

2 Patienten und Methoden

2.1 Studienort

Ghana liegt in Westafrika auf einer nördlichen Breite von 5 bis 10° und einer Länge von 0°. Der südliche Küstenbereich des Landes grenzt an den Golf von Guinea. Nachbarstaaten sind Elfenbeinküste, Burkina Faso und Togo. Die Gesamtfläche Ghanas beträgt 238 540 km². Die Bevölkerung, die auf ungefähr 19.7 Millionen geschätzt wird, setzt sich aus verschiedenen ethnischen Gruppen zusammen. Die größte Gruppe bilden die Akan, gefolgt von dem Stamm der Mole-Dagbane, der Ewe, der Ga und kleineren Gruppen. Im Süden des Landes liegt die Hauptstadt Accra an der Küste, 250 km nordwestlich die zweitgrößte Stadt Kumasi. Das Klima ist tropisch; im Süden gibt es zwei Regenzeiten (Mai-Juli und September-Oktober), während im Norden nur eine Regenzeit von Juli bis September vorkommt. Malaria tritt in Ghana hyperendemisch auf mit saisonalen Schwankungen der Transmission. *P. falciparum* ist der vorherrschende Erregertyp, gefolgt von *P. ovale* bzw. *P. malariae* (Konate *et al.*, 1994; Browne *et al.*, 2000). *P. vivax* ist in Westafrika praktisch nicht anzutreffen. Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten wurden am Presbyterian Hospital Agogo, Agogo Ashanti Akim, Ghana erhoben. Das Krankenhaus, welches 1931 von der Baseler Mission gegründet wurde, hat 250 Betten und stellt für ungefähr 132.000 Menschen der Region das wichtigste Zentrum medizinischer Versorgung dar. Die Menschen der Region leben hauptsächlich von der Landwirtschaft.

Abbildung: Karte von Ghana



Das Sternchen markiert den Ort Agogo in der Region Ashanti-Akim.

2.2 Studienrahmen

Die in dieser Arbeit dargestellte Studie wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes des Instituts für Tropenmedizin Berlin, der University of Science and Technology Kumasi und des Presbyterian Hospital Agogo durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der School of Medical Science, University of Science and Technology Kumasi geprüft und genehmigt. Thema des Projektes war Malaria in der Schwangerschaft und im ersten Lebensjahr. Von Januar 2000 bis Januar 2001 wurden insgesamt 893 Mütter und deren Neugeborene untersucht. Die Mütter wurden von einer Hebamme in der lokalen Sprache über Ziele und Bedingungen der Studie aufgeklärt. Ihr Einverständnis zur Teilnahme wurde entweder per Daumenabdruck oder Unterschrift dokumentiert.

2.3 Planung und Verlauf der klinischen Untersuchungen

Die insgesamt 893 für die Studie rekrutierten Mütter stammten alle aus Agogo und Umgebung (Hwidiem, Konongo und umliegende Dörfer). Von August 2000 bis Januar 2001 wurden die Untersuchungen vor Ort von Frau Filiz Karakaya sowie der Verfasserin dieser Arbeit selbständig ausgeführt, soweit es nicht anders vermerkt wird. Zudem wurden die parasitologischen und hämatologischen Bestimmungen vor Ort eigenständig durchgeführt. Darüber hinaus wurden etwa 300 der dieser Arbeit zugrunde liegenden PCR-Analysen durch die Verfasserin vorgenommen. Die Daten für den Zeitraum Januar bis August 2000 wurden freundlicherweise von Dr. med. F. P. Mockenhaupt, Institut für Tropenmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Untersuchung der Mütter

Alle gebärenden Mütter wurden von den Hebammen in der Geburtshilfeabteilung des Agogo Hospitals aufgenommen und untersucht. Größe, Gewicht, Alter, Bildungsstand, Wohnort, Schwangerschaftswoche und die Zahl der vorrausgegangenen Schwangerschaften wurden auf einem Fragebogen festgehalten sowie die Einnahme von Medikamenten gegen Malaria während der Schwangerschaft. Die Temperatur wurde axillär bestimmt und Fieber definiert als Temperatur $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$. Aus der *Vena cubitalis* entnahmen die Hebammen 8 ml Blut, wobei ein Zeitraum von 6 Stunden vor bis 6 Stunden nach der Geburt als Entnahmezeitraum festgelegt wurde. Im Labor wurden die Proben anschließend weiterverarbeitet, nachdem sie maximal 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurden. Probandinnen mit einer

Körpertemperatur von $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ oder einem Hb-Wert von $< 11 \text{ mg/dL}$ wurden einer ärztlichen Behandlung zugeführt.

2.3.2 Untersuchung und Verarbeitung der Plazenta

Entweder direkt nach der Expulsion oder nach maximal 6 Stunden Lagerung im Kühlschrank bei 4°C wurden die Plazenten untersucht. Hierbei wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Ermittlung des Rohgewichtes der Plazenta inklusive Nabelschnur und Amnionhülle.
2. Beurteilung der Plazenta- und Nabelschnurmorphologie, wobei auf Kalkherde, Mekoniumablagerungen, Ödeme und Formanomalien geachtet wurde.
3. Ermittlung der Länge, Breite und Höhe der Plazenta und Messen der Nabelschnur.
4. Gewinnung von Plazentablut: Nach Entfernung von Blutkoageln und oberflächlichen Verunreinigungen wurde parazentral ein 2 cm tiefer und 4 cm langer Schnitt gesetzt. In diesen wurde Blut aus dem Plazentagewebe ausgestrichen, mit einer Injektionsspritze aufgesogen und 2,5 ml in ein EDTA-Röhrchen überführt.
5. Abtrennen von Nabelschnur und Amnionhülle, Ermittlung des Nettogewichtes der Plazenta.
6. Plazentamaterialgewinnung: Für spätere histologische Begutachtung wurden parazentral zwei Gewebeproben mit einer Schere entnommen (2 cm x 2 cm x 2 cm). Zusammen mit zwei Proben der Amnionhülle und zwei Nabelschnurteilen (plazentanah und plazentafern) wurden diese dann in einer 4 % Formalinlösung konserviert und bei Raumtemperatur gelagert. Für molekularbiologische Untersuchungen wurden schließlich von fünf verschiedenen Stellen der Plazenta ungefähr 1 cm^3 große Proben entnommen und in einem Citratröhrchen bei -20°C aufbewahrt.
7. Dokumentierung der Daten auf einem Plazentabegleitbogen des Pathologischen Instituts der Charité zu Berlin.
8. Dekontaminierung der verwendeten Instrumente mit zweimolarer NaOH-Lösung.

2.3.3 Neugeborenenuntersuchung

Jedes Neugeborene wurde direkt nach der Geburt gewogen, sowie die Länge und der Kopfumfang bestimmt. Die Hebammen bestimmten den APGAR- Wert nach einer, fünf und zehn Minuten. Die klinische Untersuchung erfolgte 12 bis 24 Stunden postpartal, anfangs unter Supervision durch die Pädiaterin Dr. C. von Gärtner. Die Körpertemperatur wurde axillär gemessen und das Gestationsalter nach Finnström *et al.* (1977) ermittelt. Hierbei

werden sieben Kriterien zur Beurteilung der Reife herangezogen. Durchsichtigkeit der Haut, Festigkeit des Ohrknorpels, Ausbildung plantarer Hautfalten, Größe des Brustdrüsenkörpers, Ausprägung der Brustwarze, Länge der Daumennägel und Qualität des Kopfhaares werden bewertet und eine Punktzahl von mindestens 7 und höchstens 23 vergeben. Aus der Summe der Punktwerte errechnet sich das Gestationsalter. Schließlich wurden dem Neugeborenen aus dem *Rete venosum dorsalis manus* 2 ml venöses Blut entnommen, in ein EDTA-Röhrchen gefüllt und im Labor verarbeitet. Alle erhobenen Daten wurden auf einem Fragebogen dokumentiert.

2.4 Laboruntersuchungen

2.4.1 Mikroskopische Bestimmung der Parasitämien

Für jede Blutprobe (Mutter, Kind, Plazenta) wurden zwei „Dicke Tropfen“ zur Bestimmung der Parasitämie angefertigt. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden auf zwei Objektträgern vier ungefähr 5 µl fassende Tropfen Blut aufgetragen und auf einer Fläche von ca. 1,5 mm² gleichmäßig verstrichen. Die Präparate wurden luftgetrocknet und einer der Objektträger zu Archivierungszwecken ungefärbt bei Raumtemperatur gelagert. Der zweite „Dicke Tropfen“ wurde unfixiert in 4 % (v/v) Giemsa in Titrisol-Pufferlösung pH 7,2 (von Merck) für 30 Minuten gefärbt. Nach gründlichem Spülen mit Aqua dest. und erneuter Lufttrocknung wurde bei eintausendfacher Vergrößerung das Präparat mit einem Lichtmikroskop (Wilozyt, Will, Wetzlar) und dem Ölimmersionsobjektiv betrachtet. Die Bestimmung der Parasitämien der peripheren venösen Blutproben erfolgte durch Auszählung der asexuellen Parasiten pro mindestens 500 Leukozyten. Aus diesem mikroskopisch ermittelten Wert und der Zahl der Leukozyten/µl kann die Parasitämie (Parasiten/µl Blut) errechnet werden. 10 % der Präparate wurden zufällig ausgewählt und von einem zweiten Untersucher beurteilt. Bei abweichenden Werten erfolgte eine Korrektur des Wertes. Die asexuellen Parasiten der Präparate aus plazentarem Blut wurden auf 100 Blickfeldern ausgezählt und das Vorhandensein von Pigment festgestellt. Anhand dieser Parameter (Parasitämie, Pigment) erfolgte eine Einteilung der Präparate in vier verschiedene mikroskopische Kategorien (Fried *et al.*, 1998a). Eine Kategorie ist jeweils kennzeichnend für ein Stadium der plazentaren Infektion. Diese Einteilung in vier Gruppen basiert auf der von Bulmer *et al.* (1993) entwickelten Klassifikation für histologische Veränderungen bei plazentarer Malaria. Man unterscheidet folgende Stadien:

- A:** keine Infektion: keine Parasiten und kein Pigment nachweisbar;
- B:** chronische/abgelaufene Infektion: keine Parasiten aber Pigment vorhanden;
- C:** akut-chronische Infektion: Parasiten und Pigment vorhanden;
- D:** akute Infektion: kein Pigment, nur Parasiten nachweisbar.

Die Mikroskopie der plazentaren Präparate erfolgte durch Dr. med. F. P. Mockenhaupt. 10% aller Präparate wurden zufällig ausgewählt und von einem zweiten Untersucher beurteilt. Parallel zu den „Dicken Tropfen“ wurden Ausstriche angefertigt. Hierbei wurden ungefähr 5 µl Blut unter Zuhilfenahme eines Objektträgers auf einem weiteren Objektträger ausgestrichen, um eine einschichtige Verteilung der Erythrozyten zu erreichen. Anschließend wurden die Ausstriche für eine Minute in absolutem Methanol fixiert und luftgetrocknet, gefärbt, gespült und abschließend nochmals getrocknet. Die Einteilung nach Bulmer wird im Ergebnisteil dieser Arbeit in modifizierter Form verwendet, um der Bedeutung einer chronischen Infektion für die klinischen Parameter gerecht zu werden. Kategorie B und C werden als Pigment-positive, chronische Infektion zusammengefasst und der Pigment-negativen Gruppe (A und B zusammengefasst) gegenübergestellt.

2.4.2 Bestimmung von Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl und MCV

Ein halbautomatisches Zellzählgerät (HC555, Clinicon, Mannheim) diente der Bestimmung der hämatologischen Parameter. Innerhalb 24 Stunden nach Blutentnahme wurde zuerst ein Messansatz zubereitet. Für diesen wurden 10 ml isotonischer Verdünnungslösung mit 40 µl EDTA-Blut versetzt und sorgfältig gemischt. Aus dieser Lösung wurden erneut 40 µl in 10 ml isotonische Lösung überführt, gemischt und in das Gerät gegeben. Aus diesem Ansatz wurden Erythrozytenzahl, Hämatokrit und MCV bestimmt. Zu der Stammlösung wurden 6 Tropfen Hemoglobin Lysing Reagenz (Clinicon) hinzugefügt und nach erneutem vorsichtigen Mischen ungefähr fünf Minuten stehen gelassen. Die verbleibende Suspension, in der sich nur noch die Leukozytenkerne befanden, wurde nun in das Gerät gegeben und die Leukozytenzahl bestimmt. Bei diesem Gerät werden die Widerstandsänderungen des Stromflusses in einer Flüssigkeit registriert. Ein genau bemessenes Volumen wird durch eine Kapillare definierten Durchmessers gepumpt. Der Widerstand steigt an, sobald Partikel (in diesen Fall Blutzellen) die Kapillare passieren. Wird nun das Volumen der gepumpten Flüssigkeit in Bezug gesetzt zu der Anzahl der Widerstandsänderungen, kann die Zellzahl berechnet werden. Die Größe der Widerstandsänderung wiederum entspricht dem Volumen des passierenden Partikels. Das MCV (mittlere korpuskuläre Volumen) ist der Mittelwert aller Einzelmessungen. Der Hämatokrit, das Gesamtvolumen der Partikel, ergibt sich aus der Addition der

Einzelvolumina. Klimabedingt war eine exakte Bestimmung des Hämoglobingehaltes mit der Zellzählapparatur nicht gegeben. Aus diesem Grund wurde hierfür ein HemoCue Photometer der Firma Angelholm (Schweden) verwendet (Von Schenck *et al.*, 1986). In die vom Hersteller mitgelieferten Küvetten werden jeweils 15 µl Blut aufgesaugt und diese anschließend in das Gerät eingelegt. Die tägliche Kalibrierung und Reinigung der verwendeten Geräte erfolgte nach den Vorgaben des jeweiligen Herstellers.

2.4.3 Extraktion von genomischer DNA aus Blut

Um die DNA der Blutproben bis zu den Laboruntersuchungen in Berlin zu erhalten, wurde von allen EDTA-Blutproben ein stabilisiertes Aliquot angefertigt. Dazu verwendete man 270 µl eines Gemisches aus einem Guanidiniumhydrochlorid enthaltenden Puffers (As 1, Qiagen) und PBS-Puffer (phosphate buffered saline) in dem Verhältnis 2:1 und fügte 90 µl abzentrifugiertes Blutsediment hinzu. In einem Eppendorfröhrchen erfolgte die Lagerung bei 4°C bis zum Transport nach Berlin. Nukleinsäuren haben die Eigenschaft in Anwesenheit der chaotropen Substanz Guanidiniumhydrochlorid an Silikamoleküle zu binden. Beruhend auf dieser Eigenschaft ist es möglich, genomische DNA aus kernhaltigen Zellen zu extrahieren. Zunächst werden durch Einwirkung von Guanidiniumhydrochlorid und Proteinase K die Zellen lysiert. Die nun freien Nukleinsäuren können an Silikamoleküle binden. Im Anschluss an mehrere Waschschrte mit alkoholischen Lösungsmitteln kann dann die Elution der DNA in wässrige Lösung erfolgen (Gillespie & Hardman, 1979). Für die Durchführung wurde des QIAmp Blood Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, wobei das Protokoll des Herstellers bei den Arbeitsschritten berücksichtigt wurde.

Lyse-Puffer (AL):	Wässrige Lösung von Guanidiniumhydrochlorid
Proteinase-K:	Aus Tritirachium album, 1,1 g/ml
Waschpuffer (AW):	Ethanolische Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl
Elutionspuffer (AE):	Wässrige Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl

Bei 56°C wurden die Proben zunächst für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von absolutem Ethanol wurden sie auf eine mit Silika-Filter und Auffanghülse ausgestattete Zentrifugationssäule gegeben (Microspin columns, Quiagen, Hilden). Die Zentrifugation erfolgte für eine Minute bei 8000 UpM. Nach Verwerfung des Filtrats folgten zwei weitere

Waschschritte. Hierbei wurden jeweils 500 µl Waschpuffer zugegeben, dann bei 8000 UpM zentrifugiert und das Eluat verworfen. Durch Hinzufügen von 100 µl Elutionspuffer, Inkubation bei 70°C für 5 Minuten und Zentrifugation bei 8000 UpM für eine Minute wurden die an den Silika-Filter gebundenen Nukleinsäuren eluiert. Mit diesem Verfahren konnten aus 90 µl Blutsediment ungefähr 6 µl genomische DNA gewonnen werden.

2.4.4 Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR: polymerase chain reaction) ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis von DNA-Sequenzen. Durch die zyklische Wiederholung verschiedener Reaktionsschritte wird die nahezu exponentielle Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Abschnittes erreicht. Da eine einzelsträngige DNA für die weiteren Reaktionsschritte notwendig ist, wird zunächst die doppelsträngige DNA bei Temperaturen zwischen 94°C und 99°C denaturiert. Bekannte DNA-Abschnitte des Einzelstranges können nun bei Senkung der Temperatur auf etwa 50°C mit synthetischen Oligonukleotiden (Primer) markiert werden. Diese Primer sind komplementär zu dem zu untersuchenden Einzelstrang, bestehen ungefähr aus 15 bis 25 Basen und flankieren die Zielsequenz. Auf diese Weise entstehen kurze doppelsträngige Sequenzen der DNA, welche die Zielsequenz quasi einrahmen. Eine thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) nutzt diese Abschnitte als Ausgangspunkt. Nach Anheben der Temperatur auf das Synthesoptimum der Polymerase, synthetisiert diese unter Verbrauch von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) einen der Zielsequenz komplementären DNA-Strang. Dieser zyklische Vorgang wird zwischen 25 und 50 mal wiederholt. Die frisch entstandenen DNA-Abschnitte sind nun auch Substrat weiterer Amplifikation, wodurch sich eine exponentielle Vermehrung der Abschnitte ergibt. Am Schluss der Reaktionskette wird nochmals das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase eingestellt, um teilweise synthetisierte Stränge zu komplettieren. Das folgende Protokoll beruht auf der Erstbeschreibung der PCR durch Saiki *et al.* (1985) sowie auf der Anwendung zum diagnostischen Nachweis einer *P. falciparum*-Infektion von Snounou *et al.* (1993). Die benötigten Primer wurden alle nach Vorgabe der Nukleotidsequenz von einem kommerziellen Anbieter (MGW biotech) bezogen.

Verwendete Substanzen:

Taq DNA-Polymerase (Pharmacia):	5000 U/ml
dNTP-Gemisch (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia):	25 mM Deoxyadenosintriphosphat (dATP), 25 mM Deoxycytosintriphosphat (dCTP), 25 mM Deoxythymidintriphosphat (dTTP), 25 mM Deoxyguanidintriphosphat (dGTP)
Reaktionspuffer (Pharmacia):	50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl, pH 9,0

Die Polymerase-Ketten- Reaktion zum Nachweis der Plasmodien wurde als zweischrittiges Verfahren durchgeführt. Der erste Schritt, auch „outer“ genannt, dient der Amplifikation des für die Gattung *Plasmodium* spezifischen Gens (ssrRNA-Gen), das für die Ribonukleinsäure der kleinen Untereinheit der parasitären Ribosomen codiert. In dem folgenden zweiten Schritt wird das entstandene Produkt als Matrize genutzt, um *P. falciparum*-spezifische Abschnitte des ssr-RNA-Gens zu vervielfältigen. Lediglich in der Primersequenz unterscheiden sich die Schritte voneinander. Für die Amplifikation des genusspezifischen Gens wurden die Primer rPUL5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3') und rPUL6 (5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3') verwendet. Die Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 50 µl Reaktionspuffer mit 500 mM dNTP's, 200 nM jeweils für die Primer rPUL5 und rPUL6 und 1,5 U Taq Polymerase. Als Matrize dienten 0,5 µl DNA, entsprechend ca. 50 ng bei einer Konzentration von 100 ng/µl. Als Reaktionsbehältnis wurde ein PCR-Röhrchen mit Stempeldeckel (Sarstedt) verwendet. In einem automatischen PCR-Gerät (Triothermoblock, Biometra) fand die Amplifikation nach folgendem Schema statt:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 5 min
2. 25 Zyklen der Schritte: Denaturierung bei 94°C für 1 min, Primeranlagerung bei 58°C für 2 min, Extension bei 72°C für 2 min
3. Abschließende Extension bei 72° für 5 min

Für die Amplifikation der speziesspezifischen Abschnitte des ssrRNA-Gens wurden 0,5 µl des Reaktionsproduktes genutzt. Der Reaktionsansatz, die Konzentration der eingesetzten Reagenzien und das Temperaturschema entsprachen den Bedingungen, die bei der vorhergehenden Amplifikation des genusspezifischen Gens geherrscht hatten. Für *P. falciparum* wurden die Primer rFAL1 (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT TT-3') und rFal2 (5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3') verwendet.

2.4.5 Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Moleküle mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Aufgrund ihrer Aminogruppen negativ geladene DNA-Fragmente wandern in einem elektrischen Feld bei neutralem pH von der Kathode zur Anode. Wenn dieser Vorgang durch die Poren eines Agarose-Gels stattfindet, werden größere Moleküle stärker in ihrer Mobilität eingeschränkt als kleinere. So ergibt sich eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe. Die Genauigkeit der Methode beim Nachweis kurzkettiger Nukleinsäuren ist umso höher, je größer der Agaroseanteil der Gelmatrix ist, da dieser die Passierbarkeit der Matrix bestimmt. In ultraviolettem Licht fluoreszieren mit Ethidiumbromid interkalierte DNA-Moleküle, so dass durch die Anfärbung des Gels mit dieser Substanz (0,2 µg/ml) die aufgetrennten Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden können. Die Abschätzung der Größe der untersuchten Proben wird durch die parallele Auftrennung von DNA-Standards bekannter Basenpaarlänge ermöglicht. Die Durchführung erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Sharp *et al.* (1973). Verwendete Substanzen:

1x TBE-Laufpuffer:	90 mM Tris-Base (pH 9,0), 90 mM Borsäure, 2 mM Na ² -EDTA, autoklaviert
Blaumarker :	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40 % Glycerol
Ethidiumbromid-Lösung :	10 mg/ml Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim)
DNA-Molekulargewichtsmarker :	VI: 0,25 µg/µl pBR322/HaeIII (HaeIII-geschnittenes Plasmid pBR322) und V: PBR322/Bgl I + pBR322/Hinf I (Boehringer Mannheim)

Zum Nachweis der PCR-Amplifikate wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel verwendet. Für die Herstellung wurden 0,7 g Agarose in 40 ml 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt. 7 µl des PCR-Produktes wurden mit 0,8 µl Blaumarker gemischt und in die Taschen des erkalteten Gels pipettiert. Die Molekulargewichtsmarker wurden zum Vergleich parallel auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Minigelkammer (Biorad) bei einer Spannung von 8 V/cm und einer Dauer von 20 min durchgeführt. Im Anschluss konnten die Banden im durchscheinenden UV-Licht dargestellt und auf Polaroidfotos dokumentiert werden.

2.4.6 Methoden zum Nachweis des Hämoglobin-Typs

Die Quantifizierung der Hämoglobinmoleküle erfolgte mittels der HPLC (engl.: High Performance Liquid Chromatography) nach dem Protokoll von Huisman (1987). Anschließend wurde zur genaueren Auftrennung der Moleküle eine Mikrozonenelektrophorese auf Zellulose-Azetat-Folien durchgeführt (Kohne *et al.*, 1973). Sämtliche Untersuchungen wurden im Hämoglobin-Labor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Ulm, unter der Leitung von Prof. Dr. E. Kohne durchgeführt.

2.5 Statistische Berechnungen

Die statistischen Analysen und Berechnungen wurden anhand der theoretischen Grundlagen der Handbücher von Kreinbrock und Schach (1997) und Kirkwood (1988) durchgeführt. Die verwendeten Programme waren SPSS und Excel (Microsoft).

2.5.1 Assoziationsberechnungen

Die Überprüfung von Assoziationen zwischen Parametern nominaler Merkmalsausprägung erfolgte durch verschiedene Verfahren. Zuerst wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ formuliert. Die Nullhypothese traf zu, wenn die Merkmale voneinander unabhängig waren. War dies nicht der Fall, bestand ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen und die Alternativhypothese wurde formuliert. Anschließend wurden die Häufigkeiten der Merkmalskombinationen in einer Vierfeldertafel analysiert. Es wurde der *Chi*²-Test durchgeführt, wobei tatsächliche mit erwarteten Beobachtungen verglichen werden. Bei zu kleinem Stichprobenumfang, d.h. wenn die Gesamtsumme der Vierfeldertafel weniger als zwanzig betrug oder die kleinste Einzelhäufigkeit kleiner als fünf war, wurde der *Fisher-exact*-Test angewendet. Wurden im *Chi*²-Test signifikante Abweichungen der Häufigkeiten von den zu erwartenden Werten gefunden, wurde die Odds Ratio als Maß der Stärke der Assoziation bestimmt. Sie wird als die Chance verstanden, mit der eine Merkmalsausprägung in einer Stichprobe auftritt. Ebenfalls angegeben wurde ein Konfidenzintervall von 95%.

Assoziationen von normalverteilten stetigen Variablen wurden mit dem Student's t-Test untersucht. Die Mittelwerte von zwei Stichproben wurden verglichen unter Berücksichtigung von zufälligen Schwankungen. Bei stetigen Variablen mit nichtparametrischer Verteilung kam der U-Test nach Mann-Whitney zur Anwendung. Dieser Test basiert auf dem Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben und kann als verteilungsunabhängiges Analog zum parametrischen t-Test verstanden werden. Auch für die beiden letztgenannten Tests wurde als

Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ festgesetzt, dass zwischen zwei Werten kein Unterschied bestand. Der H-Test von Kruskal und Wallis wurde beim Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben benutzt.

Ein logistisches Regressionsmodell wurde verwendet, um den unabhängigen Einfluss von mehreren Variablen auf eine Variable zu analysieren. Die hierbei berechneten adjustierten Odds Ratios mit 95%-Konfidenzintervallen beschreiben die Wahrscheinlichkeit, dass ein Merkmal mit der abhängigen Variable assoziiert ist unter Berücksichtigung anderer assoziierter Merkmale. Diese Modelle wurden beispielsweise bei den Analysen der Risikofaktoren für das Auftreten von Anämie oder Frühgeburtlichkeit verwendet. In das logistische Regressionsmodell wurden, soweit nicht anders vermerkt, nur unabhängige Variablen eingegeben, die univariat signifikant ($P < 0,05$) mit der abhängigen Variable assoziiert waren.

2.5.2 Varianzanalyse

Eine Varianzanalyse dient dazu, den quantitativen Einfluss mehrerer Merkmale auf eine unabhängige Variable zu untersuchen. Der Einfluss einzelner Faktoren oder Merkmale macht sich in den Werten der abhängigen Variable bemerkbar. Ein Einzelfaktor verursacht einen Haupteffekt, und durch die Kombination mehrerer Einzelfaktoren werden Wechselwirkungseffekte erzeugt. Mit der Varianzanalyse soll zum Beispiel geprüft werden, ob sich der Effekt einer *P. falciparum*-Infektion (Faktor 1) auf die Hb-Werte zwischen Erst- und Mehrgebärenden (Faktor 2) unterscheidet. Die Varianzanalyse berechnet, wie viel der Veränderlichkeit in der abhängigen Variable einem betrachteten Effekt zugeschrieben werden kann, um die Signifikanz von Effekten zu bestimmen. Zunächst wird die Summe der quadrierten Einzelabweichungen vom Mittelwert gebildet („Summe der Abweichungs-Quadrate“ [SQ]). Bei einer Abhängigkeit der beobachteten Variablen von einem mehrstufigen Faktor wird die [SQ] aufgeteilt. Eine [SQ] wird durch die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen verursacht, die andere [SQ], die auch Residuum genannt wird, kommt durch Abweichungen innerhalb der Gruppen zustande. Aus dem Quotienten der [SQ] durch die Freiheitsgrade der Beobachtungen ergibt sich das Mittlere (Abweichungs-) Quadrat [MQ]. Der Signifikanztest auf Unterschiede zwischen den Gruppen basiert auf dem Vergleich der „zwischen den Gruppen-[MQ]“ mit dem „innerhalb der Gruppen-[MQ]“ in einem F Test:

$$F = \frac{\text{zwischen den Gruppen [MQ]}}{\text{innerhalb der Gruppen [MQ]}} = \frac{\text{[MQ] Effekt}}{\text{[MQ] Residuum}}$$

Hierbei ist der Freiheitsgrad = $(k-1, N-k)$; N stellt die Anzahl der gesamten Beobachtungen dar und k die Zahl der Gruppen. Die Nullhypothese dieser F-Statistik sagt aus, dass keine Unterschiede zwischen Nenner und Zähler bestehen ($F=1$). Ist eine Variable abhängig von zwei Faktoren, kann es vorkommen, dass die Abhängigkeit der Variablen von einem Faktor durch den zweiten beeinflusst wird. Eine solche Wechselwirkung (Interaktion) ist dann vorhanden, wenn sich der Effekt von einem der Faktoren in Abhängigkeit der Ausprägung des anderen, an der Wechselwirkung beteiligten Faktors ändert.