

**Fünf Jahre nach Erstdetektion des asiatischen
Malariaüberträgers *Anopheles stephensi* (Diptera:
Culicidae) in Dschibuti, Horn von Afrika
Vektorpopulation etabliert – Malaria wieder epidemisch**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Marco Seyfarth

aus Bad Frankenhausen

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Michael Faulde
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Exner

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.03.2020

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Hoerauf

Inhaltsverzeichnis

1.	Deutsche Zusammenfassung	4
1.1	Einleitung	4
1.2	Material und Methoden	8
1.3	Ergebnisse	10
1.4	Diskussion	13
1.5	Zusammenfassung	17
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	18
2.	Veröffentlichung	23
	Abstract	23
	Introduction	23
	Material and Methods	24
	Results	25
	Discussion	27
	References	29
3.	Danksagung	31

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Bedrohung durch vektor-assoziierte Erkrankungen und wichtige Einflussfaktoren

Trotz der ständig zunehmenden Anzahl Vektor-assoziiierter Erkrankungen, die gegenwärtig weltweit neu wiederaufleben bzw. auftauchen, ist nur für wenige eine Prävention durch Impfung möglich. Chemoprophylaktika sind lediglich für die Malaria, weltweit eine der häufigsten und wichtigsten vektorassoziierten Erkrankungen, verfügbar. Jedoch nimmt bei allen humanpathogenen Plasmodienspezies die Therapeutikaresistenz in ihrer Häufigkeit zu und breitet sich geografisch weiter aus.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat die elf derzeit bedeutendsten, durch Vektoren übertragene Krankheiten identifiziert, durch die jährlich 700.000 Todesfälle verursacht werden (WHO 2017a). Dies entspricht etwa 17 % der geschätzten Todesfälle durch Infektionserkrankungen weltweit (WHO 2017a). Bei den durch Stechmücken übertragenen Krankheiten sind 60 % aller Infektionen auf Malaria zurückzuführen. Auf sie entfallen jedoch etwa 96 % aller dieser Todesfälle (WHO 2017a). Mit jährlich schätzungsweise 447.860 fatalen Fällen ist die Malaria somit weiterhin die relevanteste durch Stechmücken übertragene Infektionskrankheit weltweit (WHO 2017a). Insbesondere in Afrika südlich der Sahara stellen vor allem endemische anthropophile (bevorzugt den Menschen stechende) und endophage (auch innerhalb von Gebäuden stechende) Anophelesmückenarten derzeit die größte Bedrohung für eine Übertragung der Malaria im menschlichen Siedlungsumfeld dar (WHO 2014a).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse des „Roll Back“ Malaria-Programms der WHO (WHO 2017a) können verschiedene Faktoren, darunter Klima- und Umweltveränderungen, Migration humaner Malariareservoirs und / oder die weltweite Ausbreitung invasiver Anophelesmückenspezies mit hohem Übertragungspotenzial die aktuellen und zukünftigen Bemühungen zur Malariabekämpfung negativ beeinflussen. Ein besorgniserregendes Ereignis der jüngsten Zeit ist die Einwanderung des äußerst

effektiven asiatischen Malariavektors *Anopheles stephensi* (Liston) nach Afrika. Diese Art wurde außerhalb Asiens erstmals im Jahr 2012 auf dem afrikanischen Kontinent in Dschibuti in der Nähe der somalischen Grenze nachgewiesen (Faulde et al. 2014). Nach weiterer geografischer Ausbreitung trat *An. stephensi* Anfang 2013 in Dschibuti-Stadt auf (Faulde et al. 2014). In 2016 wurde diese Art erstmals in der Region Somali in Äthiopien, nahe der dschibutischen Westgrenze, nachgewiesen (Carter et al. 2018). In den Malariaendemie- und -epidemiegebieten dieser Krisenregion ist neben der indigenen Bevölkerung vor allem das Personal ziviler Hilfsorganisationen und multinationaler Streitkräfte in besonders hohem Maß gegenüber vektorassoziierten Infektionserkrankungen exponiert und erkrankungsgefährdet.

1.1.2 Geographische Einordnung und Prävalenz der Malaria

Dschibuti liegt auf einem Längengrad von 43° 00' Ost und einem Breitengrad von 11° 30' Nord im Golf von Aden am Horn von Afrika (HoA). Es handelt sich um ein kleines, trockenes Land mit einer zerklüfteten, vulkanischen Topografie und hypersalinen Böden bei einer geschätzten Bevölkerung von 865.000 (World Factbook 2018). Mehr als 70 % der Einwohner leben in der dicht besiedelten Stadt Dschibuti. Historisch wurde in den 1970er und 80er Jahren erstmals eine Zunahme der Malariafälle in der Stadt Dschibuti aufgrund der stark zunehmenden Bevölkerung und des Ausbaus der Bewässerung beobachtet (Rodier et al. 1995). *Anopheles arabiensis* (Patton) war zur damaligen Zeit als primärer Malariavektor identifiziert worden und fast alle Malariafälle waren auf den Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, zurückzuführen. Malaria tertiana-Fälle durch *P. vivax* traten, wenn überhaupt, dann nur sehr sporadisch auf (de Pécoulas et al. 1998) – obwohl eine Studie aus dem Jahr 2002 eine beträchtliche humane Reservoiraktivität von *P. vivax* mit einer mittleren Seroprävalenzrate von 17,5 % für Dschibuti-Stadt belegte (Khaireh et al. 2012).

Da die meisten schwarzafrikanischen Völker das Duffy-Blutgruppenantigen nicht exprimieren, den einzigen bisher bekannten *P. vivax*-Oberflächenrezeptor an der Erythrozytenmembran, führte die geringe Inzidenzrate in Subsahara-Afrika zu der Wahrnehmung, dass diese Malariaerregerspezies dort lediglich sporadisch endemisch,

oder vollständig abwesend ist (Howes et al. 2015). Eine kürzlich durchgeführte Studie lieferte jedoch schlüssige Beweise für die Endemizität und autochthone Übertragung von *P. vivax* in dieser Region, wobei sich das Vorkommen schwerpunktmäßig auf Äthiopien konzentriert hat (Howes et al. 2015).

1.1.3 Reendemisierung der Malaria in Korrelation mit der Ausbreitung von *Anopheles stephensi*

Die Malaria wurde in Dschibuti bis einschließlich 2012 als meso- bis hypoendemisch mit instabiler Übertragung eingestuft und somit in die durch die WHO definierte Präeradikationsphase klassifiziert (Khairah et al. 2013). Die letzte nachgewiesene Malaria-Epidemie des Landes vor 2013 ereignete sich zwischen März und Juni 1999 nach einer ungewöhnlich heftigen Regenzeit. Diese führte zu schweren Überschwemmungen mit vermehrten Brutmöglichkeiten für endemische Malariamückenspezies, die ihre Populationsdichte und damit Malariaübertragungshäufigkeit stark erhöhten (Rogier et al. 2005). Danach sank die Malaria-Inzidenz wieder auf $<1 / 1.000$ Personen / Jahr (Ollivier et al. 2011). Zu diesem Zeitpunkt wurden 100 % aller registrierten lokalen Malariafälle durch *P. falciparum* verursacht und durch *An. arabiensis* übertragen (WHO 2012). Für Dschibuti wurden seitdem sehr günstige Bedingungen für eine völlige Ausrottung der Malaria geschaffen, mit dem Ziel, in die Eradikationsphase der Malaria einzutreten (Khairah et al. 2013). Mittels kontinuierlicher Vektorüberwachung, welche seit 2008 hauptsächlich an verschiedenen, über Dschibuti-Stadt verteilten militärischen Standorten und auf dem Gelände der Deutschen Botschaft durchgeführt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass zu diesem Zeitpunkt ganzjährig keine Malariamückenaktivität in dieser Region mehr vorlag und eine Malariaübertragung somit äußerst unwahrscheinlich war (Faulde und Ahmed 2010).

Im September 2012 wurde *An. stephensi*, ein extrem effektiver und aggressiver Überträger der städtischen Malaria in Indien und im Persischen Golf, zum ersten Mal auf dem afrikanischen Kontinent nachgewiesen (Faulde et al. 2014). Nach Erstdetektion dieser Spezies im September 2012 an der einzigen Tierquarantänestation des Landes

Dschibuti, welche etwa 14 km von Dschibuti-Stadt und 4 km von der somalischen Grenze entfernt liegt, wurde *An. stephensi* im Februar 2013 erstmals auch in den Stadtgebieten Dschibutis nachgewiesen (Faulde et al. 2014).

Zeitgleich mit der geografischen Ausbreitung von *An. stephensi* wurde ab Ende Februar 2013 in den Stadtvierteln von Dschibuti eine äußerst ungewöhnliche Häufung autochthoner Malariainfektionen festgestellt, die ausschließlich durch *P. falciparum* hervorgerufen wurden. Die ungewöhnlich wie fulminant verlaufende Epidemie erreichte Mitte April 2013 ihren Höhepunkt und der Ausbruch endete abrupt im späten Mai 2013 (United Nations 2013). Die damals durchgeführten Analysen zur kontinuierlichen Vektorüberwachung ergaben, dass a) *An. stephensi* ihren Aktionsradius innerhalb der Stadtgebiete von Dschibuti zwischen Februar 2013 und Anfang 2014 erweitert hatte und b) das *P. falciparum*-Circumsporozoiten-Antigen in fünf von 36 weiblichen *An. stephensi*, die in Wohnräumen von Malariapatienten gefangen worden waren, vorhanden war (Faulde et al. 2014). Dieser Nachweis infektiöser, *P. falciparum*-Sporozoiten tragender Malariamücken legt nahe, dass *An. stephensi* an der Übertragung der tropischen Malaria in Dschibuti zumindest beteiligt war (Faulde et al. 2014).

1.1.4 Ziel der Studie

Aufgrund der seit 2013 äußerst spärlichen Datenlage zur Malariasituation und -epidemiologie für Dschibuti fehlen Bewertungs- und somit Handlungsgrundlagen sowohl für die nationalen Malariabekämpfungs- und -eradikationsmaßnahmen als auch für reisemedizinische Empfehlungen zur Malariaphylaxe und Therapie. Ziel dieser Studie war es daher:

- (a) festzustellen, ob und wo *An. stephensi*-Populationen präsent sind und inwieweit sie sich in Dschibuti geografisch ausgebreitet haben,
- (b) die saisonale Populationsdynamik von *An. stephensi* und deren Bionomie zu untersuchen,

(c) zu ermitteln, welche endemischen *Anopheles*arten - außer *An. stephensi* - an den Überwachungsstellen abundant sind und möglicherweise zur autochthonen Übertragung der Malaria beitragen,

(d) die vorhandene Literatur zu Analyse und Vorkommen der Malaria in Dschibuti ab 2013 zu analysieren und

(e) nachzuweisen, ob und in welchem Umfang *An. stephensi* zur autochthonen Übertragung der Malaria beigetragen hat, indem das Vorliegen des für den Menschen infektiösen Sporozitenstadiums durch Nachweis des Circumsporozoiten-Antigens von *P. falciparum* und *P. vivax* in weiblichen Anophelesmücken untersucht wird.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Stechmückenüberwachung und Probenahmestellen

Von Januar 2012 bis Dezember 2017 wurde die Vektorüberwachung an drei festgelegten Tagen pro Woche kontinuierlich an definierten Standorten in der Stadt Dschibuti durchgeführt. Dabei wurden standardisierte Miniatur-CDC-Lichtfallen (Modell 1012; John W. Hook, Gainesville, FL, USA) und BG Sentinel-Lockstofffallen (BioGents AG, Regensburg, Deutschland), die mit BG-Lure®-Moskito-Lockstoff beködert wurden, eingesetzt. Die Fallen wurden aus logistischen und Stromversorgungsgründen an drei Tagen pro Woche aktiviert und nach jeder Aktivitätsphase geleert. Im Stadtgebiet von Dschibuti wurden insgesamt sechs Überwachungsstandorte (ÜS) in bzw. in der Nähe von militärischen Anlagen oder Unterkunftsbereichen sowie auf dem Gelände der deutschen Botschaft wie folgt eingerichtet: ÜS 1, Plateau du Héron (43°09'01" E; 11°37'17" N); ÜS 2, in der Nähe des Sheraton Hotels (43°09'29" E; 11°36'09" N); ÜS 3, Militärflugplatzbereich I (43°08'54" E; 11°33'07" N); ÜS 4, militärischer / ziviler Flughafenbereich II (43°09'13" E; 11°33'11" N); ÜS 5, Militär- / Zivilflugplatzbereich III (43°09'01" E; 11°33'23" N); ÜS 6, Deutsche Botschaft (43°09'51" E; 11°33'53" N).

1.2.2 Identifizierung von Anopheles-Mückenarten

Die morphologische Identifizierung von Stechmücken erfolgte mit Hilfe von Dissektionsmikroskopen bei 10- bis 100-facher Vergrößerung sowie mit Stechmückenidentifizierungsschlüsseln für die Region am Horn von Afrika (Gillies und Coetzee 1987; Das et al. 1990; Glick 1992) unter zusätzlicher Nutzung der Online-Datenbank der Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU 2012). Die endgültige Bestätigung von *An. stephensi* erfolgte durch den detaillierten Vergleich neuer Fänge mit im Jahr 2013 gefangenen Referenzexemplaren, die mittels molekularbiologischer Methoden auf Speziesebene determiniert wurden (Faulde et al. 2014).

1.2.3 Probenvorbereitung und Nachweis von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* Circumsporozoitenantigenen (CSPs)

Frisch gefangene weibliche Anophelesmücken, katalogisiert nach Datum, Ort und Fallentyp, wurden trocken in einem Kühlschrank bei -20 ° C gelagert, anschließend einzeln bis zur Weiterverarbeitung in 70 %-iges wässriges Ethanol in Eppendorf-Schraubgefäße überführt und vor dem Malaria-CSP-Test bis auf Speziesebene morphologisch bestimmt. Der VectorTest® Malaria Sporozoite Antigen Panel Assay, ein Dip-Stick-ELISA (Vector Test Systems, Inc., Thousand Oaks, Kalifornien, USA) wurde zur Detektion des spezifischen CSP von *P. falciparum* sowie der *P. vivax* Polymorphe VK 210 und VK 247 verwendet (Bangs et al. 2002). Alle weiblichen Anophelesmücken wurden individuell auf CSP untersucht.

1.2.4 Literaturrecherche

Elektronische wissenschaftlich-medizinische Datenbanken, darunter PubMed, Web of Science, Scopus, das Literaturrecherche-System der US-Streitkräfte am U.S. Armed Forces Pest Management Board, Google Scholar und MEDLINE, wurden innerhalb des Veröffentlichungszeitraums von 2011 bis 2018 nach den Begriffen " Djibouti & Malaria", "Djibouti & Paludisme" und "Military & Djibouti & Malaria" durchsucht und ausgewertet.

Darüber hinaus wurden die WHO World Malaria Reports 2011 bis 2017 nach Malaria-Berichten und -profilen für die Region Dschibuti analysiert (WHO 2012; 2013; 2014b; 2015; 2016; 2017b). Die in den Spalten "vermutete und bestätigte Malariafälle" aufgeführten jährlichen Malariadaten wurden extrahiert. In den zwischen 2011 und 2017 veröffentlichten Jahresberichten des Medical Surveillance Health Surveillance Centers der US-Streitkräfte wurden Berichte über Malariaerkrankungen bei US-Streitkräften ausgewertet, die u.a. in Dschibuti autochthon erworben wurden (AFHSC 2012; 2013; 2014; AFHSB 2015; 2016; 2017; 2018). Am Horn von Afrika sind die US-Streitkräfte hauptsächlich in Camp Lemonnier, in der Nähe des internationalen Flughafens Ambouli in Dschibuti-Stadt, stationiert. Die für 2017 verwendeten Malaria-Daten stammen ausschließlich vom Gesundheitsministerium der Republik Dschibuti und wurden bislang nicht veröffentlicht.

1.2.4 Statistische Analysen

Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung ($x \pm SD$) angegeben. Statistische Unterschiede in den jährlichen Fallen-Indizes für *An. stephensi* wurden berechnet und mittels zweiseitigem t-Test im fünften Perzentil der Signifikanz mit dem Programm SPSS 8.0 (SPSS Software GmbH, München, Deutschland) miteinander verglichen.

1.3 Ergebnisse

Im Studienzeitraum von 2013 bis 2017 war *An. stephensi* die einzige Malariamückenspezies, die an den Überwachungsstandorten ÜS 1 bis 6 nachgewiesen werden konnte. Diese Stechmückenart wurde im Überwachungssegment zwischen 2013 und 2015 zwar regelmäßig, jedoch nur in sehr geringen Individuenzahlen, detektiert. Seit 2016 aber nahm die Populationsdichte dieser Spezies zu. Während in den Jahren 2013, 2014 und 2015 insgesamt 30, 11 und 8 Individuen mit Fallenindizes (männliche und weibliche *An. stephensi*-Mücken pro Falle pro Fangnacht) von $0,14 \pm 0,078$, $0,13 \pm$

0,097 bzw. $0,06 \pm 0,027$ an den Monitoringstandorten nachweisbar waren, wurden in 2016 insgesamt 46 Individuen (Fallen-Index $0,47 \pm 0,22$) und für 2017 insgesamt 185 Proben (Fallen-Index $0,57 \pm 0,41$) detektiert. Die niedrigen mittleren Fallen-Indizes von 2013 unterschieden sich gegenüber 2014 ($p = 0,841$) sowie im Vergleich von 2014 mit 2015 ($p = 0,145$) nicht signifikant voneinander. Demgegenüber weisen die mittleren Fallen-Indizes von 2013 im Vergleich mit 2015 auf eine signifikante Reduktion ($p = 0,0019$) der Populationsdichte hin. Seit 2016 wurde wiederum eine deutliche Zunahme der *An. stephensi*-Population festgestellt, die im Vergleich mit 2015 ($p < 0,0001$) sowie im Vergleich von 2015 mit 2017 ($p < 0,0001$) signifikant erhöht war. Nicht signifikant unterschiedlich waren die Populationsdichten zwischen 2016 und 2017 ($p = 0,091$). Das durchschnittliche jährliche Verhältnis von weiblichen zu männlichen Anophelesmücken lag 2013 bei 2,75, 2014 bei 1,75, 2015 bei 0,33, 2016 bei 1,42 und 2017 bei 0,52. Somit belegen die Ergebnisse, dass die *An. stephensi*-Populationsdichte nach ihrer Ansiedlung in den städtischen Gebieten von Dschibuti und ihrer ersten Entdeckung im Jahr 2013 am Horn von Afrika bis 2015 sank, seit 2016 jedoch signifikant und kontinuierlich anstieg und somit diese Spezies für Afrika nunmehr endemisch geworden ist.

Während die jährliche saisonale Aktivität von *An. stephensi* in Dschibuti zwischen 2013 und 2016 nahezu ausschließlich in der kälteren, feuchteren Jahreszeit zwischen September und Mai im adulten Stadium durch Flugaktivität mittels Stechmückenfallen detektierbar war, konnte für 2017 erstmals eine ganzjährige Flug- und damit Übertragungsaktivität festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse belegen somit eine veränderte saisonale und jährliche wechselnde Abundanz an den Monitoringstandorten. Dabei stieg die Populationsdichte an den jeweiligen Überwachungsstandorten ungleichmäßig an, wobei eine besonders starke Zunahme der Populationsdichte an ÜS 2 (Region Sheraton Hotel) festgestellt werden konnte.

Aus den sehr wenigen bislang veröffentlichten Daten zur Malaria in Dschibuti ist ersichtlich, dass bis 2012 ausschließlich eine meso- bis hypo-endemische Malariatransmission mit *P. falciparum* vorlag. Bei einer seit dem Jahr 2000 stattfindenden kontinuierlichen Abnahme autochthon erworbener Fälle wurden für 2012 lediglich 27 Malaria tropica Infektionen laborbestätigt. Zu diesem Zeitpunkt war

Dschibuti, gemäß den seitens der WHO empfohlenen Kriterien, in die nationale Präeliminierungsphase der Malaria eingetreten. Gleichzeitig mit der Einwanderung und dem Erstnachweis von *An. stephensi* im Jahr 2012 mit anschließender geografischer Ausbreitung nach Dschibuti-Stadt im Februar 2013 erlebte die Malaria, neben einer sich verändernden, nunmehr urbaneren Epidemiologie bei der autochthonen Übertragung, eine drastische Renaissance. Seitdem fokussiert sich die autochthone Malariaübertragung – im Gegensatz zum früheren ruralen Übertragungsmodus mit Schwerpunkt in den Außenbezirken der Stadt entlang des Deltas des Ambouli-Flusses – auf die dicht besiedelten urbanen Stadtbereiche. Die bis 2016 von der WHO veröffentlichten und für 2017 seitens des Gesundheitsministeriums der Republik Dschibuti intern erhobenen jährlichen Malaria-Fälle stiegen kontinuierlich von 1.684 im Jahr 2013 auf 9.439 im Jahr 2014, 9.557 im Jahr 2015, 13.804 im Jahr 2016 und 14.810 im Jahr 2017 an. Einhergehend mit der Zunahme der autochthon erworbenen Malaria-Fälle wurde seit 2016 eine zusätzliche Veränderung in der Verteilung der auftretenden *Plasmodium*-Spezies beobachtet. Bis 2015 wurde in Dschibuti ausschließlich von einer *P. falciparum* Übertragung berichtet. Im Jahr 2016 wurde jedoch erstmals eine autochthone Transmission von *P. vivax* (Malaria tertiana) mit einer bemerkenswert hohen Rate von 16,7 % (2.041/13.804 Fälle) bezogen auf alle Malariafälle festgestellt, die 2017 überraschend schnell auf 36,7 % (5441/14.810 Fälle) anstieg. Diese Daten bestätigend stieg die Anzahl der lokal erworbenen Malariafälle bei in Dschibuti-Stadt stationierten US-Soldaten von null in den Jahren 2010 bis 2014 auf insgesamt drei pro Jahr zwischen 2015 und 2017 (AFHSB 2016; 2017; 2018) an. *Plasmodium vivax*-Fälle wurden erstmals 2016 mit zwei Fällen diagnostiziert (66 %) mit zwei weiteren Fällen (66 %) für das Jahr 2017.

Von den 96 bei ÜS 1 bis ÜS 6 gefangenen weiblichen *An. stephensi* waren zwischen 2015 und 2017 insgesamt drei (3,1 %) Individuen Malaria-CSP positiv. Unter den positiven Proben war ein Weibchen, das im Februar 2017 bei ÜS 3 gefangen worden war, *P. falciparum*-CSP-positiv, ein zweites, welches im März 2017 bei ÜS 5 gefangen wurde, ebenfalls, und ein drittes, gesammelt im Dezember 2017 bei ÜS 4, wies eine Doppelinfektion mit *P. falciparum* und *P. vivax* VK 210 auf. Alle drei Malariasporoziten-positiven *An. stephensi*-Exemplare wurden in der Nähe des internationalen Flughafens Ambouli gefangen.

1.4 Diskussion

In Dschibuti-Stadt wird seit August 2008 eine kontinuierliche, standardisierte Vektorsurveillance hauptsächlich an Standorten durchgeführt, die von deutschen Streitkräften genutzt werden oder zum Gelände der Deutschen Botschaft gehören (Faulde und Ahmed 2010; Faulde et al. 2012; Faulde et al. 2014). Von August 2008 bis Januar 2013 wurden mit Ausnahme von zwei weiblichen Exemplaren von *An. sergentii* (nachgewiesen 2009 am Flughafen Ambouli, entsprechend ÜS 3 der vorliegenden Studie), keinerlei Anophelesmücken detektiert. *Anopheles arabiensis*, der wichtigste lokale Malariavektor, welcher ökologische Nischen wie ausgetrocknete Wadis, offene Wasseransammlungen mit Vegetation und künstliche Bewässerungskanäle bevorzugt (Dida et al. 2018), wurde an keiner der urbanen Überwachungsstandorte in dieser Studie entdeckt.

Im Großraum Dschibuti-Stadt wurden in der Vergangenheit geeignete Bedingungen für endemische Malariavektoren wie *An. arabiensis* nur entlang des Ambouli-Flusses und seines Delta-Bereichs in der Peripherie und in den ländlichen Randgebieten der Stadt identifiziert, nicht jedoch in den Stadtvierteln, in denen sich die urbanen Standorte der Fallen in dieser Studie befanden (Faulde und Ahmed 2010; Ollivier et al. 2011; Faulde et al. 2012). Zu den ökologischen Umweltbedingungen in der Nähe des Ambouli-Flusses gehört eine Vegetation, welche die Auswahl der *An. arabiensis*-Eiablageorte positiv beeinflussen und die Überlebensfähigkeit der Larven während ihrer Entwicklung unterstützen kann (Asmare et al. 2017). Autochthone Malariaübertragung und Malariaendemiegebiete waren in der Vergangenheit daher in erster Linie auf diesen Bereich beschränkt (Ollivier et al. 2011). Eine Übertragung von urbaner Malaria, insbesondere in den in dieser Studie hauptsächlich untersuchten privilegierten Stadtvierteln, konnte bis zum Auftreten von *An. stephensi* im Februar 2013 nicht nachgewiesen werden (Vereinte Nationen 2013; Faulde et al. 2014). Im Gegensatz zu *An. arabiensis* brütet *An. stephensi* typischerweise auch in verschiedensten artifizialen Wasserstellen wie beispielsweise in häuslichen Brunnen mit zementierten Wänden (Faulde et al. 2014; Carter et al. 2018).

Anopheles stephensi ist als wichtigster und effektivster Vektor der urbanen Malaria in Asien mit hohem synanthropen Potenzial in Indien und am Persischen Golf bekannt.

Diese Art überträgt sowohl *P. vivax* als auch *P. falciparum* (Wilson et al. 2015). Im Vergleich zu *An. gambiae*, dem wichtigsten afrikanischen Hauptvektor der Malaria tropica, zeigt *An. stephensi* ähnlich hohe Infektionsprävalenz- und Plasmodiumsuszeptibilitätsraten (Hume et al. 2007). Dennoch hat sich gezeigt, dass die speziesspezifische Suszeptibilität gegenüber *P. falciparum* bei beiden *Anopheles*-Arten Unterschiede aufweisen, die abhängig von der geographischen Herkunft sowohl des Malariaparasiten als auch der Stechmücke variieren können (Hume et al. 2007). Der erste Nachweis einer vorliegenden Vektoraktivität für *P. falciparum* bei *An. stephensi* in Dschibuti-Stadt wurde durch Detektion *P. falciparum*-CSP-positiver Weibchen während der epidemischen Malariatransmissionsphase zwischen 2013 und 2014 nachgewiesen (Faulde et al. 2014). Dieses Ereignis weist auf eine autochthone Malariaübertragung durch diese Spezies hin (Faulde et al. 2014). Aktuelle Ergebnisse aus der vorliegenden Studie bestätigen nach erneuter Detektion *P. falciparum*-CSP-positiver Weibchen die Beteiligung von *An. stephensi* an der lokalen städtischen Malariatransmission. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass mit *P. falciparum* infizierte *An. stephensi* grundsätzlich theoretisch auch durch den Luftverkehr im Sinne einer Flughafenmalaria auf das Gelände des internationalen Flughafens Ambouli hätten eingeschleppt werden können.

Anopheles stephensi ist neben *P. falciparum* nachgewiesenermaßen vektorkompetent für *P. vivax* und vermutlich auch für weitere humanpathogene Plasmodien-Spezies (Nina et al. 2017). So wurden bei Wildfängen in endemischen Regionen im Westen Indiens in den lokalen *An. stephensi*-Stämmen mit einer Sporozoitenkolonisationsrate von 4+ eine sehr hohe Vektorsuszeptibilität für *P. vivax* festgestellt. (Nina et al. 2017). Der eingesetzte CSP-ELISA sowie die für diese Studie erhobenen epidemiologischen Daten liefern starke Hinweise dafür, dass in Dschibuti-Stadt sowohl *P. falciparum* als auch *P. vivax* Malaria durch *An. stephensi* simultan übertragen wird. Inwieweit Adaptationen von *An. stephensi* an endemische *P. falciparum* und *P. vivax* VK 210-Stämme sowie an die extremen ökologischen und klimatischen Bedingungen in Dschibuti stattgefunden haben, bleibt durch anschließende Studien zu klären. Aufgrund des bekannten hohen Vektorpotentials von *An. stephensi* bei der Übertragung der urbanen Malaria in Asien führte dessen Einschleppungsnachweis zur raschen

Implementierung effektiver Präventions- und Eradikationsmaßnahmen gegen die wieder eingeschleppte Population in Sri Lanka (Dharmasiri et al. 2017).

Im Jahr 2016 traten erstmals *P. vivax*-Fälle mit einer bemerkenswert hohen Infektionsrate von 16,7 % in Bezug zu allen laborbestätigten Malariaerkrankungen in Dschibuti auf (WHO 2017b). Bereits in 2017 erhöhte sich dieser Prozentsatz rapide auf 36,7 % (unveröffentlichte Daten) und weist auf eine in der Region bislang unbekannte, aber sehr effektive autochthone Übertragung von *P. vivax* hin. Obwohl eine Studie bereits im Jahr 2002 eine Seroprävalenz von *P. vivax* von 17,5 % innerhalb der dschibutischen Bevölkerung aufzeigte, fand in der Vergangenheit dennoch keine nachweisbare lokale Übertragung statt (Khairah et al. 2012). Trotz der seit langem vorhandenen Humanreservoir für *P. vivax* fand eine Übertragung dieses Erregers durch *An. arabiensis* offensichtlich nicht statt. Erst kürzlich konnte bestätigt werden, dass sich dieser aus Flachlandhabitaten Äthiopiens bekannte Primärvektor für *P. falciparum* (Daygena et al. 2017) als ebenfalls suszeptibel für *P. vivax* im Hochland Zentraläthiopiens zeigte (Abduselam et al. 2016).

Bislang wurde Malaria in Afrika südlich der Sahara nahezu ausschließlich auf *P. falciparum* zurückgeführt (Howes et al. 2015). Hauptargument hierfür ist, dass das Duffy-Blutgruppenantigen, der einzige bislang bekannte Rezeptor für eine *P. vivax* Infektion auf der Erythrozytenmembran, in der Mehrheit der Bevölkerung südlich der Sahara nicht vorkommt. Neuere Studien liefern deutliche Hinweise darauf, dass eine autochthone Übertragung von *P. vivax* regelmäßig im benachbarten Äthiopien und Eritrea stattfindet (Howes et al. 2015). Mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie ergeben sich Beweise dafür, dass eine durch *An. stephensi* verursachte *P. vivax*-Transmission seit 2016 im dschibutischen Tiefland auftritt. Ein besonderer Hinweis darauf ist die Detektion von *P. falciparum* / *P. vivax*-doppelinfizierten weiblichen Stechmücken im Jahre 2017 in Dschibuti-Stadt. Der abrupte Anstieg von Malariafällen sowie die rapide Veränderung der Zusammensetzung der endemischen Malariaspezies wurde durch das Auftreten laborbestätigter Malariafälle von im Camp Lemonnier stationiertem US Militär bestätigt (AFHSB 2016; 2017, 2018).

Obwohl die aus Dschibuti und Äthiopien asservierten *An. stephensi*-Stämme nach genomischer mtDNA-Analyse des Gens der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase

(COI-Barcoding-Sequenzen) sowie der rDNA des „internal transcribed spacers 2“ (ITS2) mit anschließendem Bootstrap-Vergleich in zwei nahe verwandte, aber getrennte Cluster eingeordnet werden konnten, sind die Sequenzanalysen beider *An. stephensi*-Populationen identisch mit zwei in Pakistan heimischen Stämmen (Faulde et al. 2014; Carter et al. 2018).

Bis heute ist unklar, ob diese genomisch leicht unterschiedlichen Stämme von *An. stephensi* über eine einzige Route ans Horn von Afrika gelangt sind, oder ob eine Mehrfacheinschleppung über verschiedene Transportwege Ursache für die derzeitige geographische Expansion dieser invasiven Art war.

Da die Suszeptibilität für verschiedene *P. falciparum*- und *P. vivax*-Stämme bei den unterschiedlichen *An. stephensi*-Subpopulationen deutlich variieren kann (Hume et al. 2007), sind weitere Untersuchungen zur ihrer Transmissionseffizienz erforderlich, um das Vektorpotenzial dieser Spezies für pathogene *Plasmodium*-Arten in Afrika zu charakterisieren.

Nach dem Wiederauftreten von *An. stephensi* im Dezember 2016 in Sri Lanka, einem bis dato als malariafreie Zone zertifiziertem Land, fanden umgehend intensive Überwachungs- und Eradikationskampagnen gegen diese Mückenspezies statt. Diese Maßnahmen dienen sowohl zur Prävention einer Rekolonisierung von *An. stephensi* als auch zur Verhinderung einer Reendemisierung der Malaria in Sri Lanka (Dharmasiri et al. 2017). In Anbetracht der extrem negativen Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit betroffener Regionen nach geografischer Ausbreitung synanthroper *An. stephensi*-Populationen, welche in der Lage sind, vor allem im urbanem Bereich sowohl *P. falciparum* als auch *P. vivax* gleichzeitig zu übertragen, wird der zeitnahe Einsatz optimaler multinationaler Vektorüberwachungs- und -bekämpfungsprogramme sowohl für die Region am Horn von Afrika als auch für den gesamten, durch Invadierung mit *An. stephensi* bedrohten, afrikanischen Kontinent dringend empfohlen.

1.5 Zusammenfassung

Die asiatische Malariamücke, *Anopheles stephensi*, ist ein bekannter und bedeutender Hauptvektor von *Plasmodium falciparum* und *P. vivax*. Bis 2013 war ihre geographische Verbreitung auf Zentral- und Südasien, einschließlich der Arabischen Halbinsel, beschränkt. Im Jahre 2012 in der Region am Horn von Afrika (HoA) erstmals entdeckt, wurde *An. stephensi* mit einem geographisch und zeitlich ungewöhnlichen Ausbruch der städtischen *P. falciparum* Malaria in Verbindung gebracht. 2016 wurde *An. stephensi* schließlich auch in der benachbarten Region Somali in Äthiopien nachgewiesen. Um nachzuweisen, ob sich *An. stephensi*-Populationen in Dschibuti seit Erstbeschreibung in 2014 ausgebreitet und dort zu einem ungewöhnlichen Anstieg der Malariafälle beigetragen haben, wurden a) von Januar 2013 bis Dezember 2017 eine kontinuierliche Vektorüberwachung mit Analyse aller abundanten Anophelesspezies durchgeführt, b) die saisonale Populationsdynamik von *An. stephensi* und deren Bionomie untersucht, c) die vorhandene Literatur zu Analyse und Vorkommen der Malaria in Dschibuti seit 2013 analysiert und d) untersucht, ob und in welchem Umfang *An. stephensi* zur autochthonen Übertragung der Malaria beigetragen hat, indem der Nachweis des für den Menschen infektiösen Sporozitenstadiums durch Detektion des Circumsporozoiten-Antigens von *P. falciparum* und *P. vivax* in weiblichen Anophelesmücken erbracht wurde.

Anopheles stephensi wurde als einzige abundante Malariamückenspezies an den Monitoringsstandorten nachgewiesen. Von 2013 bis 2016 beschränkte sich die saisonale Aktivität von *An. stephensi* in Dschibuti-Stadt hauptsächlich auf die (für dortige Verhältnisse) kalte und feuchte Jahreszeit zwischen September und Mai, wobei in den Sommermonaten Juni bis August entweder keine, oder nur selten Exemplare detektiert wurden. Im Gegensatz dazu wurde in 2017 diese Stechmückenspezies das ganze Jahr über, einschließlich der extrem heißen Sommermonate von Juni bis August, nachgewiesen. Diese saisonale Aktivitätsveränderung deutet darauf hin, dass sich die *An. stephensi*-Population an ihre neuen klimatischen und ökologischen Lebensbedingungen in Dschibuti adaptiert hat und damit ihre weitere Ausbreitung vor allem innerhalb städtischer Gebiete erleichtert wurde. Unter den 96 weiblichen auf Malaria-Infektion untersuchten *An. stephensi*, waren drei (3,1 %) positiv für *P. falciparum*

Circumsporozoiten-Antigen, einschließlich einer (1 %) *P. falciparum* / *P. vivax* VK 210 Doppelinfektion. Nach dem überraschenden, epidemischen Wiederauftreten der Malaria in 2013 mit 1.684 bestätigten Fällen stiegen die Malariafälle kontinuierlich an und erreichten 2017 mit 14.810 einen bisherigen Höchststand. Bis 2016 traten ausschließlich Fälle von Malaria tropica auf. In 2016 konnte erstmals *P. vivax*-Malaria mit einer überraschend hohen Prävalenz von 16,7 % (2.041/13.804) aller Malariafälle diagnostiziert werden. Dieser Anteil stieg im Jahr 2017 auf 36,7 % (5.441/14.810) an. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einerseits, dass sich die Dynamik der Malariaerkrankungen in Dschibuti derzeit schnell verändert, und andererseits, dass *An. stephensi* an der gleichzeitigen Übertragung von *P. falciparum* und *P. vivax* mit Doppelinfektionen beteiligt ist. In Anbetracht der extrem hohen potenziellen Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit wird daher der zeitnahe Einsatz optimaler multinationaler Vektorüberwachungs- und -steuerungsprogramme sowohl für die Region am Horn von Afrika als auch für den gesamten afrikanischen Kontinent dringend empfohlen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Appel KE, Gundert-Remy U, Fischer H, Faulde M, Mross KG, Letzel S, Rossbach B. Risk Assessment of Bundeswehr (German Federal Armed Forces) Permethrin-impregnated battle dress uniforms (BDU). Int J Hyg Environ Health 2008; 211: 88-104

Abduselam, N., Zeynudin, A., Berens-Riha, N., Seyoum, D., Pritsch, M., Tibebe, H., Eba, K., Hoelscher, M., Wieser, A., Yewhalaw, D., 2016. Similar trends of susceptibility in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles pharoensis* to *Plasmodium vivax* infection in Ethiopia. Parasit. Vectors 9, 552

Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC), 2012. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2011. Medical Surveillance Monthly Report. 19, 2-6

Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC), 2013. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2012. Medical Surveillance Monthly Report. 20(1), 2-5

- Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC), 2014. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2013. Medical Surveillance Monthly Report. 21(1), 2-7
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB), 2015. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2014. Medical Surveillance Monthly Report. 22(1), 2-6
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB), 2016. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2015. Medical Surveillance Monthly Report. 23(1), 2-6
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB), 2017. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2016. Medical Surveillance Monthly Report. 24(1), 2-7
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB), 2018. Update: Malaria, U.S. Armed Forces, 2017. Medical Surveillance Monthly Report. 25(2), 2-7
- Asmare, Y., Hill, S.R., Hopkins, R.J., Tekie, H., Ignell, R., 2017. The role of grass volatiles on oviposition site selection by *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coluzzii*. Malar. J. 16, 65
- Bangs, M., Rusmiarto, S., Gionar, Y.R., Chan, A.S.T., Dave, K., Ryan, J.R., 2002. Evaluation of a dipstick malaria sporozoite panel assay for detection of naturally infected mosquitoes. J. Med. Entomol. 39, 324-330
- Carter, T.E., Yared, S., Gebresilassie, A., Bonnell, V., Damodaran, L., Lopez, K., Ibrahim, M., Mohammed, S., Janies, D., 2018. First detection of *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Diptera: Culicidae) in Ethiopia using molecular and morphological approaches. Acta Trop. 188, 180-186
- Das, B.P., Rajagopal, R., Akiyama, J., 1990. Pictorial key to the species of Indian anopheline mosquitoes. Zoology 2, 131-162
- Daygena, T.Y., Massebo, F., Lindtjørn, B., 2017. Variation in species composition and infection rates of *Anopheles* mosquitoes at different altitudinal transects, and the risk of malaria in the highland of Dirashe Woreda, south Ethiopia. Parasit. Vectors 10, 343
- de Pécoulas, P.E., Tahar, R., Quatas, T., Mazabraud, A., Basco, L.K., 1998. Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene

and their relationship with pyrimethamine resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 265-273

Dharmasiri, A.G.G., Perera, A.Y., Harishchandra, J., Herath, H., Aravindan, K., Jayasooriya, H.T.R., Ranawaka, G.R., and Hewavitharane, M., 2017. First record of *Anopheles stephensi* in Sri Lanka: a potential challenge for prevention of malaria reintroduction. *Malar. J.* 16, 326

Dida, G.O., Anyona, D.N., Abuom, P.O., Akoko, D., Adoka, A.O., Matano, A.-S., Owuor, P.O., Ouma, C., 2018. Spatial distribution and habitat characterization of mosquito species during the dry season along the Mara River and its tributaries, in Kenya and Tanzania. *Infect. Dis. Poverty* 7(1), 2

Faulde, M.K., Ahmed, A.A., 2010. Haematophageous vector monitoring in Djibouti City from 2008 to 2009: First records of *Culex pipiens* ssp. *torridus* (IGLISCH), and *Anopheles sergentii* (Theobald). *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 40, 281-294

Faulde, M.K., Spiesberger, M., Abbas, B., 2012. Sentinel-site-enhanced near-real time surveillance documenting West Nile virus circulation in two *Culex* mosquito species indicating different transmission characteristics, Djibouti City, Djibouti. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 42, 461-474

Faulde, M.K., Rueda, L.M., Khairah, B.A., 2014. First record of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* and its possible role in the resurgence of malaria in Djibouti, Horn of Africa. *Acta Trop.* 139, 39-43

Gillies, M.T., Coetzee, M., 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg, South Africa, 1-147

Glick, J.I., 1992. Illustrated key to the female *Anopheles* of southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 24, 125-153

Howes, R.E., Reiner Jr., R.C., Battle, K.E., Longbottom, J., Mappin, B., Ordanovich, D., Tatem, A.J., Drakeley, C., Gething, P.W., Zimmermann, P.A., Smith, D.L., Hay, S.I., 2015. *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(11), e0004222

Hume, J.C.C., Tunnicliff, M., Ranford-Cartwright, L.C., Day K.P., 2007. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 6, 139

Khaireh, B.A., Briolant, S., Pascual, A., Mokrane, M., Machault, V., Travaillé, C., Khaireh, M.A., Farah, I.H., Ali, H.M., Abdi, A.-I.A., Ayeh, S.N., Darar, H.Y., Ollivier, L., Waiss, M.K., Bogreau, H., Rogier, C., Pradines, B., 2012. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in the Republic of Djibouti: evaluation of their prevalence and potential determinants. *Malar. J.* 11, e395

Khaireh, B.A., Assefa, A., Guessod, H.H., Basco, L.K., Khaireh, M.A., Pascual A., Briolant, S., Bouh, S.M., Farah, I.H., Ali, H.M., Abdi, A.-I.A., Aden, M.O., Abdillahi, Z., Ayeh, S.N., Darar, H.Y., Koeck, J.-L., Rogier, C., Pradines, B., Bogreau, H., 2013. Population genetics analysis during elimination process of *Plasmodium falciparum* in Djibouti. *Malar. J.* 12, 201

Nina, P.B., Mohanty, A. K., Ballav, S., Vernekar, S., Bhinge, S., D'souza, M., Walke, J., Manoharan, S.K., Mascarenhas, A., Gomes, E., Chery, L., Valecha, N., Kumar, A., Rathod, P.K., 2017. Susceptibility of wild and colonized *Anopheles stephensi* to *Plasmodium vivax* infection. *Malar. J.* 16, 284

Ollivier, L., Nevin, R.L., Darar, H.Y., Bougere, J., Saleh, M., Gidenne, S., Maslin, J., Anders, D., Decam, C., Todesco, A., Khaireh, B.A., Ahmed, A.A., 2011. Malaria in the Republic of Djibouti, 1998-2009. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 554-559

Rodier, G.R., Parra, J.P., Kamil, M., Chakib, S.O., Cope, S.E., 1995. Recurrence and emergence of infectious diseases in Djibouti city. *Bull. World Health Organ.* 73, 755-759

Rogier, C., Pradines, B., Bogreau, H., Koeck, J.-L., Kamil, M.-A., Mercereau-Puijalon, O., 2005. Malaria epidemic and drug resistance, Djibouti. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 317-321

United Nations, 2013. Djibouti: Appel global – Revue à mi-parcours 2013. Download 02. Juli 2018. Online: <https://www.humanitarianresponse.info/fr/programme-cycle/space/document/revue-%C3%A0-mi-parcours-de-lappel-global-pour-djibouti-2013>

Walter Reed Biosystematics Units (WRBU), 2012. Vector identification resources. Download 25. Oktober 2012. Online: http://www.wrbu.org/keys/CP_AN_A/Anopheles_W_Palearc_CENTCOM_A.html

WHO, 2012. World malaria report 2011. Online: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf

WHO, 2013. World malaria report 2012. Online: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/

WHO, 2014a. A global brief on vector-borne diseases. Online: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111008/1/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf

WHO, 2014b. World malaria report 2013. Online: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/

WHO, 2015. World malaria report 2014. Online: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>

WHO, 2016. World malaria report 2015. Online: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>

WHO, 2017a. Global vector control response 2017–2030. Online: http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030.pdf


WHO, 2017b. World malaria report 2016. Online: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>

Wilson, M.L., Krogstad, D.J., Arinaitwe, E., Arevalo-Herrera, M., Chery, L., Ferreira, M.U. Ndiaye, D., Mathanga, D.P., Eapen, A., 2015. Urban malaria: understanding its epidemiology, ecology, and transmission across seven diverse ICEMR network sites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93 Supplement 3, 110–123

World Factbook, 2018. Djibouti. World Factbook, CIA, USA, June 07, 2018. Download 22. Juni 2018. Online: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/dj.html>



Five years following first detection of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Djibouti, Horn of Africa: populations established—malaria emerging

Marco Seyfarth¹ · Bouh A. Khaireh^{2,3} · Abdoulilah A. Abdi⁴ · Samatar M. Bouh⁵ · Michael K. Faulde^{6,7} 

Received: 9 October 2018 / Accepted: 10 January 2019 / Published online: 22 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*, is a well-known and important vector of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. Until 2013, its geographical distribution was confined to central and southern Asia including the Arabian Peninsula. In the Horn of Africa (HoA) Region, *An. stephensi* was first recorded from Djibouti in 2012, when it was linked geographically and temporally with an unusual outbreak of urban *P. falciparum* malaria. In 2016, *An. stephensi* was detected in the neighbouring Somali Region of Ethiopia. In order to determine whether *An. stephensi* populations have become established in Djibouti and contributed to the unusual rise in local malaria cases there, we carried out continuous vector surveillance from January 2013 to December 2017, investigated seasonal changes in *An. stephensi* population densities and bionomics, analysed available literature describing malaria in Djibouti since 2013, and investigated whether *An. stephensi* may have contributed to local malaria transmission by detecting circumsporozoite antigen of *P. falciparum* and *P. vivax* in female anophelines. From 2013 to 2016, seasonal activity of *An. stephensi* in urban Djibouti City primarily occurred during the colder, wetter season between September and May, with either no or rare trap catches from June to August. Unlike past years, this species was detected year-round, including the extremely hot summer months of June to August 2017. This change in seasonal occurrence may indicate that *An. stephensi* populations are adapting to their new environment in sub-Saharan Africa, facilitating their spread within Djibouti City. Among the 96 female *An. stephensi* investigated for malaria infectivity, three (3.1%) were positive for *P. falciparum* circumsporozoite antigen, including one *P. falciparum*/*P. vivax* VK 210 double infection. Subsequent to the unusual resurgence of local malaria in 2013, with 1684 confirmed cases reported for that year, malaria case numbers increased continuously, peaking at 14,810 in 2017. Prior to 2016, only *P. falciparum* malaria cases had been reported, but in 2016, autochthonously acquired *P. vivax* malaria cases occurred for the first time at a rate of 16.7% among all malaria cases recorded that year. This number increased to 36.7% in 2017. Our data indicate that the dynamics of malaria species in Djibouti is currently changing rapidly, and that *An. stephensi* can be involved in the transmission of both *P. falciparum* and *P. vivax*, simultaneously. Considering the extremely high potential impact of urban malaria on public health, the timely deployment of optimal multinational vector surveillance and control programs against *An. stephensi* is strongly recommended, not only for the HoA Region, but for the entire African continent.

Keywords *Anopheles stephensi* · Invasive species · Malaria · Outbreak · *Plasmodium falciparum* · *Plasmodium vivax*

Section Editor: Helge Kampen

✉ Michael K. Faulde
MichaelFaulde@bundeswehr.org

¹ Bundeswehr Medical Office, Office of the Surgeon General, Koblenz, Germany

² Solidar Health, Public Health and Development Research Center, 10 Boulevard de la République, BP 1000 Djibouti, Republic of Djibouti

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Djibouti, BP 1906, 12 Rue de l'École de Médecine, Djibouti, Republic of Djibouti

⁴ President Health Advisor, Cabinet of the President, Republic of Djibouti and Directorate, Djiboutian Armed Forces Health Service, Djibouti City, Republic of Djibouti

⁵ Director Health Information System, Ministry of Health, Djibouti City, Republic of Djibouti

⁶ Department XXI B, Section Medical Entomology/Zoology, Bundeswehr Central Hospital, PO Box 7460, D-56064 Koblenz, Germany

⁷ Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, University Clinics Bonn, 53105 Bonn, Germany

Introduction

To date, the World Health Organization (WHO) has identified 11 major global vector-borne human diseases causing 700,000 deaths annually, or approximately 17% of the estimated total burden of infectious diseases worldwide (WHO 2017a). Among mosquito-borne diseases, 60% are attributable to malaria, which together account for almost 96% of deaths (WHO 2017a). With an estimated 447,860 fatal cases annually, malaria is still the deadliest mosquito-borne disease on earth (WHO 2017a). Especially in sub-Saharan Africa, endemic anthropophilic and endophagic anopheline mosquitoes are currently the greatest vector-borne disease threat (WHO 2014a).

Despite the promising results of the WHO Roll Back Malaria Programme (WHO 2017a), multiple factors, including climatic and environmental changes, migrations of human malaria reservoirs, and/or the global spread of invasive anopheline vector species, are likely to negatively influence future malaria elimination efforts. One recent worrying event was the introduction of the primary Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Liston) into Africa, where this species was reported in Djibouti, near the Somali border, for the first time in 2012, followed by its appearance in Djibouti City in early 2013 (Faulde et al. 2014) and in the nearby Somali Region of Ethiopia in 2016 (Carter et al. 2018).

Located at a latitude of 43° 00' E and a longitude of 11° 30' N in the Gulf of Aden Region on the Horn of Africa (HoA), Djibouti is a small, arid country with a rugged, volcanic topography, hypersaline soils, and an estimated population of 865,000 (World Factbook 2018). More than 70% of the country's people live in Djibouti City, which is densely urbanised. Historically, increases in the number of malaria cases in Djibouti City were observed during the 1970s and 1980s due to increased human settlement and expanded irrigation (Rodier et al. 1995). *Anopheles arabiensis* (Patton) had previously been identified as the primary malaria vector, and almost all cases were due to *Plasmodium falciparum*, with only sporadic cases of *Plasmodium vivax* (de Pécoulas et al. 1998), although a 2002 study revealed considerable human reservoir activity of *P. vivax*, with a mean seroprevalence rate of 17.5% (Khairah et al. 2012). Since most African populations do not express the Duffy blood group antigen, as yet the only known *P. vivax* parasite receptor, the low clinical incidence rate in sub-Saharan Africa resulted in the perception that this type of malaria occurs there only sporadically or is completely absent (Howes et al. 2015). However, a recent study provided conclusive evidence of *P. vivax* transmission in this region, with a focus in Ethiopia (Howes et al. 2015).

Malaria in Djibouti has been categorised as meso- to hypo-endemic, with unstable transmission. The country's last malaria epidemic occurred between March and June 1999, following an intense rainy season that caused severe floods (Rogier et al. 2005). Thereafter, the malaria incidence rate

dropped to < 1/1000 persons/year (Ollivier et al. 2011). At that time, 100% of all registered malaria cases were caused by *P. falciparum* and vectored by *An. arabiensis* (WHO 2012), and favourable conditions for malaria eradication had been established for Djibouti, with the goal of entering the malaria pre-elimination phase (Khairah et al. 2013). Continuous vector surveillance, carried out since 2008 primarily at military sites and on embassy-owned properties in Djibouti City, revealed almost no anopheline vector activity year-round (Faulde and Ahmed 2010).

In September 2012, *An. stephensi*, an important and effective vector of urban malaria in India and the Persian Gulf area, was recorded for the first time on the African continent (Faulde et al. 2014). Following its initial detection at the Djibouti animal export and quarantine station, located approximately 14 km from Djibouti City and 4 km from the Somali border, *An. stephensi* specimens were trapped in February 2013 in areas of Djibouti City (Faulde et al. 2014). Beginning in late February 2013, autochthonous *P. falciparum* malaria cases were reported in increasing frequency from urban quarters of Djibouti City. Cases there peaked in April, and the outbreak ended in late May 2013 (United Nations 2013). Mosquito surveillance carried out at that time revealed that (a) *An. stephensi* had expanded its range within the urban areas of Djibouti City between 2013 and early 2014, and (b) *P. falciparum* circumsporozoite antigen was present in five of 36 *An. stephensi* females which were trapped near the living places of malaria patients (Faulde et al. 2014). These data strongly suggested that *An. stephensi* had become involved in malaria transmission in Djibouti.

The current malaria situation in Djibouti remains unclear, and published data describing the evolution and characteristics of malaria there are very sparse for the period after 2013. The purposes of this study are to (a) determine whether *An. stephensi* is still present and has further spread in Djibouti; (b) investigate seasonal changes in *An. stephensi* population densities and bionomics; (c) identify which indigenous anopheline species other than *An. stephensi* are abundant at surveillance locations and possibly contribute to malaria transmission; (d) analyse available literature describing malaria in Djibouti since 2013; and (e) determine whether *An. stephensi* may have contributed to local malaria transmission by detecting circumsporozoite antigen of *P. falciparum* and *P. vivax* in female anophelines.

Materials and methods

Mosquito surveillance and sampling locations

Mosquito vector surveillance was carried out continuously for 3 days each week from January 2012 to December 2017 at defined urban locations in Djibouti City employing standard miniature CDC light traps (model 1012; John W. Hook Co.,

Gainesville, FL, USA) and BG sentinel traps (BioGents AG, Regensburg, Germany) baited with BG-Lure® mosquito attractant. Trap catches were harvested following each 3-day trap run. In Djibouti City, six surveillance locations (SL) at military compounds and at the German Embassy were established as follows: SL 1, Plateau du Héron (43° 09' 01" E; 11° 37' 17" N); SL 2, vicinity of the Sheraton Hotel (43° 09' 29" E; 11° 36' 09" N); SL 3, military airport area I (43° 08' 54" E; 11° 33' 07" N); SL 4, military/civil airport area II (43° 09' 13" E; 11° 33' 11" N); SL 5, military/civil airport area III (43° 09' 01" E; 11° 33' 23" N); SL 6, German Embassy (43° 09' 51" E; 11° 33' 53" N) (Fig. 1).

Identification of anopheline mosquito species

Morphological identification of mosquitoes was carried out using dissecting microscopes at $\times 10$ –100 magnification as well as mosquito identification keys for the HoA Region (Gillies and Coetsee 1987; Das et al. 1990; Glick 1992), including the Walter Reed Biosystematics Unit's (WRBU 2012) online database. Final confirmation of *An. stephensi* was achieved by comparing new catches with voucher specimens trapped in 2013 (Faulde et al. 2014).

Sample preparation and detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* circumsporozoite proteins (CSPs)

Freshly trapped female anopheline mosquitoes, labelled with trap date and location, were stored dry in a refrigerator at -20 °C, subsequently transferred individually to 70% aqueous ethanol in Eppendorf screw vials until further processing and identified morphologically to species prior to malaria CSP testing. The VectorTest® Malaria Sporozoite Antigen Panel Assay, a dipstick ELISA (Vector Test Systems, Inc., Thousand Oaks, CA, USA), was used to detect the specific CSP of *P. falciparum* as well as the *P. vivax* polymorphs VK 210 and VK 247 (Bangs et al. 2002). All female anopheline mosquitoes trapped were investigated individually.

Literature search

Electronic databases, including PubMed, Web of Science, Scopus, the Literature Retrieval System of the US Armed Forces Pest Management Board, Google Scholar, and MEDLINE were searched from 2011 to 2018 using the terms “Djibouti & malaria”, “Djibouti & paludisme”, and “military & Djibouti & malaria”.

Additionally, WHO World Malaria Reports 2011 to 2017 were analysed for Djibouti country malaria reports and profiles (WHO 2012, 2013, 2014b, 2015, 2016, 2017b). Annual malaria data listed in the “presumed and confirmed” columns were extracted. The Medical Surveillance Monthly Reports of

the US Armed Forces Health Surveillance Center/Branch, published between 2011 and 2017, were analysed for reports on malaria in US Armed Forces autochthonously acquired in Djibouti (AFHSC 2012, 2013, 2014; AFHSB 2015, 2016, 2017, 2018). In the HoA Region, US Forces are primarily stationed at Camp Lemonnier, Djibouti City, close to Ambouli International Airport. Malaria data reported for 2017 are exclusively from the Department of Health Information, Ministry of Health, Republic of Djibouti.

Statistical analyses

Values were reported as mean \pm standard deviation (SD). Differences in annual trap indices for *An. stephensi* were computed and compared by a two-sided *t* test at the fifth percentile of significance using the SPSS 8.0 program (SPSS Software GmbH, Munich, Germany).

Results

Between 2013 and 2017, *An. stephensi* was the only anopheline species detected at sentinel sites SL 1 to 6. *Anopheles stephensi* was detected regularly, but at very low densities, between the years 2013 and 2015, but its population density increased starting in 2016 (Fig. 2a). While 30, 11, and 8 specimens were trapped during 2013, 2014, and 2015, constituting mean species trap indices (male and female *An. stephensi* mosquitoes per trap night) of 0.14 ± 0.078 , 0.13 ± 0.097 , and 0.06 ± 0.027 , respectively (Fig. 2b), 46 specimens (trap index 0.47 ± 0.22) were detected in 2016, and 185 (trap index 0.57 ± 0.41) in 2017. Mean trap indices were very low and not significantly different between the years 2013 and 2014 ($p = 0.841$), and 2014 and 2015 ($p = 0.145$), but were significantly different between 2013 and 2015 ($p = 0.0019$). However, a definite increase in *An. stephensi* population density was observed in 2016, and this increase was significant when compared with 2015 ($p < 0.0001$), as was the difference between 2015 and 2017 ($p < 0.0001$), but not between 2016 and 2017 ($p = 0.091$) (Fig. 2a and b). The mean annual female:male ratio of *An. stephensi* was 2.75 in 2013, 1.75 in 2014, 0.33 in 2015, 1.42 in 2016, and 0.52 in 2017. Our data show that *An. stephensi* population, after their establishment in urban areas of Djibouti City and first detection in 2013, has become endemic in the HoA Region at a continually rising population density since 2016.

The annual seasonal activity of *An. stephensi* in urban Djibouti City is depicted in Fig. 3a. While anopheline mosquitoes were detected between 2013 and 2016 primarily during the colder, wetter seasons between September and May, with no or rare trap catches in between, *An. stephensi* could be detected year-round by 2017 (Fig. 3b). Our results reveal a changing seasonal and annual occurrence of *An. stephensi* at

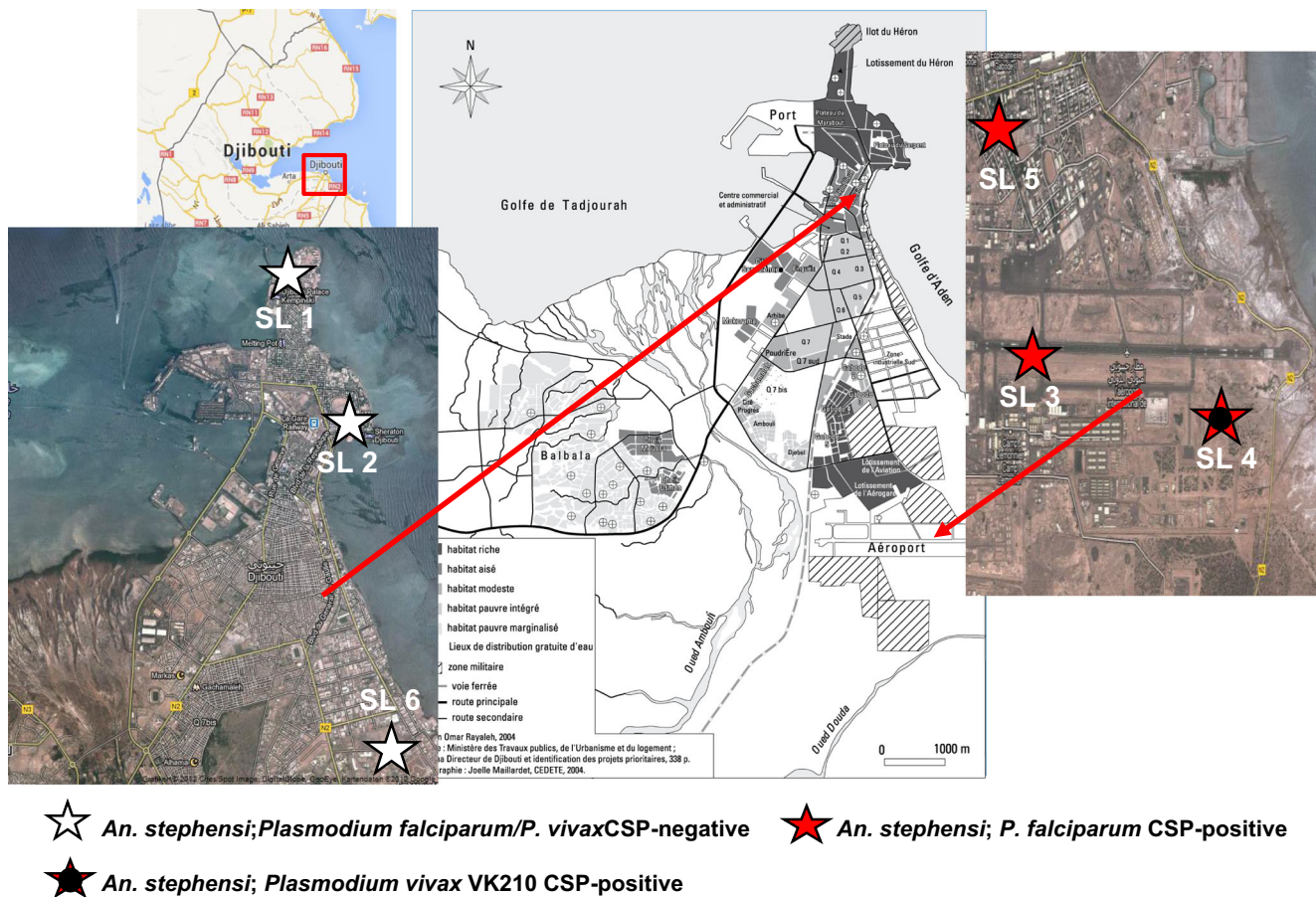


Fig. 1 Overview of vector surveillance locations established in Djibouti since 2012: SL 1, Plateau du Héron; SL 2, vicinity of Sheraton Hotel; SL 3, airport area I (military); SL 4, airport area II (military/civil); SL 5, airport area III (military/civil); SL 6, German Embassy. Maps were accessed at www.google.de/maps and <https://goo.gl/images/NNFztM>.

(White star) *An. stephensi*; *Plasmodium falciparum*/*P. vivax* CSP-negative. (Red star) *An. stephensi*; *P. falciparum* CSP-positive. (Black star with red accent) *An. stephensi*; *Plasmodium vivax* VK210 CSP-positive

the different SLs, and an increasing population density at certain surveillance locations, especially in the vicinity of SL 2.

Malaria data from Djibouti, as gleaned from the limited literature, indicate meso- to hypo-endemic *P. falciparum* malaria associated with a continuous decrease of autochthonously

acquired cases until 2012, when only 27 cases were reported and Djibouti was thought to have entered the malaria pre-elimination phase (Fig. 4). However, concurrent with the 2013 introduction and discovery of *An. stephensi* in Djibouti City, malaria resurged alongside a changing ecology of

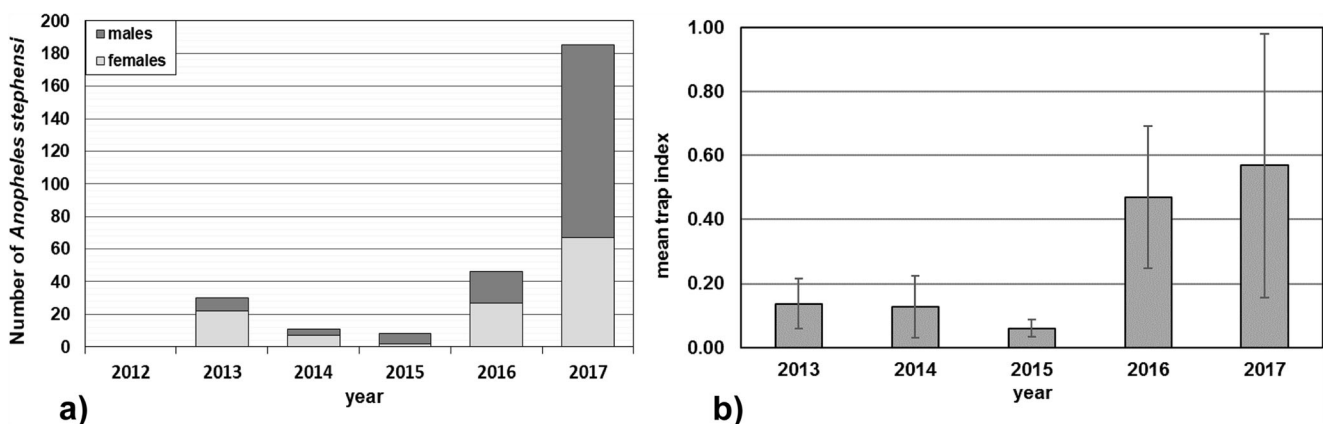


Fig. 2 a Occurrence of *Anopheles stephensi* in Djibouti City as documented by annual trap catch numbers, 2012–2017. b Mean annual trap indices of *Anopheles stephensi* ($\Sigma \text{♀} + \text{♂}/\text{trapnight}$) at the vector surveillance sites in Djibouti City, 2013–2017

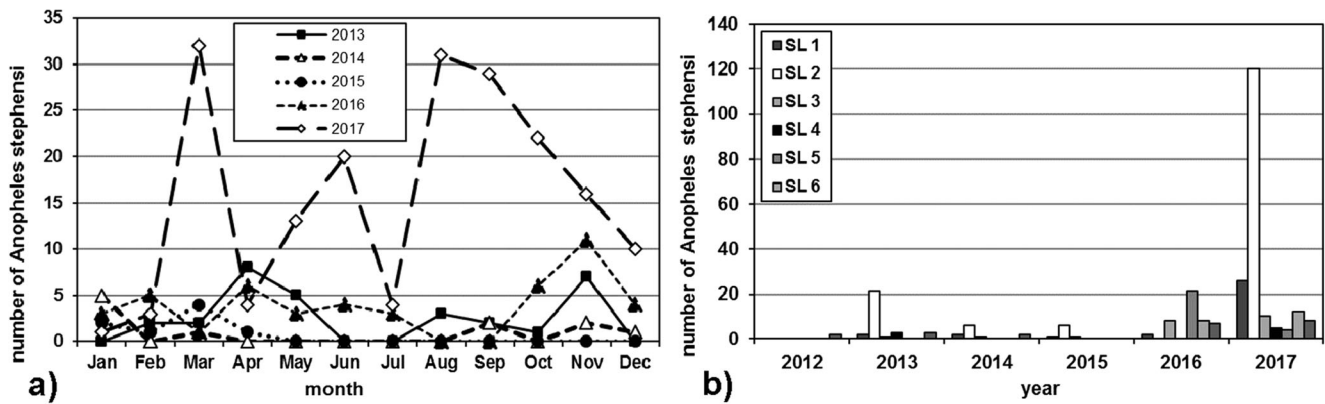


Fig. 3 a Seasonal activity of *Anopheles stephensi* (Σ♀ + ♂) measured by standardised vector surveillance in Djibouti City, 2013–2017. b Spatial distribution of *Anopheles stephensi* at vector surveillance sites SL 1–6, Djibouti City, 2012–2017

autochthonous transmission, and the disease is now prevalent in densely populated urban environments. Annual malaria cases reported by WHO and the Ministry of Health, Republic of Djibouti, rose continuously from 1684 in 2013 to 9439 in 2014, 9557 in 2015, 13,804 in 2016, and 14,810 in 2017. Together, with a change in autochthonously acquired malaria case numbers, a change in the distribution of malaria parasites has recently been observed. Until 2015, only *P. falciparum* malaria was reported to occur in Djibouti City. However, in 2016, *P. vivax* malaria transmission was reported for the first time, and at a remarkably high rate, constituting 16.7% (2041 cases) of all malaria cases, and increasing rapidly to 36.7% (5441 cases) in 2017. According to published reports, autochthonously acquired malaria cases in deployed US military personnel rose from zero during the years 2010 to 2014 to three each year between 2015 and 2017 (AFHSB 2016, 2017, 2018). *Plasmodium vivax* malaria cases have been diagnosed since 2016, with 2 cases that year, and two more cases in 2017.

Of the 96 female *An. stephensi* trapped at SL 1 to SL 6 between 2015 and 2017, three (3.1%) were positive for malaria CSP. Among the positives, one female trapped in February 2017 at SL 3 was *P. falciparum* CSP-positive, a

second caught in March 2017 at SL 5 was also *P. falciparum* CSP-positive, and a third collected in December 2017 at SL 4 was doubly infected with *P. falciparum* and *P. vivax* VK 210 sporozoites. All three CSP-positive *An. stephensi* specimens were trapped in the vicinity of Ambouli Airport.

Discussion

Mosquito surveillance has been carried out in Djibouti City since August 2008, primarily at sites occupied by deployed German Armed Forces (Faulde and Ahmed 2010; Faulde et al. 2012). Before January 2013, no anopheline mosquitoes were detected, with the exception of two female specimens of *An. sergentii* found in 2009 at an airport location corresponding to SL 3 of our study. *Anopheles arabiensis*, the chief local malaria vector, which favours ecological niches such as wadi-like drying streams and rivers, open puddles, and artificial irrigation channels (Dida et al. 2018), was not detected at any of the surveillance sites in this study.

Within the greater Djibouti City area, suitable conditions for endemic anopheline species like *An. arabiensis* have been identified in the past only along the Ambouli River and its delta area in the City's periurban and rural outskirts, but not in the urban quarters where this study's SLs were situated (Ollivier et al. 2011). Ecological conditions in the vicinity of the Ambouli River include vegetation that may positively influence selection of mosquito oviposition sites and strengthen larval fitness during development (Asmare et al. 2017). Consequently, autochthonous malaria transmission and malaria foci were primarily confined to this area (Ollivier et al. 2011). Urban malaria transmission, especially in the privileged quarters chiefly addressed in this study, was not recorded until the appearance of *An. stephensi* in February 2013 (United Nations 2013; Faulde et al. 2014). Unlike *An. arabiensis*, *An. stephensi* typically breeds in a wide variety of artificial containers, such as domestic wells with cemented walls (Faulde et al. 2014; Carter et al. 2018).

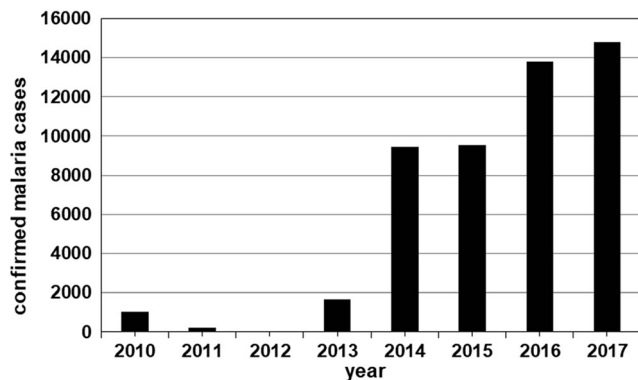


Fig. 4 Annual confirmed malaria cases in Djibouti, according to country reports provided by WHO (published data) and the Ministry of Health, Republic of Djibouti (unpublished data), 2010–2017

Anopheles stephensi is known as an important synanthropic vector of urban malaria in India and the Persian Gulf area and transmits both *P. vivax* and urban *P. falciparum* in different parts of India (Wilson et al. 2015). When compared with *An. gambiae*, one of three principal African vectors of *P. falciparum*, *An. stephensi* shows similar high infection prevalence and susceptibility rates (Hume et al. 2007). Nevertheless, species-specific susceptibility has been shown to be variable among both species, depending on the geographical origin of both the parasite and the mosquito (Hume et al. 2007). The first infectious, *P. falciparum* CSP-positive *An. stephensi* were detected during a survey carried out in Djibouti between 2013 and 2014, demonstrating autochthonous transmission (Faulde et al. 2014). New data originating from our study confirm the involvement of *An. stephensi* in local urban *P. falciparum* transmission. Additionally, it should be borne in mind that infected *An. stephensi* introduced and released by non-disinfected aircraft may contribute to local malaria transmission.

In a malaria-endemic region of western India, high infection rates for *P. vivax* were detected in wild-caught *An. stephensi* (Nina et al. 2017). Djiboutian CSP-ELISA and epidemiological data from this study provide strong evidence that in Djibouti City, *An. stephensi* transmits both *P. falciparum* and urban *P. vivax* malaria simultaneously. The extent to which vector-parasite adaptation processes and ecological and/or climatic changes enhance malaria transmission rates remains to be investigated. But the high vector potential of *An. stephensi* in urban malaria outbreaks, as experienced in India, led to increased prevention measures and eradication efforts following reintroduction of this species in Sri Lanka (Dharmasiri et al. 2017).

In 2016, *P. vivax* cases were reported for the first time from Djibouti, at a remarkably high infection rate of 16.7% of all malaria cases reported by WHO (2017b) and the Djiboutian Ministry of Health (unpublished data). Although a study revealed a *P. vivax* seroprevalence rate of 17.5% within the Djiboutian population as early as 2002 (Khairah et al. 2012), thus indicating that human *P. vivax* malaria reservoirs had long been present, *P. vivax* transmission by the presumed chief malaria vector, *An. arabiensis*, obviously did not play a significant role. Nevertheless, *An. arabiensis*, the recently documented primary vector of *P. falciparum* in the lowlands of neighbouring Ethiopia (Daygena et al. 2017), has also been shown to be susceptible to *P. vivax*, especially in the highlands of central Ethiopia (Abduselam et al. 2016). In the past, malaria in sub-Saharan Africa has been attributed almost exclusively to *P. falciparum* (Howes et al. 2015). The argument for this view was that the Duffy blood group antigen, the only known receptor for *P. vivax* infection, is not present in most

of the sub-Saharan human population. However, new data provide strong evidence that *P. vivax* transmission regularly occurs in Djibouti and neighbouring Ethiopia and Eritrea, all sub-Saharan states (Howes et al. 2015). There is increasing evidence that *An. stephensi*-associated *P. vivax* transmission has occurred in the Djiboutian lowlands since 2016, especially following the detection of a *P. falciparum*/*P. vivax* double-infected female mosquito trapped in Djibouti City in 2017. This abrupt rise in malaria cases and the sudden change in the composition of malaria species has been confirmed by data from US military personnel stationed at Camp Lemonnier, Djibouti City (AFHSB 2016, 2017, 2018).

Although grouped into two different, phylogenetically close clades according to their COI sequence bootstrap values, both the recently detected Ethiopian and the Djiboutian *An. stephensi* strains obviously originated from Pakistani strains (Carter et al. 2018). To date, it remains unclear whether these slightly different strains of *An. stephensi* had entered the HoA Region via a single route or whether they were introduced on different occasions. Because susceptibility to different *P. falciparum* and *P. vivax* strains can vary markedly among different *An. stephensi* strains (Hume et al. 2007), further research on transmission efficacy in the HoA Region is needed, with the goal of understanding this species' vector potential for pathogenic *Plasmodium* species and strains pathogenic to humans in Africa.

Following the December 2016 reappearance of *An. stephensi* in Sri Lanka, a country that had been certified as malaria-free, vigorous surveillance and eradication campaigns against this species, including measures designed to prevent malaria reintroduction, were implemented immediately in the affected areas (Dharmasiri et al. 2017). Considering the extremely high potential public health effects of endemized, rapidly spreading, urban *An. stephensi* populations capable of transmitting *P. falciparum* and *P. vivax*, the timely deployment of optimal multinational vector surveillance and control programmes is strongly recommended for both the HoA Region and the entire African continent.

Acknowledgements The authors thank Ms. Anke Crecelius and Ms. Munar-Herrmann for laboratory support. Thanks are also given to the military personnel involved who assisted in data collection. Dr. Richard G. Robbins, Walter Reed Biosystematics Unit, Department of Entomology, Smithsonian Institution, Washington, DC, helpfully reviewed and commented on an earlier version of our manuscript. This publication represents the thesis of Mr. Marco Seyfarth.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Abduselam N, Zeynudin A, Berens-Riha N, Seyoum D, Pritsch M, Tibebe H, Eba K, Hoelscher M, Wieser A, Yewhalaw D (2016) Similar trends of susceptibility in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles pharoensis* to *Plasmodium vivax* infection in Ethiopia. *Parasit Vectors* 9:552
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB) (2015) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2014. *MSMR*. 22(1):2–6
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB) (2016) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2015. *MSMR*. 23(1):2–6
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB) (2017) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2016. *MSMR* 24(1):2–7
- Armed Forces Health Surveillance Branch (AFHSB) (2018) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2017. *MSMR*. 25(2):2–7
- Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC) (2012) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2011. *MSMR*. 19(1):2–6
- Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC) (2013) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2012. *MSMR*. 20(1):2–5
- Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC) (2014) Update: malaria, U.S. Armed Forces, 2013. *MSMR*. 21(1):2–7
- Asmare Y, Hill SR, Hopkins RJ, Tekie H, Ignell R (2017) The role of grass volatiles on oviposition site selection by *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coluzzii*. *Malar J* 16:65
- Bangs M, Rusmiarto S, Gionar YR, Chan AST, Dave K, Ryan JR (2002) Evaluation of a dipstick malaria sporozoite panel assay for detection of naturally infected mosquitoes. *J Med Entomol* 39:324–330
- Carter TE, Yared S, Gebresilassie A, Bonnell V, Damodaran L, Lopez K, Ibrahim M, Mohammed S, Janies D (2018) First detection of *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Diptera: Culicidae) in Ethiopia using molecular and morphological approaches. *Acta Trop* 188:180–186. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.001>. [Epub ahead of print]
- Das BP, Rajagopal R, Akiyama J (1990) Pictorial key to the species of Indian anopheline mosquitoes. *Zoology* 2:131–162
- Daygena TY, Massebo F, Lindtjorn B (2017) Variation in species composition and infection rates of *Anopheles* mosquitoes at different altitudinal transects, and the risk of malaria in the highland of Dirashe Woreda, South Ethiopia. *Parasit Vectors* 10:343
- de Pécoulas PE, Tahar R, Quatas T, Mazabraud A, Basco LK (1998) Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. *Mol Biochem Parasitol* 92:265–273
- Dharmasiri AGG, Perera AY, Harishchandra J, Herath H, Aravindan K, Jayasooriya HTR, Ranawaka GR, Hewavitharane M (2017) First record of *Anopheles stephensi* in Sri Lanka: a potential challenge for prevention of malaria reintroduction. *Malar J* 16:326
- Dida GO, Anyona DN, Abuom PO, Akoko D, Adoka AO, Matano A-S, Owuor PO, Ouma C (2018) Spatial distribution and habitat characterization of mosquito species during the dry season along the Mara River and its tributaries, in Kenya and Tanzania. *Infect Dis Poverty* 7(1):2
- Faulde MK, Ahmed AA (2010) Haematophageous vector monitoring in Djibouti City from 2008 to 2009: first records of *Culex pipiens* ssp. *torridus* (IGLISCH), and *Anopheles sergentii* (Theobald). *J Egypt Soc Parasitol* 40:281–294
- Faulde MK, Spiesberger M, Abbas B (2012) Sentinel-site-enhanced near-real time surveillance documenting West Nile virus circulation in two *Culex* mosquito species indicating different transmission characteristics, Djibouti City, Djibouti. *J Egypt Soc Parasitol* 42:461–474
- Faulde MK, Rueda LM, Khareh BA (2014) First record of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* and its possible role in the resurgence of malaria in Djibouti, Horn of Africa. *Acta Trop* 139:39–43
- Gillies MT, Coetzee M (1987) A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg, South Africa, pp 1–147
- Glick JI (1992) Illustrated key to the female *Anopheles* of southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 24:125–153
- Howes RE, Reiner RC Jr, Battle KE, Longbottom J, Mappin B, Ordanovich D, Tatem AJ, Drakeley C, Gething PW, Zimmermann PA, Smith DL, Hay SI (2015) *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 9(11):e0004222
- Hume JCC, Tunnicliff M, Ranford-Cartwright LC, Day KP (2007) Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 6:139
- Khareh BA, Briolant S, Pascual A, Mokrane M, Machault V, Travaillé C, Khareh MA, Farah IH, Ali HM, Abdi A-IA, Aye SN, Darar HY, Ollivier L, Weiss MK, Bogreau H, Rogier C, Pradines B (2012) *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in the Republic of Djibouti: evaluation of their prevalence and potential determinants. *Malar J* 11:e395
- Khareh BA, Assefa A, Guessod HH, Basco LK, Khareh MA, Pascual A, Briolant S, Bouh SM, Farah IH, Ali HM, Abdi A-IA, Aden MO, Abdillahi Z, Aye SN, Darar HY, Koeck J-L, Rogier C, Pradines B, Bogreau H (2013) Population genetics analysis during elimination process of *Plasmodium falciparum* in Djibouti. *Malar J* 12:201
- Nina PB, Mohanty AK, Ballav S, Vernekar S, Bhinge S, D'souza M, Walke J, Manoharan SK, Mascarenhas A, Gomes E, Chery L, Valecha N, Kumar A, Rathod PK (2017) Susceptibility of wild and colonized *Anopheles stephensi* to *Plasmodium vivax* infection. *Malar J* 16:284
- Ollivier L, Nevin RL, Darar HY, Bougere J, Saleh M, Gidenne S, Maslin J, Anders D, Decam C, Todesco A, Khareh BA, Ahmed AA (2011) Malaria in the Republic of Djibouti, 1998–2009. *Am J Trop Med Hyg* 85:554–559
- Rodier GR, Parra JP, Kamil M, Chakib SO, Cope SE (1995) Recurrence and emergence of infectious diseases in Djibouti city. *Bull World Health Organ* 73:755–759
- Rogier C, Pradines B, Bogreau H, Koeck J-L, Kamil M-A, Mercereau-Puijalon O (2005) Malaria epidemic and drug resistance, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 11:317–321
- United Nations (2013) Djibouti: Appel global – Revue à mi-parcours 2013. [accessed 2018 July 02]. Available from <https://www.humanitarianresponse.info/fr/programme-cycle/space/document/revue-%C3%A0-mi-parcours-de-lappel-global-pour-djibouti-2013>
- Walter Reed Biosystematics Units (WRBU) (2012) Vector identification resources. [accessed 2012 Oct 25]. Available from http://www.wrbu.org/keys/CP_AN_A/Anopheles_W_Palearc_CENTCOM_A.html
- WHO (2012) World malaria report 2011. Available from http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf. Accessed 21 Aug 2018
- WHO (2013) World malaria report 2012. Available from http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/. Accessed 21 Aug 2018
- WHO (2014a) A global brief on vector-borne diseases Available from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111008/1/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf. Accessed 07 Aug 2018

- WHO (2014b) World malaria report 2013. Available from http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/. Accessed 21 Aug 2018
- WHO (2015) World malaria report 2014. Available from <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. Accessed 21 Aug 2018
- WHO (2016) World malaria report 2015. Available from <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>. Accessed 21 Aug 2018
- WHO (2017a) Global vector control response 2017–2030. Available from http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030.pdf. Accessed 07 Aug 2018
- WHO (2017b) World malaria report 2016. Available from <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>. Accessed 21 Aug 2018
- Wilson ML, Krogstad DJ, Arinaitwe E, Arevalo-Herrera M, Chery L, Ferreira MU, Ndiaye D, Mathanga DP, Eapen A (2015) Urban malaria: understanding its epidemiology, ecology, and transmission across seven diverse ICEMR network sites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93(Suppl 3):110–123
- World Factbook (2018) Djibouti. World Factbook, CIA, USA, June 07, 2018. [accessed 2018 June 22]. Available from <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/dj.html>

3. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Doktor Faulde, ohne dessen positive und motivierende Art diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre und der mich damit in die Geheimnisse des wissenschaftlichen Arbeitens eingewiesen hat. Ebenso danke ich dem gesamten Laborteam für die hervorragende Unterstützung.