Rate. Retrieved from <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.TFRT.IN?locations=TZ>

8 Anhang

8.1 Einverständniserklärung für Eltern oder Erziehungsberechtigte

Dieses Informationsblatt wurde den Eltern oder den Erziehungsberichtigten in Englisch und in Swahili ausgehändigt.



INFORMED CONSENT

You are requested to take part in a study regarding mosquito transmitted diseases. Doctors at Bugando Medical Centre and affiliated hospitals are looking for causes of febrile diseases in paediatric and adult patients such as Dengue and Chikungunya virus. **If You are willing to participate**, You need to sign this form as indicative of your willingness. Participation is strictly voluntary and unwillingness to participate in this study will **not affect the treatment**. Patients may withdraw their consent to participate at any time during the study period and such a decision will be respected by the doctor.

Participants will undertake an interview and afterwards, blood sample will be obtained from You. **This blood sample will be stored and we will use it to test You for certain diseases like Dengue and Chikungunya, that might be the cause of your last fever.**

The blood test may cause pain at the time of drawing the blood sample but overall, there will be no physical impairment expected from participation.

Besides the outlined inconveniences (taking a blood sample and answering the questionnaire), we hope to offer some benefits. In addition, the information gathered will hopefully help to improve that treatment for febrile children in your area in the future.

I have had the chance to reflect the information given, ask questions and the answers provided were satisfactory.

I have understood the above information. I recognize that the participation is voluntary and that I am free to withdraw at any time, without giving any reason, without my medical care or legal rights being affected.

Signature of parent

Signature of study staff

place, date

If you have any queries regarding this study, feel free to contact:

NEEMA M. KAYANGE. Principal Investigator, Catholic University of health and allied sciences, Department of Pediatrics: P.O.Box 1464, Mwanza. Tel: +255-754-018337.

Or in any case of any information concerning your rights as a study participant, please contact;

Prof Kongolla, Director of Research and Publications, Catholic University of Health and Allied Sciences, P.O.Box 1464, Mwanza.

National Institute for Medical Research
P.O. Box 9653, Dar es Salaam, Tanzania
Telephone & Fax: Tel: +255 22 2121400, Fax: 255 22 2121360
E- Mail: ethics@nimr.or.tz
www.nimr.or.tz

8.2 Fragebogen für die Kinder

ID:

Prevalence of arboviral infections in hospitalised and outpatient children under the suspicion of Malaria infection at Bugando Medical Center and affiliated hospitals in the Lake Victoria Region, Tanzania

Thank you for participating in our study. I will read each question loud and wait for your response. For some questions I will also read loud some responses from which you can choose. Please take as long as you need to remember or think about your answer. If you need more clarification please tell us for further information. All your answers will be kept confidential and this questionnaire is anonymous.

1. Socio-demographic data.

QN	Code	Questions and Filters	Response
01	REASS	<i>Research Assistant</i>	Research Assistant 1 Research Assistant 2
02	DOI	<i>Date of interview</i>	 Day Month Year
03	SEX	<i>Sex</i>	Male 0 Female 1
04	AGE	<i>Age</i>	Years and Months
05	ETHNIC	<i>What is your tribal origin?</i>	☐ Sukuma ☐ Zinza ☐ Haya ☐ Sumbwa ☐ Jita ☐ Nyamwezi ☐ Mkurya ☐ Kerewe ☐ Muha ☐ Other
06	REGION	<i>Current Area of Living (Closest city)</i>	☐ Sengerema ☐ Biharamulo ☐ Mwanza ☐ Shinyanga ☐ Geita ☐ Other ☐ Kahama

Checklist:

- ☐ mRDT
- ☐ Urinstix
- ☐ Filtercard
- ☐ Sera

2. Medical history

QN	Code	Question and filters	Response
07	HOF	<i>Since when are the Symptoms/ is the fever?</i>	Fever/ Symptoms for _____ days
08	CMEDICS	<i>Has the child already received any Medication because of the current disease?</i>	☐ Antibiotics ☐ Antimalariamedication ☐ Pain Medication ☐ Others
09	VACCIN	<i>Vaccination-Card checked?</i>	☐ Vacc up to date ☐ Yellow Fever Vacc
10	CROND	<i>Does the child have any chronic diseases?</i>	☐ HIV ☐ SCD ☐ Syndrome ☐ Others

3. Present symptoms

QN	Code	Question and filters	Responses
11	RASH	<i>Rash (Localization? Dermatographic Urticaria ?)</i>	No 0 Yes 1 _____
12	GITINF	<i>Sings for Gastrointestinal Infection</i>	☐ Vomiting _____x ☐ Diarrhea (≥ 4 x per day) ☐ Abdominal discomfort
13	XPAIN	<i>Does the child have any pain?</i>	☐ Headache ☐ Retro orbital ☐ Muscles ☐ Joint/ Bone/ Back
14	URINA	<i>Sings for UTI</i>	☐ Dysuria _____

4. Physical examination

QN	Code	Question and filters	Coding categories
15	PALLOR	<i>Pallor (Conjunctival examination)</i>	No 0 Mild/Moderate Pale 1 Severely Pale 2
16	DEHYD	<i>Dehydration (Tugor, Tears, Mucous membrane)</i>	No 0 Yes 1
17	EDEMA	<i>Does the child have any Oedema?</i>	No 0 Yes 1
18	HEPSPLEN	<i>Does the child have Hepato- or Splenomegaly?</i>	☐ Hepatomegaly ☐ Splenomegaly
19	PNEUM	<i>Are there any signs for Pneumonia?</i>	☐ Cough ☐ Nasal discharge ☐ DIB ☐ Sputum ☐ Crackles
20	MENENCE	<i>Are there any signs for Meningitis or Encephalitis?</i>	GCS _____ ☐ Neck Stiffness ☐ Convulsion

5. Physical measurements/ Labs– for all patients

QN	Code	Question and filters	Coding categories
21	HGHTLENG	Height/Length	. cm
22	WEIGHT	Weight	. kg
23	TEMP	Body temperature	. °C
24	RR	Respiratory rate	Breaths/minute
25	SPO2	Saturation of O2 in room air	%
26	PR	Pulse rate	Beats/minute
27	BS	Rapid Test for malaria (Mainz) (Sengerema)	Negative (valid) ☐ Positive (valid) Pf: ☐ Pan: ☐ Negative (valid) ☐ Positive (valid) Pf: ☐ Pan: ☐
28		Rapid Test for Dengue	Negative (valid) ☐ Positiv (valid) ☐
29	WD	What is the working Diagnose?	☐ Malaria ☐ UTI ☐ RTI ☐ Sepsis ☐ Anaemia ☐ GTI ☐ _____
30	PM	What is the prescribed Medication?	☐ Antibiotics _____ ☐ Antimalariamedication _____ ☐ Pain Medication _____ ☐ Other: _____
31	AORD	Was the Patient admitted or discharged?	☐ Admitted ☐ Discharged

6. Lab Results / Uristix

QN	Code	Question and filters	Coding categories
32	URISTIX	<i>Dipstick urinalysis</i> Date:	Glucose Bilirubin Ketone Spezif. Gew. Blood pH Proteins Urobili Nitrit Leucocytes
33	BLOODANA	<i>Full Blood Picture</i>	HB: _____ Leuc.: _____ Thromb.: _____ Hct.: _____ Others:
34	NUTRIST	_____ cm / _____ kg <i>Weight for height/length:</i> _____ months / _____ kg <i>Weight for age:</i> BMI (≥ 5 Y): $(\frac{\text{kg}}{\text{cm}^2})^2 =$	No malnutrition 0 Mild malnutrition 1 Moderate malnutrition 2 Severe malnutrition 3

In case of admission

7. Discharge data

QN	Code	Questions and Filters	Coding Categories
35	DOD	<i>Date of discharge or death</i>	____ ____ ____ Day Month Year
36	HOSPDUR	<i>Duration of hospital stay</i>	____ Days
37	DISCHDX	<i>Discharge diagnosis</i>	
38	INPTCOM	<i>In hospital outcome</i>	Alive 0 Dead 1

8.3 Einverständniserklärung für die Erwachsenen



KISWAHILI VERSION

Karibu ushiriki katika utafiti kuhusu magonjwa yaambukizwayo na mbu.

Madaktari wa Bugando hospitali washirikiana na washirika wake Sekou Toure na Sengerema wanafanya utafiti kutafuta visababishi vya ugonjwa wa homa vinavyoweza kuletwa na virusi kama Dengue na Chikungunya na utafiti huu unahusisha wagonjwa ambao ni watoto na watu wazima watakaolazwa na tatizo la homa katika wodi za hospitali husika.

Kama upo tayari na unakubali kushiriki, tutahitaji uweke sahihi kwenye hii fomu kuonyesha ushiriki wako.

Ushiriki huu ni wa hiari na kama haupo tayari kushiriki haitaathiri huduma za matibabu kwa watoto na watu wazima unaweza kujitoa kwenye utafiti muda wowote utakapojisikia na uamuzi wako utaheshimiwa.

Mshiriki atafanyiwa mahojiano, uchunguzi wa kimwili, na watatolewa damu kwa ajili ya vipimo zaidi na pia kuweza kulinganisha damu kati ya mzazi na mtoto. Mshiriki atasikia maumivu kidogo kutoka na na kuchomwa sindano wakati wa kutolewa damu lakini kwa ujumla ulemavu wa mwili hautatokea kwa kushiriki utafiti huu.

Nimepata nafasi ya kutafakari, taarifa nilizopewa kuhusu utafiti huu, kuuliza maswali na kupewa majibu yanayoridhisha.

Nimeelewa vema maelezo hapo juu. Ninatambua ushiriki wangu ni wa hiari na ninaweza kujitoa wakati wowote nitakapojisikia bila kutoa sababu yoyote na bila ya matibabu yangu wala haki zangu kisheria kuathiriwa.

Sahihi ya mgonjwa/ Ndugu wa mgonjwa

Tarehe

Kama una maswali yoyote kuhusiana na utafiti huu jisikie huru kuwasiliana na:

NEEMA M. KAYANGE; Mtafiti Mkuu; Chuo Kikuu Cha Afya na Tiba CUHAS - Bugando;
Idara ya Watoto; SLP 1464, Mwanza. Simu: +255-754-018337

Au ukihitaji taarifa kuhusu haki zako kama mshiriki tafadhali wasiliana na:

Prof.Kongolla; Mkurugenziwa Kamatiya Tافیتینا Matoleo Chuoni, Chuo Kikuu Cha Afya na
Tiba, CUHAS Bugando, SLP: 1464, Mwanza.

National Institute for Medical Research
P.O. Box 9653, Dar es Salaam, Tanzania
Telephone & Fax: Tel: +255 22 2121400, Fax: 255 22 2121360
E- Mail: ethics@nimr.or.tz
www.nimr.or.tz

8.4 Fragebogen für die Erwachsenen

ID:

Prevalence of arboviral infections in hospitalised and outpatient children under the suspicion of Malaria infection at Bugando Medical Center and affiliated hospitals in the Lake Victoria Region, Tanzania

Thank you for participating in our study. I will read each question loud and wait for your response. For some questions I will also read loud some responses from which you can choose. Please take as long as you need to remember or think about your answer. If you need more clarification please tell us for further information. All your answers will be kept confidential and this questionnaire is anonymous.

1. Socio-demographic data.

QN	Code	Questions and Filters	Response
01	REASS	<i>Research Assistant</i>	Research Assistant 1 Research Assistant 2
02	DOI	<i>Date of interview</i>	 Day Month Year
03	SEX	<i>Sex</i>	Male 0 Female 1
04	REL	<i>How are You related to the child?</i>	Father 0 Mother 1 Others:
04	AGE	<i>Age</i>	Years and Months
05	ETHNIC	<i>What is Your tribal origin?</i>	Same as the child 0 Different: 1

2. Medical history

QN	Code	Question and filters	Response
07	HOF	<i>When did You have fever the last time? For how long did You have fever?</i>	Fever/ Symptoms _____ Duration:
08	CMEDICS	<i>Did You take any medication because of the past disease?</i>	☐ Antibiotics ☐ Antimalariamedication ☐ Pain Medication ☐ Others

QN	Code	Question and filters	Response
09	NET	<i>Do You sleep under a mosquito net?</i>	☐ No 0 ☐ Yes 1
10	CROND	<i>Do You have any chronic diseases?</i>	☐ HIV ☐ SCD ☐ Syndrome ☐ Others _____
11	MALARIA	<i>Have You had Malaria?</i> <i>How many times?</i> <i>Did you take Antimalariamedication?</i>	☐ No 0 ☐ Yes 1 _____times ☐ No 0 ☐ Yes 1

3. Past symptoms

QN	Code	Question and filters	Responses
12	RASH	<i>Rash (Localization? Dermatographic Urticaria ?)</i>	No 0 Yes 1
13	GITINF	<i>Sings for Gastrointestinal Infection</i>	☐ Vomiting _____ x ☐ Diarrhea (≥ 4 x per day) ☐ Abdominal discomfort
14	XPAIN	<i>Did You have any pain?</i>	☐ Headache ☐ Retro orbital ☐ Muscles ☐ Joint/ Bone/ Back
15	URINA	<i>Sings for UTI</i>	☐ Dysuria _____
16	AORD	<i>Was the Patient admitted or discharged?</i>	☐ Admitted How many days _____ ☐ Discharged

9 Danksagung

Hier an dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dem Sengerema Designated District Hospital, insbesondere der Krankenhausleitung, sowie dem gesamten Krankenhauspersonal für Ihre Hilfsbereitschaft und Ihr großes Interesse an unserem Projekt. Für die Offenheit gegenüber unserem Projekt und die Bereitstellung von Proben bedanke ich mich herzlich bei der IST Clinic in Dar es Salaam und bei allen Mitwirkenden im Rahmen der Probengewinnung in Burkina Faso.

Zudem möchte ich mich bei unseren tansanischen Projektpartnern und allen weiteren in diesem Projekt Beteiligten für die gute Zusammenarbeit und den lehrreichen Erfahrungsaustausch bedanken.

Für die gute und enge Betreuung während des gesamten Forschungsprojekts und bei der Anfertigung der Dissertation bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des klinisch-infektiologischen Labors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Mainz.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets motiviert und auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

10 Lebenslauf

<u>Persönliche Daten</u>	
Nachname	Follmann
Geburtsname	Hagemann
Vorname	Marlene
Geburtsdatum	29.08.1992
Geburtsort	Seeheim-Jugenheim
Familienstand	verheiratet
Kinder	Marlon Benedikt Follmann

<u>Schul Ausbildung</u>	
Grundschule	Schule am Pfaffenberg in Mühlthal, 1999-2003
Weiterführende Schule	Edith-Stein-Schule Darmstadt, staatl. anerkanntes katholisches Gymnasium, 2003-2012 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

<u>Hochschulausbildung</u>	
Studium der Humanmedizin	Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Wintersemester 2013- Wintersemester Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 03/2016 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 04/2020 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 11/2021
Famulaturen	08/2016-09/2016: Central Hospital Hue, Vietnam 03/2017-04/2017: Karapitiya Hospital Galle, Sri Lanka 08/2017-09/2017: Bugando Medical Center in Mwanza, Tansania 02/2019-03/2019: Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin Dr. med. Jennifer

	Demmerle und Dr. med. Peter Follmann, Winnweiler
Praktisches Jahr, 10/2021-10/2022	1. Tertial: Chirurgie, GPR Klinikum Rüsselsheim 2. Tertial: Innere Medizin, GPR Klinikum Rüsselsheim 3. Tertial: HNO, GPR Klinikum Rüsselsheim
Dissertation im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Mainz	Forschungsprojekt in Sengerema, Tansania, 08/2017-03/2018 Dissertationsthema: Surveillance von arboviralen Infektionen und Malaria in einem Distriktkrankenhaus in Nord-Tansania mittels molekularbiologischer Diagnostik und POC-Schnelltests Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Stephan Gehring

Berufliche Tätigkeiten	
Assistenzärztin der Inneren Medizin im Rahmen des Allgemeinmedizin Programms	GPR Klinikum Rüsselsheim, seit 01.01.2022

<u>Weitere Tätigkeiten</u>	
12-monatiger Weltfreiwilligendienst über das Entsendeprogramm „weltwärts“	Mzuzu Crisis Nursery, Malawi, 08/2012-08/2013