

Aus dem Institut für Tropenmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Prävalenz, Prädiktoren und Folgen einer  
Infektion mit *Plasmodium falciparum*  
bei Säuglingen in einem  
holoendemischen  
Malariagebiet in Ghana**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Iris Christine Hannibal  
aus Salzgitter

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F.P. Mockenhaupt  
2. Prof. Dr. med. Koletzko  
3. Prof. Dr. med. H.-W. Presber

Datum der Promotion: 27.03.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	7
<b>1.1</b>	<b>Malaria</b>	7
1.1.1	Epidemiologie der Malaria	7
1.1.2	Der Entwicklungszyklus der Plasmodien	8
1.1.3	Manifestationen einer Infektion mit <i>P. falciparum</i>	8
1.1.3.1	Klinik und Pathogenese der Malaria tropica unter besonderer Berücksichtigung des Kindesalters	9
1.1.4	Immunität gegen Malaria	10
1.1.4.1	Schutzmechanismen im Säuglingsalter	10
1.1.4.2	Die Entwicklung einer Teilimmunität	11
1.1.5	Malaria in der Schwangerschaft	12
1.1.5.1	Auswirkungen der Malaria in der Schwangerschaft auf den Fetus	13
1.1.6	Koninatale Malaria	14
<b>1.2</b>	<b>Anämien</b>	14
1.2.1	Ursachen für die Entstehung einer Anämie im Kindesalter	15
1.2.2	Malaria-induzierte Anämie	16
1.2.2.1	Definition der Malaria-induzierten Anämie	16
1.2.2.2	Pathogenese der Malaria-induzierten Anämie	17
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	18
<b>2.</b>	<b>Probanden, Material und Methoden</b>	20
2.1.	Studiengebiet und Studienort	20
2.2.	Kooperationspartner und Studienteam	21
2.3.	Studiendesign	22
2.3.1	Rekrutierung der Studiengruppe	22
2.3.2	Klinische Untersuchung der Gebärenden	22
2.3.3	Aufarbeitung und Probengewinnung aus der Plazenta	23
2.3.4	Planung und Verlauf der klinischen Untersuchung der Kinder	23
2.3.5	Indikation zur Therapie beim Nachweis vom Plasmodien	25
2.4	Vor Ort angewandte Methoden zur Bestimmung der Parasitämien	26
2.4.1	Durchführung des Immunchromatographischen Schnelltestes (ICT)	26
2.4.2	Mikroskopische Bestimmung der Parasitämie	26

2.5	Bestimmung der hämatologischen Parameter.....	27
2.6	Aufbereitung der Blutproben für spätere Analysen.....	28
2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	28
	2.7.1 Extraktion von genomischer DNA aus den Blutproben.....	29
	2.7.2 Protokoll der PCR zum Nachweis einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> und <i>P. malariae</i> .....	30
	2.7.3 Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Moleküle mittels Agarose- Gel-Elektrophorese.....	31
2.8	Messung von fetalem Hämoglobin (HbF), Ferritin und C-reaktivem Protein (CRP).....	32
2.9	Statistische Berechnungen.....	33
	2.9.1 Assoziationsberechnungen.....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Klassifizierung der Studiengruppe.....	34
3.2	Deskription der Kenndaten.....	34
	3.2.1 Deskription der Kenndaten der Schwangeren.....	34
	3.2.2 Deskription der Kenndaten der Neugeborenen.....	35
	3.2.3 Deskription der Kenndaten der Säuglinge.....	37
	3.2.4 Deskription der Kenndaten der Säuglinge an den Notfallambulanz- vorstellungen.....	38
3.3	Prävalenz einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> .....	39
	3.3.1 Prävalenz einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> bei den Schwangeren.....	39
	3.3.2 Prävalenz einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> bei den Neugeborenen.....	40
	3.3.3 Prävalenz einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> bei den Säuglingen.....	40
3.4	Klinische Symptome einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> .....	43
	3.4.1 Prävalenz von Fieber und Splenomegalie bei den Säuglingen.....	43
	3.4.2 Prävalenz von klinisch manifester Malaria tropica bei den Säuglingen.....	43
	3.4.3 Splenomegalie in Assoziation zu einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> .....	45
3.5	Einflussfaktoren auf eine Infektion mit <i>P. falciparum</i> im ersten halben Lebensjahr.....	45
	3.5.1 Peripartale Infektion der Mutter mit <i>P. falciparum</i> .....	45
	3.5.2 Mütterliches Alter.....	47
	3.5.3 Fetaler Hämoglobinspiegel.....	47
3.6	Anämien.....	48

3.6.1	Deskription der hämatologischen Basisdaten der Schwangeren und Prävalenz maternaler Anämien.....	48
3.6.2	Deskription der hämatologischen Basisdaten der Neugeborenen und Prävalenz der Neugeborenenanämien.....	49
3.6.3	Deskription der hämatologischen Basisdaten der Kinder und Prävalenz kindlicher Anämien.....	50
3.7	Einflussfaktoren auf den hämatologischen Status bzw. auf die Prävalenz einer Anämie bei den Säuglingen mit einem halben Lebensjahr.....	54
3.7.1	Einfluss peripartaler Parameter auf eine Anämie mit 28 Wochen.....	54
3.7.2	Eine Infektion mit <i>P. falciparum</i> als Risikofaktor für eine Anämie bei den Säuglingen.....	55
3.7.3	Fieber und Splenomegalie als Risikofaktoren für eine Anämie.....	57
3.7.4	Eisenmangel als Risikofaktor für eine Anämie.....	58
3.7.5	Multivariate Analyse der in den univariaten Analysen ermittelten Assoziationen zu einer Anämie bei den Säuglingen.....	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1	Diskussion des Studiendesigns und der verwendeten Methoden.....	61
4.1.1	Studiendesign.....	61
4.1.2	Klinische Untersuchung der Gebärenden und Gewinnung von plazentarem Blut.....	62
4.1.3	Klinische Untersuchung der Kinder.....	62
4.1.4	Diagnostik einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> mittels Mikroskopie, PCR und ICT.....	62
4.1.5	Bestimmung der hämatologischen Parameter und Definition einer Anämie.....	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	64
4.2.1	Prävalenz maternaler Infektionen mit <i>P. falciparum</i> und maternaler Anämie.....	64
4.2.2	Koninatale Malaria.....	65
4.2.3	Einfluss der plazentaren Infektion mit <i>P. falciparum</i> auf den Fetus.....	66
4.2.4	Infektionen mit <i>P. falciparum</i> im ersten halben Lebensjahr.....	67
4.2.4.1	Prävalenz und Risikofaktoren einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> .....	67
4.2.4.2	Klinisch-manifeste Malaria im ersten halben Lebensjahr.....	69
4.2.5	Anämie und Malaria im ersten halben Lebensjahr.....	70

4.2.6 Risikofaktoren für eine Anämie.....	72
4.2.6.1 Infektion mit <i>P. falciparum</i> .....	72
4.2.6.2 Eisenmangelanämie.....	74
4.3 Schlussfolgerungen.....	75
5. Zusammenfassung.....	77
6. Literaturverzeichnis.....	79
7. Anhang.....	89
7.1 Abkürzungen.....	89
7.2 Lebenslauf.....	90
7.3 Erklärung.....	91
7.4 Danksagung.....	92

# 1. Einleitung

Die Malaria ist im 21. Jahrhundert noch immer eine bedeutungsvolle und schwere parasitäre Infektionskrankheit des Menschen. Obwohl schon 1880 von Laveran die Plasmodien, Protozoen, als Malariaerreger entdeckt wurden und Ross 1889 die Rolle der Anophelesmücke für deren Übertragung beschrieben hatte, ist die Bedrohung durch diese Krankheit bis heute nicht überwunden. Im Gegenteil, die zunehmende Resistenz der Plasmodien gegenüber den üblichen Chemotherapeutika sowie der desolate Zustand der Gesundheitssysteme einiger afrikanischer Staaten fördern weiterhin die Ausbreitung der Malaria.

Von den bisher über 100 bekannten Plasmodienarten sind nur *Plasmodium (P.) falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax* humanpathogen. Der gravierendsten klinischen Form, der Malaria tropica, liegt eine Infektion mit *P. falciparum* zugrunde. In Endemiegebieten haben Kinder < 5 Jahren und Schwangere das größte Risiko an einer Malaria zu erkranken (Sullivan *et al.*, 1999; Menendez *et al.*, 2000). Eine Malaria in der Schwangerschaft ist assoziiert mit einem verminderten Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit (Sullivan *et al.*, 1999; Menendez *et al.*, 2000). Schätzungen zufolge sterben weltweit jährlich ca. 75.000-250.000 Feten und Neugeborene an den Folgen einer maternalen Malaria (Steketee *et al.*, 2001). Eine schwere Anämie ist die häufigste Todesursache bei Kindern mit akuter Malaria in holoendemischen Malariagebieten (Owusu-Agyei *et al.* 2002). Aber auch milde klinische Verlaufsformen, insbesondere Malaria-induzierte Anämien, können kognitive und motorische Entwicklungsverzögerungen im Kindesalter verursachen (Grantham-McGregor *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2001) und sind somit von großer sozialer und wirtschaftlicher Bedeutung (Cornet *et al.*, 1998). Schon eine leichte Anämie kann die physische Belastbarkeit senken, die intellektuelle Leistungsfähigkeit reduzieren und die Wachstumsgeschwindigkeit verlangsamen (Dallman *et al.*, 1980).

## 1.1 Malaria

### 1.1.1 Epidemiologie der Malaria

Über 40 % der Weltbevölkerung lebt in Ländern, die von der WHO als Malaria-Risikogebiete eingestuft werden. Schätzungen gehen von 300-500 Millionen Erkrankungen und von bis zu 3 Millionen Todesfällen jährlich aus (WHO, 2000). Davon treten ca. 90 % in Afrika südlich der Sahara auf. In einigen Ländern verursacht die Malaria bis zu 40 % der Todesfälle bei Kindern unter vier Jahren (Jaffar *et al.*, 2000). Malaria-assoziierte Anämien fordern nach

neueren Angaben ca. 190.000-974.000 Todesopfer pro Jahr bei Kindern unter fünf Jahren (Murphy *et al.*, 2001). In Ghana wurden im Jahr 2003 ca. 3,5 Millionen Malaria-Fälle registriert. 40 % betrafen Kinder < 5 Jahren (ca. 1,4 Mio.). 22 % der Fälle wurden in der Ashanti-Region, dem Studiengebiet der vorliegenden Arbeit, diagnostiziert. In über 90 % der Fälle war *P. falciparum* der Erreger. Unberücksichtigt in den Statistiken sind die vielen Infektionen mit *P. falciparum*, die zu Hause oder von traditionellen Heilern behandelt werden (World Malaria Report, 2005).

### **1.1.2 Der Entwicklungszyklus der Plasmodien**

Die Entwicklung der Plasmodien gliedert sich in einen sexuellen Teil in der Anophelesmücke und einen asexuellen Teil im Menschen. Die über die Hämolymphe in den Speichel gewanderten Sporozoiten gelangen beim Stich der Anophelesmücke in die menschliche Blutbahn und dringen innerhalb von Minuten in Hepatozyten ein. Dort findet die asexuelle Vermehrung zu Gewebsschizonten statt (hepatische Schizogonie). *P. vivax* und *P. ovale* besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung von sogenannten Hypnozoiten. Diese können Monate bis Jahre in den Hepatozyten persistieren und dann später wieder in den Zyklus einsteigen. Beim Platzen der Gewebsschizonten werden Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt und dringen über spezifische Rezeptoren in Erythrozyten ein. In diesen findet eine Weiterentwicklung zu Schizonten statt. Je nach Plasmodienspezies entstehen aus einem Blutschizonten 6-36 Merozoiten. Nach Ruptur des infizierten Erythrozyten und Freisetzung der Merozoiten werden weitere Erythrozyten befallen. Die Blutschizogonie verläuft zeitlich relativ rhythmisch und verursacht im Verlauf der Erkrankung das typische Wechselfieber. Nach einigen Zyklen entwickeln sich einige Plasmodien zu sexuellen Mikro- und Makrogameten. Diese persistieren bis zu 22 Tagen im Blut und sterben ab, falls sie nicht durch den Stich einer weiblichen Anophelesmücke aufgenommen werden. Im Darm der Anophelesmücke findet dann der sexuelle Teil der Vermehrung, die Sporogonie, statt. Diese endet mit der Bildung von Tausenden infektiösen Sporozoiten, die in den Speichel der Mücke gelangen (Lang *et al.*, 2000).

### **1.1.3 Manifestationen einer Infektion mit *P. falciparum***

Eine Infektion mit *P. falciparum* kann sich als submikroskopische /asymptomatische Infektion, unkomplizierte oder komplizierte Malaria tropica manifestieren. Bei einer submikroskopischen Infektion sind die Parasiten nur mit der PCR darstellbar. Ein mikroskopischer Nachweis ist nicht möglich.



Asymptomatische Infektionen sind bei Säuglingen und Erwachsenen in Malariaendemiegebieten die häufigste Manifestationsform einer Infektion mit *P. falciparum* (Trape *et al.*, 1994; Bottius *et al.*, 1996). Auswirkungen der submikroskopischen und asymptomatischen Infektion sind noch weitgehend unbekannt. Ob asymptomatische Infektionen, die über Monate persistieren können, das Risiko einer späteren klinischen Manifestation einer Malaria erhöhen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Färnet *et al.*, 1999; Missinou *et al.*, 2003). Die Abgrenzung zu einer unkomplizierten Malaria tropica ist schwierig, da eindeutige Kriterien (Höhe der Parasitämie, Symptome) fehlen. Eine unkomplizierte Malaria kann sich bei Sequestrierung parasitär befallener Erythrozyten im Kapillarbett innerer Organe zum Vollbild einer komplizierten Malaria entwickeln (Lang *et al.*, 2000; WHO, 2000).

#### **1.1.3.1 Klinik und Pathogenese der Malaria tropica unter besonderer Berücksichtigung des Kindesalters**

Initial präsentiert sich die Malaria wie ein grippaler Infekt. Im Kindesalter ist der Verlauf einer Malaria tropica rasch progredient. Während bei Erwachsenen Komplikationen meist erst nach 5-7 Tagen auftreten, ist dies bei Kindern häufig bereits nach 1-2 Tagen der Fall (Molyneux, 1999). Im Verlauf der Erkrankung entwickeln die Patienten Fieber, Schüttelfrost, Kopf- u. Rückenschmerzen sowie Erbrechen. Die Malariaanfälle dauern ca. 10-12 Stunden und sind im Anfangsstadium der Erkrankung ohne Periodizität. Die Fieberanfälle entstehen durch Ausschüttung von Phospholipiden bei der Umwandlung von Schizonten zu Merozoiten. Die Phospholipide regen Monozyten und Makrophagen zur Produktion von Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und den Interleukinen 1, 6 und 8 an, die als Pyrogene wirken. Die blutzuckersenkende Wirkung von TNF- $\alpha$  und den Phospholipidantigenen kann eine Hypoglykämie induzieren. Im weiteren Verlauf der Erkrankung können sich eine Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie, Monozytose, Hypotriglyzeridämie und Hypercholesterinämie entwickeln. Bei einer von Oduro *et al.* (2007) in Ghana durchgeführten Studie war eine schwere Anämie die häufigste Manifestation einer schweren Malaria im Kindesalter (s. 1.2.2). Gleichzeitig trägt die Anämie zur Entwicklung einer metabolischen Azidose bei, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (WHO, 2000; Oduro *et al.*, 2007). Die metabolische Azidose ist überwiegend durch eine massive Laktaterhöhung durch Hypoxie und Zellschädigung bedingt. Eine weitere häufige Komplikation einer Malaria, besonders bei Kindern > 5 Jahren und in Gebieten mit niedriger Transmission, ist die zerebrale Malaria (WHO, 2000; Oduro *et al.*, 2007). Sie ist gekennzeichnet durch den Nachweis von *P. falciparum* und ein nicht-erweckbares Koma nach

Ausschluss anderer Ursachen, z.B. Meningitis. Die zerebrale Malaria verläuft bei Kindern insgesamt seltener letal als bei Erwachsenen. Dennoch versterben rund 18 % der Kinder an deren Folgen und 10 % der überlebenden Kinder leiden an neurologischen Defiziten.

Die definierenden Symptome einer komplizierten Malaria bei Kindern (WHO, 2000) sind:

- Prostration: Unfähigkeit eines Kindes zu sitzen bzw. bei jüngeren Kinder zu trinken
- Bewusstseinsbeschränkung: Bestimmung mit der Blantyre-Koma-Skala, Wert < 3
- Wiederholte Konvulsionen:  $\geq 2$  in 24 Stunden
- schwere Anämie: Hb < 5 g/dl
- Respiratorische Insuffizienz: Kussmaulsche Atmung, Nasenflügeln, Einziehungen
- Hämoglobinurie, abnorme Blutungsneigung (klinische Symptomatik), Ikterus
- Zirkulatorischer Kollaps: RR syst. < 60 mmHg ( $\leq 5$  Jahre); < 80 mmHg ( $> 5$  Jahre) + klinische Zeichen der Minderperfusion
- Lungenödem: radiologischer Nachweis erforderlich

#### **1.1.4 Immunität gegen Malaria**

In den Hochendemiegebieten ist die Malaria im Erwachsenenalter meist eine chronische, oft asymptomatische Infektion (Bottius *et al.*, 1996). Bei einer Studie im Senegal waren 98,6 % der Probanden sowie 100 % in der Gruppe der über 40-jährigen mindestens einmal im Jahr mit *P. falciparum* infiziert. In der selben Studie erkrankten Kinder im Alter von 0-4 Jahren 40-mal häufiger an einer Malaria als Erwachsene jenseits des 40. Lebensjahres (Trape *et al.*, 1994). Im Alter von ein bis fünf Jahren sind Morbidität und Mortalität am höchsten (Snow *et al.*, 1999). Ab ungefähr dem 5. Lebensjahr nimmt die Inzidenz klinischer Malaria ab (Trape *et al.*, 1987). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Bewohner hochendemischer Malariagebiete eine Teilimmunität ausbilden (Trape *et al.*, 1994). Davon zu differenzieren ist der „Nestschutz“ Neugeborener. Säuglinge in den ersten 3-6 Lebensmonaten erkranken nur selten an einer Malaria (Brabin *et al.*, 1990).

##### **1.1.4.1 Schutzmechanismen im Säuglingsalter**

Säuglinge verfügen über Schutzmechanismen, die nicht die Infektion mit Plasmodien *per se*, sondern die Parasitenreplikation und die klinische Manifestation der Malaria verhindern. Ein entscheidender Schutzmechanismus in den ersten Lebensmonaten ist der erhöhte Gehalt an fetalem Hämoglobin (HbF) der Erythrozyten. Ein in-vitro Versuch zeigte in HbF-haltigen Zellen eine signifikante Reduzierung des Parasitenwachstums (Pasvol *et al.*, 1977). Shear *et al.* (1998) vermuten, dass die Entwicklung der Malariaparasiten in HbF-haltigen Erythrozyten

gestört ist, da diese das fetale Hämoglobin nicht adäquat verstoffwechseln können. Unterstützt wurden diese Beobachtungen durch eine Untersuchung bei 3-6 Monaten alten mit *P. falciparum* infizierten Säuglingen. Ein hoher Gehalt an fetalem Hämoglobin war mit niedrigeren Parasitämien assoziiert (Pasvol *et al.*, 1976).

Ein seit langer Zeit vermuteter Schutzfaktor vor hohen Parasitämien bei Säuglingen ist das Stillen. Muttermilch enthält nur geringe Konzentrationen von para-Aminobenzoesäure (PABA), einem Baustein der Folsäure, die von den Plasmodien für ihren Stoffwechsel benötigt wird (Maegraith *et al.*, 1952; Hendrickse *et al.*, 1958). Ein weiterer Vorteil der Muttermilch ist der hohe Gehalt an „Transformierenden Wachstumsfaktor-β“ (TGF-β = transforming growth factor-β). Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine über TGF-β vermittelte vermehrte Expression von Fcγ-Rezeptoren auf Makrophagen zu einer erhöhten Phagozytose und dadurch zu einer Reduzierung der Parasitämie führte (Omer *et al.*, 1998).

Die Fähigkeit der Milz, mit Plasmodien infizierte Erythrozyten aus dem Blutkreislauf herauszufiltern und zu eliminieren, ist bekannt (Looareesuwan *et al.*, 1987). Mögliche Ursache ist eine verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten nach Bindung von Parasitenpartikeln an deren Oberflächenmembran (Dondorp *et al.*, 1999). Brabin *et al.* (1990) postulierten, dass die vermehrte Aktivität der Milz im Säuglingsalter diesen Mechanismus verstärkt und dadurch zu niedrigeren Parasitämien führt.

Ein weiterer Grund für die niedrigen Parasitämien im Säuglingsalter ist eine diaplazentare Passage von Malariamedikamenten mit langer Halbwertszeit (Mutabingwa *et al.*, 1994).

Ganz wesentlich ist die passiv erworbene Immunität durch diaplazentar übertragene Antikörper von immunkompetenten Schwangeren (Brabin *et al.*, 1990). Neugeborene sind durch transplazentar übertragene maternale Immunglobulin (Ig)-Antikörper (AK) vor einer Infektion mit *P. falciparum*, insbesondere hohen Parasitämien, geschützt (Akanmori *et al.*, 1995; Carlier & Truysens, 1995). Es werden mütterliche Antikörper gegen eine Vielzahl von *P. falciparum*-Stämmen auf den Fetus übertragen. Mit ungefähr 18 Wochen kommt es ca. zeitgleich zu einem Abfall der maternalen Antikörper und einer Reduktion des HbF. Daher ist es schwierig, diese beide Einflüsse voneinander abzugrenzen (Achidi *et al.*, 1995).

#### **1.1.4.2 Die Entwicklung einer Teilimmunität**

Die Teilimmunität bietet Schutz vor klinisch manifester Malaria, nicht vor asymptomatischen Parasitämien (Trape *et al.*, 1994). Aufgrund der hohen Antigenvariabilität des Erregers kommt es rezidivierend zu neuen Infektionen mit verschiedenen Plasmodienstämmen. Smith *et al.* (1999) beschreiben, dass eine persistierende asymptomatische Infektion mit *P. falciparum* den Ausbruch einer klinischen Malaria unterdrückt, da eine Superinfektion mit

einem neuen virulenten Stamm verhindert wird. Die neu erworbenen Parasitenstämme werden dabei durch eine kreuzreaktive Immunität in ihrer Multiplikation gehemmt und ihre Etablierung im Wirt verhindert. Dieser Mechanismus wird als Prämunitio bezeichnet (Smith *et al.*, 1999). Die noch nicht ausgereifte Prämunitio und der Verlust der passiven Immunität ab dem 3.-6. Lebensmonat scheinen verantwortlich für die schweren Verläufe klinischer Malaria im Kleinkindalter zu sein (Smith *et al.*, 1999). Zur Aufrechterhaltung der Teilimmunität ist eine kontinuierliche Erregerexposition notwendig (Smith *et al.*, 1999). Die Mechanismen, die zur Ausbildung der Teilimmunität führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die Immunität zellulär und humoral bedingt ist. Die unterschiedlichen Subtypen von T-Zellen (CD4+, CD8+, Natürliche Killerzellen) spielen eine wichtige Rolle in der zellulär vermittelten Immunität gegenüber den prä-erythrozytären Formen der Malariaparasiten. CD4+-Zellen unterstützen zum Beispiel die B-Zellen in der Produktion von plasmodienspezifischen Antikörpern, aktivieren die CD8+-Zellen abhängige Immunantwort und sind auch direkt inhibitorisch gegenüber der Entwicklung der Leberformen der Parasiten wirksam (Tsuji *et al.*, 2002).

### **1.1.5 Malaria in der Schwangerschaft**

In endemischen Malariagebieten haben neben Kleinkindern vor allem Schwangere ein erhöhtes Risiko, an einer Malaria zu erkranken. In einer Voruntersuchung für die Studie der vorliegenden Arbeit diagnostizierten Mockenhaupt *et al.* (2000) bei 63 % der insgesamt 530 untersuchten Schwangeren eine Infektion mit *P. falciparum*. In Endemiegebieten sind insbesondere Primigravidae einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt (Mockenhaupt *et al.*, 2000).

Es existieren verschiedene Erklärungsansätze für die gesteigerte Empfänglichkeit Schwangerer gegenüber Plasmodien. Ein Grund ist die transiente Depression der zellulären Immunität, die durch den Cortisolanstieg besonders in der ersten Schwangerschaftshälfte bedingt ist (Perlmann *et al.*, 2002).

Eine andere Theorie ist, dass spezielle Subpopulationen von *P. falciparum* in die Plazenta sequestrieren, dadurch der Elimination durch die Milz entgehen und die typische plazentare Malaria hervorrufen. Die Adhäsion in der Plazenta beruht auf einer hohen Affinität von den mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten zu dem extrazellulärem Matrixproteoglykan Chondroitinsulfat-A (CSA), das von Synzytiotrophoblasten der Plazenta exprimiert wird. Vermittelt wird die Adhäsion an CSA über das *P. falciparum*-Erythrocyten-Membran-Protein-1, dessen Bindungsdomäne zugleich als Antigen Ziel spezifischer Immunmechanismen ist (Buffet *et al.*, 1999). Da CSA fast ausschließlich in der Schwangerschaft gebildet wird,

betrifft eine Infektion mit diesen speziellen *P. falciparum*-Stämmen fast ausschließlich Schwangere, die gegen diesen Subtyp noch keine Immunität aufbauen konnten. Die bereits entwickelte Teilimmunität ist in der Gravität, insbesondere bei Primigravidae, folglich ineffektiv. Durch in vorausgegangenen Schwangerschaften gebildete spezifische Antikörper wird bei Multiparae eine Adhäsion zwischen infizierten Erythrozyten und CSA verhindert (Buffet *et al.*, 1999). Ein in-vitro-Versuch konnte diese Vermutung bestätigen. Mit dem Plasma von malariaexponierten Multigravidae ließ sich die Adhäsion von *P. falciparum* an CSA hemmen (Ricke *et al.*, 2000).

#### **1.1.5.1 Auswirkungen der Malaria in der Schwangerschaft auf den Fetus**

In den Ländern Afrikas südlich der Sahara kommen jährlich ca. 3,5 Mio. Kinder mit reduziertem Geburtsgewicht (LBW = low birth weight) zur Welt. Eine maternale Malaria gilt als Hauptursache (Nahlen, 2000). Die plazentare Malaria, definiert als Nachweis von Parasiten u./o. Malariapigment im intervillösen Raum, bedingt eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR = intrauterine growth retardation), die zu einem LBW führt. Menendez *et al.* (2000) sehen die Ursache der IUGR in einer durch eine chronische Intervillositis gestörten transplazentaren Ernährung des Feten. Eine andere Erklärung für die IUGR ist eine vermehrte Produktion von IL-8 und TNF- $\alpha$  durch die maternalen mit Hämozoïn-beladenen Makrophagen in der infizierten Plazenta (Moormann *et al.*, 1999).

Eine maternale Infektion mit *P. falciparum* erhöht zudem das Risiko einer Frühgeburt und der dadurch gesteigerten peri- und neonatalen Sterblichkeit (Kullmala *et al.*, 2000). Sullivan *et al.* (1999) untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und dem Geburtsgewicht. Infektionen im ersten Schwangerschaftstrimester führten eher zu einer IUGR, während Infektionen im dritten Trimester eher eine Frühgeburt induzierten.

Eine maternale Malaria geht zudem mit einem erhöhten Risiko für asymptomatische Infektionen mit *P. falciparum* und schweren klinischen Manifestationen im Säuglingsalter einher (Le Hesran *et al.*, 1997; Cornet *et al.*, 1998). In Kamerun hatten Säuglinge von Müttern mit plazentarer Malaria im 4.-6. Monat häufiger eine manifeste Malaria und zwischen dem 5.-8. Monat höhere Parasitämien als Kinder nicht-infizierter Mütter (LeHesran *et al.*, 1997). Reed *et al.* (1994) beschrieben, dass Neugeborene infizierter Mütter gehäuft an einer Anämie litten (siehe 2.2.1).

### **1.1.6 Konnatale Malaria**

In der Literatur sind nur ca. 300 Fälle konnataler Malaria dokumentiert (Viaraghaven *et al.*, 2000). Eine oft angewandte Definition konnataler Malaria beschreibt den Nachweis von Plasmodien im venösen Blut des Neugeborenen bis zum 7. bzw. 10. Lebenstag (Mc Gregor *et al.*, 1983; Balaka *et al.*, 2000).

Neugeborene mit konnataler Malaria sind meist asymptomatisch oder haben unspezifische Krankheitszeichen wie Fieber, Lethargie, Trinkschwäche, Anämie, Hyperbilirubinämie und Hepatosplenomegalie (Wagner *et al.*, 1998; Viraraghavan *et al.*, 2000). Angaben in der Literatur zum Krankheitsbild und zum Zeitpunkt des Ausbruchs variieren stark. Die unterschiedlich gewählten Definitionen bedingen eine große Varianz in den Angaben über die Prävalenz konnataler Malaria. Auch Fischer *et al.* (1997) beschrieben in sieben Studiengebieten südlich der Sahara trotz identischer Methoden und Definition deutlich unterschiedliche Häufigkeiten konnataler Malaria (0-23 %). In den verschiedenen Populationen waren keine weiteren signifikanten Unterschiede wie z. B. verschiedene maternale Parasitämien zu finden. Eine andere Studie in Togo differenzierte zwischen klinischer Malaria und asymptomatischen Parasitämien. Bei ca. 19 % der untersuchten Neugeborenen waren Parasiten im Blut nachweisbar, aber nur 8 % zeigten klinische Symptome (Balaka *et al.*, 2000). Die Parasitämien Neugeborener mit konnataler Malaria sind meist niedrig, bei asymptomatischen Infektionen zwischen 360-870/ $\mu\text{l}$  und bei klinischer Malaria zwischen 700-3000/ $\mu\text{l}$  (Larkin *et al.*, 1991; Balaka *et al.*, 2000).

### **1.2 Anämien**

Anämien sind definiert als eine Erniedrigung der Erythrozytenmasse. In der Praxis wird aufgrund der einfacheren Diagnostik eine altersadaptierte reduzierte Hämoglobinkonzentration oder ein reduzierter Hämatokrit verwendet (Burk *et al.*, 1999). Eine Anämie ist keine Erkrankung sondern ein Symptom anderer Erkrankungen bzw. Mangelerscheinungen. Mögliche klinische Zeichen einer Anämie sind Blässe, insbesondere der Schleimhäute, schnelle Ermüdbarkeit, Kopfschmerzen, Konzentrationsschwäche, Tachykardie, Splenomegalie, Atemnot und Angina pectoris. Oft verläuft eine Anämie jedoch asymptomatisch (Schellenberg *et al.*, 2003). In Afrika südlich der Sahara schwankt die Prävalenz der Anämie im Kindesalter zwischen 31 % und 90 % (Bradley-Moore *et al.*, 1985; Premji *et al.*, 1995). In endemischen Malariagebieten ist eine Anämie eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität (Koram *et al.*, 2000). Bei einer in Ghana durchgeführten Studie waren 58,1% der Todesfälle bei Kindern nach der Neonatalperiode mit einer Anämie assoziiert (Commey *et al.*, 1995).

### 1.2.1 Ursachen für die Entstehung einer Anämie im Kindesalter

Die Ätiologie der Anämien in Afrika ist multifaktoriell. In malariaendemischen Gebieten spielt die Infektion mit *P. falciparum* eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer Anämie, wobei Mangelernährung, Infektionen mit Helminthen und dem HI-Virus sowie Hämoglobinopathien zusätzliche Einflussfaktoren sind (Cornet *et al.*, 1998; Crawley, 2004). Die multiplen Ursachen erschweren oft eine eindeutige pathogenetische Zuordnung.

**Präpartale Faktoren:** Infektionen, Immunsuppression und Mangelernährung der Mütter resultieren durch einen eingeschränkten transplazentaren Nährstoffaustausch bei den Kindern in Immunschwäche, niedrigen Eisen- und Folsäurereserven und einem somit erhöhtem Risiko für eine Anämie (Fleming *et al.*, 1989; Crawley, 2004). Reed *et al.* (1994) beschrieben in einer Studie in Malawi, dass eine plazentare Malaria signifikant mit einer Anämie (HKT < 25 %) bei 2 Monate alten Säuglingen assoziiert ist. Bestätigt wurde dies durch eine Studie von LeHesran *et al.* (1997) in Kamerun. Hier war eine plazentare Malaria größter Risikofaktor für eine Anämie (Hb < 11 g/dl) bei sechs Monate alten Säuglingen.

**Infektionen:** Eine Infektion mit *P. falciparum* führt in frühester Kindheit nahezu obligatorisch zu einer Anämie (Hb < 11 g/dl). Mehr als die Hälfte aller Malaria-assoziierten Todesfälle bei Kindern sind auf eine schwere Anämie (Hb < 5 g/dl) zurückzuführen (Redd *et al.*, 1994; Murphey *et al.*, 2001). Bei gleichzeitig bestehender HIV-Infektion ist das Risiko für eine Anämie noch erhöht (Crawley, 2004). Weitere häufige Infektionen als Ursachen für eine Anämie in Afrika sind gastrointestinale Infektionen, Infektionen mit Helminthen (*Schistosoma haematobium*, Hakenwürmer), Tuberkulose und chronische Sepsis (Hendrickse *et al.*, 1958; Reither *et al.*, 2007).

**Mangelernährung im Kindesalter:** Von den jährlich mehr als 10 Millionen Todesfällen bei Kindern < 5 Jahren in den Entwicklungsländern sind über die Hälfte direkt oder indirekt mit einer Mangelernährung assoziiert (Black *et al.*, 2003). Weltweit ist Eisenmangel die häufigste Ursache für ernährungsbedingte Anämien (Commeey *et al.*, 1995). Die Eisenmangel-Anämie ist mikrozytär und hypochrom. Das Serum-Ferritin als Indikator für den Körperbestand an Speichereisen ist erniedrigt. Eisenmangelanämien werden besonders bei Säuglingen ab dem 6. Monat beobachtet. Dies erklärt sich aus dem erhöhten Eisenbedarf in diesem Alter, den erschöpften Eisenspeichern und der oft sehr eisenarmen, getreidehaltigen Beikost in den Entwicklungsländern (Dallman *et al.*, 1980; Cornet *et al.*, 1998; Crawley, 2004). Eine schwere Eisenmangel-Anämie kann mit einem verlangsamten Wachstum, reduziertem Appetit (Lawless *et al.*, 1994), eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten (Grantham-McGregor *et al.*, 2001) und verminderter körperlicher Aktivität (Haas *et al.*, 2001) einhergehen. Auch die zelluläre Immunität wird durch einen Eisenmangel beeinträchtigt und führt dadurch zu einer

erhöhten Inzidenz von Infektionen (Oppenheimer *et al.*, 2001). Weitere Ursachen für ernährungsbedingte Anämien im Kindesalter sind ein Protein-Energie-Mangel und eine verminderte Zufuhr von Folsäure, Zink, sowie den Vitaminen A, B2, B12, C, und E (Crawley, 2004).

**Hämoglobinopathien:** Homozygote Genträger der Sichelzellerkrankung leiden, wenn der Schutz durch den Abbau des HbF nachlässt, unter schweren hämolytischen Anämien. Diese können durch eine Malaria provoziert werden (Fleming *et al.*, 1989). Heterozygote Genträger sind zumeist klinisch unauffällig (Cornet *et al.*, 1998). Bei den  $\alpha$ -Thalassämien führt der Mangel an  $\alpha$ -Globinketten zu einer mikrozytären Anämie unterschiedlichen Schweregrades (Oppenheimer *et al.*, 1987).

### 1.2.2 Malaria-induzierte Anämie

In endemischen Malariagebieten stellt eine schwere Anämie die häufigste Komplikation einer Infektion mit *P. falciparum* dar (WHO, 2000; Oduro *et al.*, 2007). Eine Anämie ist eine häufige Manifestation sowohl bei einer akuten klinisch manifesten Malaria als auch bei einer asymptomatischen Infektion. In einer Studie von Cornet *et al.* (1998) in Kamerun war in einem 5-jährigen Untersuchungszeitraum eine klinisch manifeste Malaria immer signifikant mit einer gleichzeitig bestehenden Anämie assoziiert. Auch asymptomatische Infektionen mit *P. falciparum* erhöhten das Risiko für eine Anämie. In einer Studie in Tansania hatten 6 Monate alte Säuglinge die niedrigsten Hämoglobinspiegel bei gleichzeitig höchsten Parasitämien und häufigster klinischer Manifestation einer Malaria (Kitua *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999).

#### 1.2.2.1 Definition der Malaria-induzierten Anämie

Laut WHO ist eine schwere Malaria-induzierte Anämie definiert als eine Hämoglobinkonzentration  $< 5$  g/dl oder ein Hämatokrit  $< 15$  % und dem Nachweis von *P. falciparum*, unabhängig von der Höhe der Parasitämie (WHO, 2000). Eine Studie von Achidi *et al.* (1996) zeigt, dass der Schweregrad einer Anämie positiv mit der Parasitämie korreliert. Es gibt jedoch auch Studien, die diese Beobachtung widerlegen (Cornet *et al.*, 1998). Für die Praxis empfiehlt es sich einen Hb-Wert  $< 11$  g/dl (bei Kindern  $> 6$  Monaten) oder einen Hämatokrit  $< 33$  % und die Anwesenheit von Malariaparasiten für eine milde bis moderate Malaria-assoziierte Anämie zu definieren (Menendez *et al.*, 2000). Die Anämie ist in der Regel normozytär und normochrom. Mikrozytose und Hypochromie sprechen jedoch nicht gegen das Vorliegen einer Malaria-induzierten Anämie, da die Häufigkeit von Eisenmangel und Thalassämien in Malariaendemiegebieten hoch ist (Mockenhaupt *et al.*, 2000).



### 1.2.2.2 Pathogenese der Malaria- induzierten Anämie

Die Pathogenese der Malaria-induzierten Anämie ist multifaktoriell. Ein Hauptmechanismus konnte bisher nicht identifiziert werden (Ekvall, 2003). Es kommt zu einer direkten Zerstörung von infizierten Erythrozyten, zu einem vorzeitigen Abbau nicht-infizierter Erythrozyten und zu einer ineffektiven Erythropoese (Menendez *et al.*, 2000b; Ekvall, 2003).

**Direkte Zerstörung von Erythrozyten:** Am Ende des Wachstumszyklus der Plasmodien in den Erythrozyten kommt es - durch von Merozoiten gebildete Proteasen - zu einer Ruptur der Wirtszelle und somit zur direkten Hämolyse (Gosh & Gosh, 2007). Dies betrifft sowohl die im Blut zirkulierenden als auch die in die Gefäße sequestrierten Erythrozyten (Phillips *et al.*, 1992).

**Hypersplenismus:** Eine Infektion mit *P. falciparum* führt über eine Aktivierung des retikuloendothelialen Systems zu einer verstärkten Hämolyse. Es kommt zu einer verstärkten Elimination von infizierten Erythrozyten durch die Milz. Aber auch nicht-infizierte Erythrozyten werden aufgrund erhöhter Rigidität und Bindung von Parasitenbestandteilen an die Erythrozytenmembran verstärkt hämolysiert (Gosh & Gosh, 2007). Bei akuter Malaria führt der Hypersplenismus zu einem erhöhten lienalen Pooling und verkürzter Lebenszeit der Erythrozyten (Angus *et al.*, 1997).

**Autoimmunhämolyse:** Die Rolle der Autoimmunhämolyse infolge der Ablagerung von IgG und Komplementfaktoren auf den Membranen nicht-infizierter Erythrozyten ist umstritten (Menendez *et al.*, 2000b). Der während oder im Anschluss an eine akute *P. falciparum*-Infektion meist positive direkte Coombs-Antikörpertest lässt auf eine Beteiligung der Autoimmunhämolyse schließen. Eine Korrelation zwischen der Schwere oder Persistenz der Anämie und diesem Antikörpertest konnte nicht festgestellt werden (Phillips *et al.*, 1992).

**Zytokindysregulation:** Bei einer Malaria wird ein Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und IL-6 beobachtet. Gleichzeitig kommt es zu einer verminderten Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-12 (Gosh & Gosh, 2007). Es wird vermutet, dass hohe Spiegel von IL-10 und IL-12 einen protektiven Einfluss auf den Verlauf einer Anämie haben. Insgesamt ist der Einfluss pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in der Pathogenese der Malaria-assoziierten Anämie noch nicht endgültig geklärt (Menendez *et al.*, 2000b).

**Ineffektive Erythropoese:** Es wird vermutet, dass eine erhöhte Produktion von TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und Stickstoffmonoxid (NO) zu Knochenmarksdepression, Dyserythropoese und Erythrophagozytose führt (Clark *et al.*, 1988; Anstey *et al.*, 1999). Durch die Knochenmarkssuppression bei einer Malaria kommt es zu einer reduzierten Ansprechbarkeit

des Knochenmarks auf Erythropoetin (EPO) und dadurch zu einer verzögerten Freisetzung von Retikulozyten (Kurtzhals *et al.*, 1997). El-Hassan *et al.* (1997) beobachteten bei semi-immunen Erwachsenen, dass der EPO-Spiegel selbst bei schweren Malaria-induzierten Anämien nur geringfügig – durchschnittlich bis zu 300 U/l - ansteigt. Bei Patienten mit einer Anämie anderer Genese wurden Werte bis zu 12.000 U/l bestimmt. Studien bei Kindern zeigten andere Ergebnisse. Kurtzhals *et al.* (1997) beobachteten bei Kindern in Ghana erhöhte EPO-Spiegel bei einer Infektion mit *P. falciparum*, während Helleberg *et al.* (2005) keinen signifikanten Unterschied in der Höhe des EPO-Spiegels zwischen infizierten und nicht-infizierten Kindern in Ghana fanden. Es wird vermutet, dass die inadäquate EPO-Produktion bzw. die reduzierte Ansprechbarkeit des Knochenmarks auf EPO ein Grund für die lang andauernden Anämien trotz therapeutischer Parasiteneliminierung ist.

**Hämozoin:** Neuere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Hämozoin, ein Stoffwechselprodukt im Hämoglobin-Abbau durch Plasmodien, eine Rolle in der Ätiologie der Malaria-assoziierten Anämie spielt. Casals-Pascual *et al.* (2006) zeigten in einer in-vitro Studie, dass die Menge des im Plasma zirkulierenden Hämozoin direkt und proportional die Erythropoese inhibiert. Zusätzlich induziert Hämozoin eine erhöhte Produktion von 4-Hydroxynonenal (4HNE) und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE). Diese wiederum reduzieren die Verformbarkeit der Erythrozyten und verkürzen dadurch deren Überlebenszeit (Schwarzer *et al.*, 1999; Giribaldi *et al.*, 2004; Skorokhod *et al.*, 2007).

**Anämie beeinflussende Faktoren:** Das Ausmaß der Anämie wird von parasitären Faktoren und Wirtsfaktoren beeinflusst. Zu den parasitären Faktoren gehören die lokale Endemizität der Plasmodien und die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber Malaria-Medikamenten (Ekvall, 2003). Zu den Wirtsfaktoren zählen junges Lebensalter, zusätzliche parasitäre, virale und bakterielle Infektionen. Auch Mangelernährung spielt eine Rolle in der Pathogenese der Malaria-induzierten Anämie (Crawley *et al.*, 2004). Malaria-Medikamente können eine bestehende Anämie verstärken. In einem in-vitro Versuch konnte eine verminderte EPO-Produktion durch Chloroquin induziert werden (El-Hesan *et al.*, 1997).

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine Anämie ist eine nahezu obligate Folge einer Malaria im Kindesalter. Bei Kleinkindern in Malariaendemiegebieten ist eine schwere Anämie die häufigste Manifestation einer komplizierten Malaria tropica. Die Mortalität im Krankenhaus ist für anämische Kinder dreimal höher im Vergleich zu hospitalisierten nicht-anämischen Kindern. Die hohe Letalität stellt ein großes gesundheitliches und wirtschaftliches Problem dar, insbesondere in den

afrikanischen Ländern südlich der Sahara. Die Pathogenese der Anämie bei einer klinisch manifesten Malaria ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Ursachen. Der Stellenwert der einzelnen Mechanismen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Insbesondere ist der Zusammenhang zwischen asymptomatischen Infektionen mit *P. falciparum* und milden bis moderaten Anämien im Säuglingsalter bislang kaum untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit sollen in einem Malariaendemiegebiet in Afrika zunächst die Häufigkeit asymptomatischer Infektionen mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft und im ersten halben Lebensjahr bestimmt werden. Schwerpunkt der Arbeit ist es, den Einfluss asymptomatischer Infektionen auf die Entwicklung einer Anämie bei sechs Monate alten Säuglingen zu ermitteln. Analysiert werden sowohl die Auswirkungen plazentarer Malaria als auch die Infektionen mit *P. falciparum* im Verlauf des ersten halben Lebensjahres. Als klinische Folgen plazentarer Malaria werden insbesondere Frühgeburtlichkeit und ein niedriges Geburtsgewicht der Kinder untersucht, da auch diese mit einem erhöhten Anämierisiko einhergehen. Zur Differenzierung der in diesem Alter häufig vorkommenden Eisenmangelanämie wurden von den sechs Monate alten Säuglingen zusätzlich die Ferritin- und CRP-Werte bestimmt.

Ein genaueres Verständnis der klinischen Auswirkungen rezidivierender asymptomatischer Parasitämien ist von Bedeutung für die Erstellung von Therapieempfehlungen und in der Entwicklung und Durchführung von Malariapräventionsprogrammen insbesondere im ersten Lebensjahr, denn diese Maßnahmen beeinflussen wiederum die Entwicklung der Teilimmunität in Malariaendemiegebieten.

## 2. Probanden, Material und Methoden

### 2.1 Studiengebiet und Studienort

Ghana liegt in Westafrika am Golf von Guinea und bedeckt eine Fläche von 238.573 km<sup>2</sup>. Es wird im Westen von der Elfenbeinküste, im Osten von Togo und im Norden von Burkina Faso begrenzt. Ghanas Bevölkerung wird auf 18-20 Millionen geschätzt. Es leben ca. 100 verschiedene Ethnien in Ghana, von denen die Akan (Ashanti, Fanti, Brong) die größte Bevölkerungsgruppe bilden.

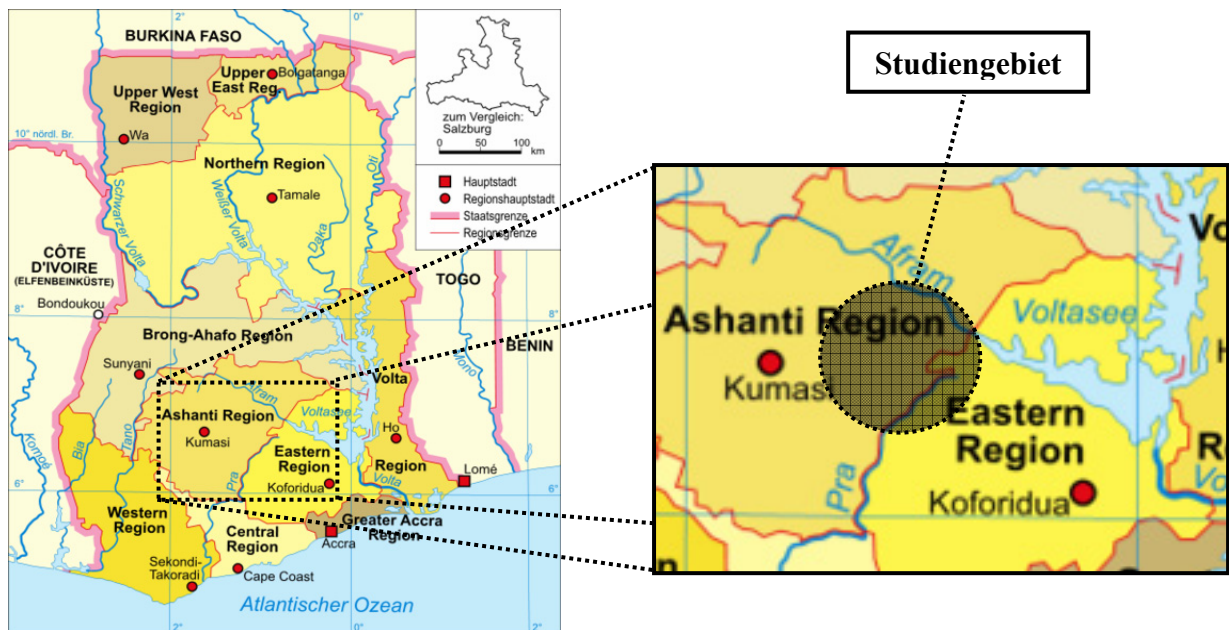


Abbildung 1. Geographische Darstellung des Studiengebietes

Die vorliegende Studie wurde am Presbyterian Mission Hospital in Agogo durchgeführt. Agogo liegt östlich von Kumasi im Asante Akim North District der Ashanti Region in Zentralghana (Abb.1). Dieser Bezirk bedeckt eine Fläche von 1.400 km<sup>2</sup>. Asante Akim ist ein ursprünglich von tropischem Regenwald geprägtes Gebiet, dessen Baumbestand jedoch durch Bergbau, Holz- und Landwirtschaft stark dezimiert wurde. In dem Bezirk leben ca. 133.000 Menschen, von denen die Mehrheit der ethnischen Bevölkerungsgruppe der Ashanti angehört. Agogo liegt in einem Gebiet mit holoendemischer Malaria-Transmission. Die Inzidenz der Malaria ist ganzjährig hoch, mit einem Maximum während der Regenzeiten von Mai-Juli sowie von Oktober-November und einem Minimum in der Trockenzeit von Januar-Februar. In über 85% der Fälle handelt es sich um eine Infektion mit *P. falciparum*, in geringerem

Maße kommen auch die Erreger *P. ovale* und *P. malariae* vor. Infektionen mit *P. vivax* sind sehr selten (Browne *et al.*, 2000).

Das Presbyterian Mission Hospital in Agogo wurde 1931 von der Baseler Mission gegründet und verfügt über ca. 230 Betten. Jedes Jahr werden 77.000 Patienten ambulant und 5000 Patienten stationär behandelt. Die Malaria stellt die häufigste Indikation sowohl für einen ambulanten als auch für einen stationären Krankenhausaufenthalt dar. Die Geburtenzahl im Presbyterian Mission Hospital beträgt ca. 800-1000 pro Jahr und die Säuglingssterblichkeit liegt bei ca. 3%.

## **2.2 Kooperationspartner und Studienteam**

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten sind Bestandteil einer Studie mit dem Thema Malaria in der Schwangerschaft und im ersten Lebensjahr. Die Studie wurde vom 24.01.2000 bis 31.07.2001 in Kooperation zwischen dem Institut für Tropenmedizin Berlin und dem Department of Medicine, School of Medical Sciences, University of Sciences and Technology, Kumasi am Presbyterian Mission Hospital in Agogo durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der School of Medical Science, University of Science and Technology, Kumasi geprüft und zur Durchführung genehmigt.

Zum Studienteam in Agogo gehörten die Mitarbeiter der Abteilung für Geburtshilfe, zwei Kinderkrankenschwestern, ein medizinisch-technischer Assistent vom Presbyterian Mission Hospital und 3 geschulte Studienhelfer. Die medizinische Betreuung der Säuglinge wurde von der Kinderärztin Frau Dr. med. von Gärtner übernommen.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten wurden während eines Aufenthaltes am Presbyterian Mission Hospital in Agogo in der Zeit vom 21.03.2000 bis zum 15.09.2000 von Frau Renate Boyé und der Verfasserin dieser Arbeit selbstständig gesammelt. Zu dem gemeinsamen Aufgabenbereich gehörten: Koordination des Studienablaufs, Gewinnung, Lagerung und Aufarbeitung der Blut- und Plazentaprobe, Bestimmung des Gestationsalters und Erhebung des klinischen Status bei den Neugeborenen und den Säuglingen (zunächst unter Supervision durch Frau Dr. med. von Gärtner), hämatologische Untersuchungen, Durchführung des Immunchromatographischen Schnelltests (ICT) und die Mikroskopie der dicken Tropfen aus dem peripheren Blut.

Im Anschluss an den Aufenthalt in Agogo wurden am Institut für Tropenmedizin Berlin die Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) zum Nachweis einer Infektion mit *P. malariae* bei 400 Proben eigenhändig durchgeführt. Die zur Komplettierung der Kohorte bis zum 6. Lebensmonat fehlenden Proben und Ergebnisse wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. Mockenhaupt und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

## **2.3 Studiendesign**

### **2.3.1 Rekrutierung der Studiengruppe**

Die Rekrutierungsphase der Studie erstreckte sich von Januar bis August 2000. Für eine Querschnittsstudie mit dem Themenschwerpunkt Malaria in der Schwangerschaft wurden insgesamt 893 Schwangere rekrutiert, die zur Entbindung in die gynäkologische Abteilung des Krankenhauses Agogo kamen. 150 der Neugeborenen wurden im Rahmen einer Längsschnittstudie insgesamt ein Jahr lang in regelmäßigen Abständen untersucht (s. 2.3.4). Schwerpunkte der Längsschnittstudie waren die Früherkennung einer Infektion mit *P. falciparum* und die Ermittlung von Risikofaktoren für eine Anämie in den ersten 6 Lebensmonaten. Einschlusskriterien waren eine Entbindung im Presbyterian Mission Hospital sowie ein studienortnaher Wohnort. Alle Studienteilnehmer wurden in der lokalen Sprache über Zweck und Ablauf der Untersuchungen ausführlich informiert und ihr Einverständnis bzw. bei den Neugeborenen das Einverständnis der Eltern, schriftlich oder per Daumenabdruck dokumentiert.

### **2.3.2 Klinische Untersuchung der Gebärenden**

Die Betreuung der Schwangeren sowie die Überwachung der Geburt erfolgte durch die Hebammen des Presbyterian Mission Hospitals. Sie dokumentierten Alter, Bildungsstand, Beruf und Anzahl der vorausgegangenen Schwangerschaften. Des Weiteren wurden Informationen über Vorsorgeuntersuchungen, eingenommene Medikamente, insbesondere über die regelmäßige Durchführung einer Malariaprophylaxe sowie evtl. aufgetretene Komplikationen während der Schwangerschaft gesammelt.

Vor der Geburt wurden Gewicht, Größe und Körpertemperatur der Gebärenden bestimmt. Es erfolgte die Erhebung eines klinischen Status inkl. Bestimmung des palpatorischen Gestationsalters. Der Geburtsmodus und peripartale Komplikationen wurden von den Hebammen protokolliert. Innerhalb eines festgelegten Zeitraumes von sechs Stunden vor bis sechs Stunden nach der Entbindung wurde den Frauen 2 ml EDTA und 5 ml zusatzfreies Blut durch die Hebammen entnommen.

Die weitere Verarbeitung der Proben (s. 2.4-2.6) erfolgte innerhalb von 24 Stunden. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Blut bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Plazenta wurde unmittelbar nach der Expulsion im Kühlschrank gelagert und innerhalb der nächsten 6 Stunden untersucht (s. 2.3.3).

### **2.3.3 Aufarbeitung und Probengewinnung aus der Plazenta**

Es wurden das Plazentabrutto- (mit Amnionhülle und Nabelschnur) und das Plazentanettogewicht (nach Entfernung von Amnionhülle und Nabelschnur) bestimmt sowie die Plazentamaße, bestehend aus Länge, Breite, Höhe und Nabelschnurrestlänge, protokolliert. Bei der morphologischen Untersuchung wurden insbesondere folgende Kriterien beurteilt: Einzel- oder Mehrlingsplazentae, Lage des Nabelschnuransatzes, Formanomalien, Kalkherde, Mekoniumreste, Verteilung der Alantoisgefäße sowie der Gefäßtyp.

Zur Blutgewinnung wurde mit einem Plazentamesser parazentral eine Inzision auf der maternalen Seite der Plazenta vorgenommen und mit Hilfe einer Spritze wurden 2 ml Blut entnommen. Um eine Kontamination von plazentarem Blut mit Nabelschnurblut zu vermeiden, erfolgte die Blutentnahme vor Durchtrennung der Nabelschnur. Das Blut wurde in ein EDTA-Röhrchen aliquotiert. Es wurden ein immunchromatographischer Schnelltest auf *P. falciparum* (ICT Malaria *P.f./P.v.*, Becton Dickinson), zwei dicke Tropfen und zwei Ausstriche angefertigt (s. 2.4). Nach Zentrifugation wurde das Plasma verworfen und das Sediment in einem Stabilisierungspuffer (1 Vol. PBS, 2 Vol. AS1, Qiagen) aufbewahrt. Im Anschluss an jede Untersuchung wurden die verwendeten Instrumente mit einmolarer NaOH-Lösung dekontaminiert.

### **2.3.4 Planung und Verlauf der klinische Untersuchungen der Kinder**

Sofort nach der Geburt wurde der Vitalzustand der Neugeborenen anhand des APGAR-Indexes nach einer, fünf und zehn Minuten bestimmt. Beurteilt wurden Hautfarbe (1), Atmung (2), Herzaktion (3), Muskeltonus (4), sowie Reflexe (5) der Neugeborenen. Für jeden der fünf untersuchten Parameter wurden zwischen 0 und 2 Punkte vergeben, so dass zu den drei Untersuchungszeitpunkten jeweils eine Punktzahl zwischen null und zehn erreichbar war (Apgar *et al.*, 1958). Innerhalb von 24 Stunden nach Geburt wurde ein klinischer Status der Neugeborenen erhoben. Gewicht, Größe, Kopfumfang und Temperatur wurden gemessen. Die Bestimmung des Gestationsalters erfolgte nach Finnström *et al.* (1977); folgende somatische Reifezeichen wurden untersucht:

1. Beschaffenheit des Ohrmuschelknorpels
2. Durchmesser der Brustdrüsen
3. Brustwarzenbildung
4. Durchsichtigkeit der Haut anhand der Venenzeichnung an der Bauchdecke
5. Länge der Fingernägel
6. Haardichte
7. Ausbildung der plantaren Hautfalten

Für jedes Reifekriterium wurde mindestens ein Punkt vergeben. Insgesamt waren maximal 23 Punkte möglich. Anhand des Punktwertes ließ sich das entsprechende Gestationsalter ermitteln. Am Ende der Untersuchung wurde den Neugeborenen 1 ml venöses EDTA-Blut abgenommen und im Labor weiter verarbeitet (s. 2.4 – 2.6). War die venöse Blutentnahme nicht möglich, wurde Kapillarblut aus der Ferse entnommen.

Ab der ersten Lebenswoche wurden die Kinder einmal wöchentlich von hierfür eingearbeiteten Studienhelfern zu Hause aufgesucht. Die Besuche dienten der Aufrechterhaltung der Studientreue und der Erfassung einfacher klinischer Symptome (Erbrechen, Durchfall, Essensverweigerung, Blässe, Infektion der oberen Atemwege). Die Körpertemperatur wurde axillär gemessen. Bestanden klinische Symptome oder betrug die Temperatur  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ , wurde eine Einweisung in die Klinik veranlasst.

Alle 4 Wochen wurden die Mütter mit ihren Kindern in die ambulante Abteilung des Agogo Krankenhauses einbestellt (Abb. 2). Mit einem Fragenkatalog wurden die Erkrankungen sowie ggfs. durchgeführte Therapien der letzten 4 Wochen erfasst.



**Abbildung 2.** *Monatlicher Untersuchungstermin im Agogo Presbyterian Hospital*

Eine allgemeine körperliche Untersuchung erfolgte durch die Kinderärztin Frau Dr. med. von Gärtner oder nach einer ausführlichen Einarbeitungszeit durch die Doktorandin. Besonderes Augenmerk bei der Untersuchung lag in der Erfassung möglicher klinischer Symptome einer Malaria sowie in der Palpation von Leber und Milz. Es wurden Größe, Gewicht und Temperatur der Kinder bestimmt. Im Anschluss an die körperliche Untersuchung wurde den Kindern 1 ml venöses EDTA-Blut abgenommen. Bei klinischen Anzeichen einer Malaria oder einer Körpertemperatur  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  wurde ein Schnelltest durchgeführt sowie ein dicker Tropfen angefertigt und sofort ausgewertet (s. 2.4). Bei einem positiven Nachweis von Plasmodien wurde unverzüglich mit der Therapie begonnen (s. 2.3.5). Bei Kindern mit unauffälligem klinischen Status wurden innerhalb von 24 Stunden die Parasitämien und die



hämatologischen Parameter (Hb, Hkt, Ery, Leuk) bestimmt (s. 2.4–2.6). Bei nachweisbarer Parasitämie wurden die Kinder zur erneuten Untersuchung und ggfs. Therapie in die Klinik einbestellt.

Bei akuter Erkrankung des Kindes wurden die Eltern gebeten, ihr Kind umgehend im Krankenhaus Agogo vorzustellen. Dort wurde zunächst ein klinischer Status erhoben. Bei Verdacht auf eine Malaria wurden einige Tropfen Kapillarblut zur Anfertigung eines Schnelltests und eines dicken Tropfens entnommen (s. 2.4). Beim Nachweis von Plasmodien im Blut wurde eine Therapie eingeleitet und dem Kind 1 ml venöses EDTA-Blut zur Bestimmung der hämatologischen Parameter (s. 2.5) entnommen. In der Tab. 1. sind die einzelnen Untersuchungen an den entsprechenden Terminen zusammengefasst.

**Tabelle 1.** *Untersuchungsprogramm an den unterschiedlichen Terminen*

	Untersuchung nach Geburt	Wöchentliche Untersuchungen	Monatlicher Kliniktermin	Untersuchung bei Erkrankung
Temperatur	+	+	+	+
Gewicht	+	-	+	-
Größe	+	-	+	-
Kopfumfang	+	-	-	-
APGAR	+	-	-	-
Gestationsalter	+	-	-	-
Dicker Tropfen	+	(+)	+	+
ICT	+	(+)	(+)	+
Hämoglobin	+	(+)	+	+
Hämatokrit	+	(+)	+	+
MCV	+	(+)	+	+
Erythrozyten	+	(+)	+	+
Leukozyten	+	(+)	+	+

„+“ = wurde immer bestimmt      „-“ = wurde nicht bestimmt  
 „(+“ = wurde bei einer Temperatur > 37,5° C bestimmt

### 2.3.5 Indikation zur Therapie beim Nachweis von *Plasmodien*

Kriterien für eine Therapie bei den Müttern waren ein mikroskopischer Nachweis von *Plasmodien* im peripheren Blut und eine Körpertemperatur  $\geq 37,5^\circ \text{C}$ . Es erfolgte eine Behandlung mit Chloroquin in einer Dosierung von 10 mg Chloroquin pro/kg p.o.. Nach 6

Stunden sowie am 2. und 3. Tag wurden 5 mg pro/kg p.o. verabreicht. Bei Bedarf wurde zusätzlich Paracetamol p.o. verordnet.

Bei den Kindern wurde bei einem Nachweis von *Plasmodien* im Blut und einer Temperatur  $\geq 37,5^\circ \text{C}$  oder einem Hämoglobin-Wert  $< 7 \text{ mg/dl}$  eine Therapie mit Chloroquin in einer Gesamtdosis von 25 mg pro/kg verteilt auf drei Tage im Verhältnis 2:1:1 durchgeführt. Bei Bedarf erhielten die Kinder zusätzlich Paracetamol p.o. oder rect.. Waren nach einer Woche noch Parasiten nachzuweisen, wurde Sulfadoxin-Pyrimethamin verabreicht oder bei verschlechtertem klinischen Zustand Chininhydrochlorid.

## **2.4 Vor Ort angewandte Methoden zur Bestimmung der Parasitämien**

Zum Nachweis von Plasmodien wurden ein *Immunchromatographischer Schnelltest* (ICT Malaria *P.f./P.v.*®, Becton Dickinson, Heidelberg), 2 dicke Tropfen, sowie 2 Ausstriche angefertigt.

### **2.4.1 Durchführung des Immunchromatographischen Schnelltestes (ICT)**

Mit dem ICT ist ein qualitativer Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* oder *P. vivax* möglich. Das Testprinzip ist ein Streifentest, bei dem spezifische Antigene nachgewiesen werden. Er funktioniert auf der Basis zwei verschiedener Antikörper (AK). Der erste AK bindet selektiv an das *P. falciparum* Histidin-reiche-Protein-2 (PfHRP-2). Dies ist ein wasserlösliches Protein, welches nur von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten produziert wird (Howard *et al.*, 1986). Der zweite AK bindet an Aldolase, welche von allen vier humanpathogenen Plasmodienspezies gebildet wird.

Auf einer speziellen Testfeldmembran sind AK immobilisiert an kolloidalem Gold gebunden. Während des Tests reagieren Bestandteile des Vollblutes mit dem Goldkonjugat. Die Flüssigkeit wandert durch Kapillarwirkung weiter und reagiert dann bei Anwesenheit von Malariaantigen mit dem PfHRP-2- u./o. dem Aldolase-AK. Nach Applikation eines Puffers bleiben nur die gebundenen Antigen-Antikörperkomplexe im Testfeld sichtbar. Anhand der verbleibenden Querstreifen kann abgelesen werden, ob eine Infektion mit *P. falciparum* u./o. *P. vivax* besteht oder ob kein Malariaantigen nachweisbar ist. Bei korrekter Testdurchführung erscheint eine Kontrollbande.

### **2.4.2 Mikroskopische Bestimmung der Parasitämie**

Für jede Blutprobe wurden vier Präparate zur Bestimmung der Parasitämie angefertigt. Zur Erstellung der dicken Tropfen wurden jeweils 2 x 5  $\mu\text{l}$  des mit EDTA versetzten Blutes auf je zwei Objektträger aufgebracht, mit einer Pipettenspitze kreisförmig verteilt und für 30

Minuten an der Luft getrocknet. Ein Objektträger wurde dann unfixiert 15-20 Minuten lang in 4 % vol./vol. Giemsa in Titrisol-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,2 (Merck) gefärbt und anschließend mit Titrisol- Pufferlösung abgespült. Nach erneuter Lufttrocknung erfolgte die Auszählung der Parasiten in eintausendfacher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv eines Lichtmikroskops (Wilozyt, Will, Wetzlar). Der zweite Objektträger wurde ungefärbt bei Raumtemperatur für eventuelle Nachzählungen asserviert. Bei den peripheren venösen Blutproben der Mütter und Kinder wurde jeweils die Anzahl der asexuellen Parasiten auf 500 Leukozyten bestimmt. Die Parasitämie (Parasiten/ $\mu$ l Blut) wurde aus der Zahl der Leukozyten pro Mikroliter Blut und der Anzahl der ausgezählten Plasmodien rechnerisch ermittelt.

Die Bestimmung der Parasitämie der plazentaren Blutproben wurde von Herrn PD Dr. med. Mockenhaupt durchgeführt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung der Parasitämie erfolgte eine Auszählung pro 100 Blickfelder, und der Nachweis von Pigment in Phagozyten wurde dokumentiert (vorhanden/ nicht vorhanden).

Zusätzlich wurden für alle Blutproben Ausstriche angefertigt. Für die Ausstriche wurden 5  $\mu$ l EDTA-Blut an einem Ende eines Objektträgers aufgetragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers in einem Winkel von ca. 45° ausgestrichen, so dass die Blutzellen einschichtig nebeneinander lagen. Anschließend wurde der Ausstrich luftgetrocknet und eine Minute lang in Methanol fixiert. Die weitere Auswertung der Ausstriche erfolgte am Tropeninstitut Berlin.

## **2.5 Bestimmung der hämatologischen Parameter**

An hämatologischen Parametern wurden innerhalb von 12 Stunden nach der Blutentnahme der Hämoglobingehalt (Hb), der Hämatokrit (Hkt), das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV), die Erythrozyten-(Eryz) sowie die Leukozytenzahl (Leukz) gemessen.

Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes erfolgte mittels eines Photometers (HemoCue, Angelholm, Schweden). Die Funktion des Photometers beruht auf der Oxidationsbereitschaft des Hämoglobins zu Hemoglobin durch Natrium-Nitrosium und der Konversion von Hemoglobin zu Hemoglobinazid durch Natriumazide. Für die Hämoglobinbestimmung wurden 15  $\mu$ l Blut in eine vom Hersteller gelieferte Mikroküvette aufgesogen und in das Photometer eingelegt. Die Eichung des Photometers erfolgte täglich nach Anleitung des Herstellers mit einer dafür vorgesehenen Eichküvette.

Die anderen Parameter wurden mittels eines halbautomatischen Zellzählgerätes (HC555, Clinicon, Mannheim) bestimmt. Hierfür wurden 40  $\mu$ l EDTA-Blut in 10 ml isotoner Flüssigkeit verdünnt und gemischt (1. Verdünnung). Von dieser Suspension wurden wiederum 40  $\mu$ l in 10 ml isotone Flüssigkeit pipettiert und ebenfalls gut durchmischt (2.

Verdünnung). Die Zellen wurden nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung vereinzelt. Hierfür wurden die Zellen durch einen Elektrolytstrom vereinzelt angesaugt und durch die Messzelle transportiert. Dabei wurde die Zellzahl nach dem Impedanzprinzip ermittelt. Bei einem anliegenden Gleichstrom kommt es zu einer Widerstandserhöhung sobald Partikel (Erythrozyten, Leukozyten) in der Elektrolytlösung erscheinen. Die Bestimmung der Impulshäufigkeit erlaubt eine Quantifizierung der Zellzahl.

Zunächst erfolgte eine Messung mit der 1. Verdünnung. Der MCV ergibt sich aus dem Mittelwert der den Widerstandsänderungen entsprechenden Einzelvolumina. Der Hämatokrit entspricht der Addition der Einzelvolumina in Bezug zum Gesamtvolumen.

Zur Messung der Erythrozytenzahl wurde die 2. Verdünnung verwendet und die Leukozyten als vernachlässigbare Größe miteinbezogen. Danach wurden zur Bestimmung der Leukozytenzahl 6 Tropfen Hämoglobin Lysing Reagenz (Clinicon) in die 2. Verdünnung hinzugefügt. Durch diese cyanidhaltige Reagenz wurden die Erythrozyten lysiert, so dass nur die Leukozytenkerne zur Messung in der Suspension verblieben. Nach jeder Messung wurde das Gerät entsprechend den Anweisungen des Herstellers Clinicon gereinigt und geeicht.

## **2.6 Aufbereitung der Blutproben für spätere Analysen**

5 ml zusatzfreies Blut der Schwangeren wurden zentrifugiert. Serum und Sediment wurden getrennt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Das mit EDTA versetzte Blut von Schwangeren, Kindern und Plazenten wurde ebenfalls zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. 90  $\mu\text{l}$  des Sedimentes wurden zusammen mit 270  $\mu\text{l}$  Stabilisierungspuffer in einem Eppendorfröhrchen vermischt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der Puffer ist ein 2:1 Gemisch von guanidiumhydrochloridhaltigen Puffer (AS1, Quiagen) und PBS (phosphatbuffer-saline). Das restliche Sediment wurde bei  $4-8^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank gelagert. Der Transport der Proben nach Berlin erfolgte auf Trockeneis.

## **2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR: polymerase chain reaction) ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen. Die Erstbeschreibung einer PCR erfolgte im Jahre 1985 durch Saiki *et al.*. Acht Jahre später beschrieben Snounou *et al.* (1993) eine PCR zum Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum*. Die folgende Beschreibung beruht auf diesen beiden Arbeiten.

Mit der PCR ist eine enzymatische Synthese (Amplifikation) einer DNA-Matrize (Template) möglich. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei nacheinander ablaufenden Schritten:

- 1.) Denaturierung: Durch Erhitzen der doppelsträngigen Template-DNA erfolgt die Aufspaltung in deren Einzelstränge.
- 2.) Annealing: Bei einer bestimmten Temperatur erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide (Primer) an die jeweils komplementären Abschnitte der DNA-Matrize, wodurch der Startbereich für die DNA-Polymerase definiert wird.
- 3.) Elongation: Ausgehend vom 3`-Ende des Primers synthetisiert die DNA-Polymerase anhand des Templates einen neuen komplementären DNA-Strang.

Es werden zwischen 25 und 40 Zyklen durchgeführt. Da auch der bereits amplifizierte Strang als Matrize dient findet eine exponentielle Vermehrung des DNA-Fragmentes statt. Am Ende entstehen  $10^4$ - $10^7$  DNA-Kopien (Amplikons), die sich mittels Gel-Elektrophorese auftrennen lassen.

### **2.7.1 Extraktion von genomischer DNA aus den Blutproben**

Für die Durchführung der PCR wurde zunächst aus den peripher venösen und plazentaren Blutproben genomische DNA extrahiert. Mit dem hier beschriebenen Verfahren ist es möglich aus 90 µl Blutsediment ca. 6 µg genomische DNA zu extrahieren. Das Prinzip der Extraktion von DNA aus Blut beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren in Anwesenheit der chaotropen Substanz Guanidiniumhydrochlorid an Silikatmoleküle zu binden. Zunächst wurden die Zellen durch Proteinase K und Guanidiniumhydrochlorid lysiert. Anschließend konnten die freien Nukleinsäuren an Silikatmoleküle binden. Nach Durchführung mehrerer Waschschrte mit alkoholischen Lösungsmitteln konnte die Elution der DNA in eine wässrige Lösung erfolgen (Gillespie & Hardman, 1979).

Die Extraktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: 200 µl Blutpuffergemisch (90 µl Blut + 90 µl PBS + 180 µl AS1), 200 µl Lyse-Puffer und 25 µl Proteinase K wurden mittels eines Vortexgerätes durchmischt. Danach wurde die Probe für 10 min. bei 70° C inkubiert und anschließend mit 210 µl absolutem Ethanol versetzt. Die Probe wurde nun auf eine mit Silikatfilter versehene Zentrifugationssäule mit Auffanghülse (Mikrospin columns, Qiagen) pipetiert und bei 8000 UpM für 1 min. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit 500 µl Waschpuffer, erneuter Zentrifugation und Verwerfung des Filtrats. Nach Zugabe von 100 µl Elutionspuffer oder 10 mM Tris-HCL (pH 9,0) wurde die Probe bei 70° C für 5 min. inkubiert. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min. konnte die Elution der Nukleinsäuren erfolgen.

Verwendet wurde das QIAmp Blood Kit (Qiagen) bestehend aus:

- 1) Lyse-Puffer (AL): Wässrige Lösung von Guanidiniumhydrochlorid
- 2) Proteinase-K: Aus *Titrachium album*, 1,1 g/ml
- 3) Waschpuffer (AW): Ethanolsche Lösung von NaCL und  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCL
- 4) Elutionspuffer (AE): Wässrige Lösung von NaCL und  
Tris(hydroxymethyl)-amoniummethan/HCL

Genauere Konzentrationsangaben liegen nicht vor.

### **2.7.2 Protokoll der PCR zum Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* und *P. malariae***

Im folgenden wird sowohl auf die diagnostische PCR zum Nachweis von *P. falciparum* Bezug genommen, da diese Ergebnisse wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, als auch auf die diagnostische PCR zum Nachweis von *P. malariae*, da diese von der Verfasserin der Arbeit eigenständig durchgeführt wurden.

Die PCR zum Nachweis von Plasmodien beruht auf zwei Schritten. Der erste Schritt ist für alle humanpathogenen Plasmodienspezies identisch. Bei dem 1. Schritt, bezeichnet als „outer-PCR“, erfolgte die Amplifikation des plasmodiumspezifischen Gens, welches für die Ribonukleinsäure der kleinen Untereinheit des parasitären Ribosoms codiert (ssrRNA-Gen). Die Amplifizierung des ssrRNA-Genes erfolgte mit den Primern rPUL5 und rPUL6. In einem 2. Schritt, bezeichnet als „nested-PCR“, wurden 0,5 µl des im 1. Schritt entstandenen Amplifikats als Matrize für die Amplifikation spezifischer Bereiche des ssrRNA-Genes der Spezies *P. falciparum* bzw. *P. malariae* verwendet. Als Primer dienten je nach Plasmodienspezies rFAL1 und rFAL2 für *P. falciparum* bzw. rMAL1 und rMAL2 für *P. malariae*. Die Reaktionsansätze sind bis auf die jeweils spezifischen Primer identisch. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Reaktionsansätze in einem PCR-Röhrchen mit Stempeldeckel (Sarstedt) auf einer sterilen DNA-freien Arbeitsbank wie folgt erstellt:

1. 50 µl Reaktionspuffer
2. 500 mM dNTP`s
3. 1,5 U der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
4. je 200 mM der entsprechenden Primer
5. 0,5 µl DNA bzw. 0,5 µl des Amplifikats aus Schritt 1

Die Amplifikation erfolgte in einem automatischen PCR-Wechseltemperaturgerät (Triothermoblock, Biometra). Die hierfür erforderlichen aufeinanderfolgenden Schritte sind

bei der „outer-PCR“ und der „nested-PCR“ identisch und wurden entsprechend dem vorliegenden Protokoll durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung bei 95° C für 5 Minuten
2. 25 Zyklen nach folgendem Schema:
  - 2.1 Denaturierung bei 94° C für 1 Minute
  - 2.2 Annealing (Primeranlagerung) bei 58° C für 2 Minuten
  - 2.3 Elongation bei 72° C für 2 Minuten
  - 2.4 Abschließende Elongation bei 72° C für 5 Minuten

Das spezifische Amplifikationsprodukt für *P. falciparum* hat eine Länge von 205 Basenpaaren (bp) und das spezifische Amplifikationsprodukt für *P. malariae* eine Länge von 144 bp. Der Längennachweis erfolgt durch Gel-Elektrophorese (s. 2.7.3).

#### Verwendete Substanzen:

1. Taq- DNA-Polymerase (Pharmacia): 5000 U/l
2. Deoxynukleotidtriphosphate (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia): 25 mM Deoxyadenosintriphosphat (dATP), 25 mM Deoxycytosintriphosphat (dCTP), 25 mM Deoxythymidintriphosphat (dTTP), 25 mM Deoxyguanidintriphosphat (dGTP)
3. Reaktionspuffer (50 mM KCL, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCL, pH 9,0)
4. Primer (MWG Biotech)  
rPUL 5 (5`-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3`)  
rPUL6 (5`-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3`)  
rFAL1 (5`-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3`)  
rFAL2 (5`-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3`)  
rMAL1 (5`-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3`)  
rMAL2 (5`-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3`)

### **2.7.3 Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Moleküle mittels Agarose-Gel-Elektrophorese**

DNA-Moleküle und ihre Fragmente wandern bei einem neutralem pH-Wert in einem elektrischen Feld stets von der Kathode zur Anode, da die Fragmente aufgrund der Aminogruppen negativ geladen sind. Bei der Agarose-Gel-Elektrophorese findet diese Wanderung durch Poren statt. Dabei werden die größeren Moleküle stärker in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt als die kleineren Moleküle. Somit findet eine Auftrennung des DNA-Gemisches aufgrund der Molekülgröße statt. Die Trennschärfe dieser Methode hängt von der Porengröße, der anliegenden Spannung und der Laufdauer ab.

Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt. Diese Substanz interkaliert mit den DNA-Molekülen und fluoresziert im ultravioletten Licht. Zur Abschätzung der Größe der untersuchten Proben wurde gleichzeitig eine Auftrennung von DNA-Molekülen mit bekannter Basenpaarlänge durchgeführt.

Der Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese lag das modifizierte Protokoll von Sharp *et al.* (1973) zugrunde:

1. Herstellung eines 1,5 % Agarosegels durch Schmelzen von 0,7 g Agarose in 40 ml 0,5 % TBE-Puffer in der Mikrowelle
2. Zusatz von 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (0,2 µl/ml)
3. 7 µl des PCR-Produktes wurden mit 0,8 µl Blaumarker versetzt und in die Taschen des festen Gels pipettiert
4. Parallele Auftragung von 2 µl standardisiertem Längenmarker
5. Durchführung der Elektrophorese in einer Minigelkammer (Biorad) bei einer Spannung von 8 V/cm für 20 Minuten
6. Darstellung der fluoreszierenden Banden im durchscheinenden UV-Licht (254 nm) und Dokumentation mit Polaroidfotos.

#### Verwendete Substanzen:

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

### **2.8 Messung von fetalem Hämoglobin (HbF), Ferritin und C-reaktivem Protein (CRP)**

Die Messungen der oben genannten Parameter wurden von der Verfasserin nicht selbstständig durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der quantitative Nachweis von HbF erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC). Die Analysen wurden im Nationalen Hämoglobin Referenzlabor der Universitätskinderklinik Ulm unter der Leitung von Frau Prof. Kohne durchgeführt.

Die Messung des Ferritins und des CRPs erfolgte mittels Immunturbodimetrie im Labor des Unfallkrankenhauses Berlin.



## **2.9 Statistische Berechnungen**

Die Grundlagen der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen basieren auf dem Lehrbuch „Medizinische Statistik“ von Trampisch und Windeler. Die verwendeten Programme waren Excel (Microsoft) oder StatView (SAS Institut). Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung oder als Median und Bereich angegeben bzw. Absolutzahl/Prozente.

### **2.9.1 Assoziationsberechnungen**

Um Assoziationen zwischen Variablen nominaler Merkmalsausprägung zu überprüfen, wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Als Grundlage wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  formuliert. Diese traf zu bei voneinander unabhängigen Merkmalen. Bei nicht zutreffender Nullhypothese wurden über die 2 x 2-Kontingenztafel (Vier-Felder-Tafel) die Häufigkeiten der Merkmalsausprägungen analysiert und als Signifikanztest wurde der Chi-Quadrat- $(\chi^2)$ -Test durchgeführt. Bei zu kleinem Stichprobenumfang oder bei zwei unbekanntem Parametern wurde Fisher's exakter Test für 2 x 2 -Kontingenztafeln durchgeführt. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95 % gearbeitet. Mit dem  $\chi^2$ -Test für Trend wurden Assoziationen zwischen den Gruppen zusammengefasst, also ordinale Variablen bestimmt. Statistische Unterschiede zwischen normal verteilten stetigen Variablen wurden mittels des Student's t-Test ausgewertet. Bei dem Test werden die Mittelwerte zweier Stichproben unter Berücksichtigung von zufälligen Schwankungen verglichen. Lagen stetige Variablen nicht parametrischer Verteilung vor, erfolgten die Berechnungen mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dies ist ein Rangzeichentest für unverbundene Stichproben. Er testet, ob die Verteilungen zweier unterschiedlicher Grundgesamtheiten übereinstimmen. Bei beiden Tests wurde erneut mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  die Nullhypothese formuliert, dass zwischen zwei verglichenen Messreihen kein Unterschied bestand. Für den Vergleich von mehreren unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Hierbei handelt es sich um ein auf Rängen basierendes nichtparametrisches Pendant zur einfaktoriellen Varianzanalyse. Die Nullhypothese beinhaltet identische Verteilungen aller Gruppen. Mit Hilfe der logistischen Regression wurde der Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen auf eine binäre abhängige Zielgröße untersucht. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell bei der Analyse der Risikofaktoren für das Auftreten einer Anämie verwendet. Mit der multivariaten Analyse wurden die in der univariaten Analyse statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Variablen getestet. Die adjustierte Odds ratio mit zugehörigen 95% Konfidenzintervall beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Merkmal mit der untersuchten Zielgröße assoziiert ist.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Klassifizierung der Studiengruppe**

Zwischen Januar und August 2000 wurden insgesamt 150 Neugeborene für diese prospektive Längsschnittstudie rekrutiert. Sie wurden bis zu ihrem ersten Lebensjahr einmal monatlich im Presbyterian Mission Hospital in Agogo untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten der Kinder in den ersten 28 Lebenswochen sowie die Untersuchungsergebnisse ihrer Müttern analysiert. Von der Auswertung ausgeschlossen wurden Kinder, die mehr als zwei der sieben regulären Kliniktermine nicht wahrnahmen, sowie Zwillinge. Ein Kind verstarb während des Untersuchungszeitraumes außerhalb des Krankenhauses. Eine Malaria als Todesursache konnte ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden die Daten von 136 Kindern und deren Müttern analysiert. Somit wurden 9,3 % der Kinder für die Auswertung nicht berücksichtigt.

#### **3.2 Deskription der Kenndaten**

##### **3.2.1 Deskription der Kenndaten der Schwangeren**

Von den 136 in die Studie aufgenommenen Frauen lebten 120 (88,2 %) in Agogo und 16 (11,8 %) in den umliegenden Dörfern. Für die weitere Auswertung wurden die Frauen nach der Anzahl ihrer Geburten in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus 53 (39,0 %) Primiparae. Die zweite Gruppe umfasste die 47 (34,5 %) Frauen, die ihr zweites oder drittes Kind gebären. Die 36 (26,5 %) Mütter, bei denen es sich mindestens um die vierte Parität handelte, wurden in einer dritten Gruppe zusammengefasst. In allen drei Gruppen hatten die Schwangeren durchschnittlich viermal die Schwangerschaftsvorsorge im Krankenhaus besucht. Die Frauen hatten im Mittel eine vierjährige Schulausbildung absolviert. Bezüglich des Bildungsstandes und der Anzahl der Vorsorgeuntersuchungen war kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar.

Insgesamt waren 126 (92,6 %) der Geburten Spontangeburt, bei 10 (7,4 %) Schwangeren wurde eine Sectio caesarea durchgeführt. Zwischen der Anzahl der Schwangerschaften und dem Geburtsmodus bestand keine Assoziation ( $p=0,115$ ). Ursache für die Sectiones caesareae war in allen Fällen ein vorzeitiger Blasensprung unklarer Genese. Zwei der Primiparae hatten bei der Geburt Fieber (Körpertemperatur  $\geq 37,5^\circ \text{C}$ ) unklarer Genese. Weitere Daten der Mütter sind für die einzelnen Gruppen in der Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2.** *Kenndaten der Schwangeren in Median und Bereich*

Gruppe	1. Parität (n=53)	2./3. Parität (n=47)	≥4. Parität (n=36)	Total (n=136)
Alter in Jahren	19*	25*	31,5*	25
Median	(15-30)	(19-35)	(22-38)	(15-38)
(Bereich)				
Körpergewicht in kg	58	60	61	60
Median	(45-77)	(40-102)	(48-92)	(40-102)
(Bereich)				
Körpergröße in cm	160	160	159	160
Median	(146-174)	(140-170)	(148-175)	(140-175)
(Bereich)				
Gestationsalter in Wochen	36*	37*	37*	36
Median	(28-40)	(30-41)	(32-42)	(28-42)
(Bereich)				
Geburtsmodus	2 (3,8%)	5 (10,6%)	3 (8,3%)	10 (7,4%)
Anteil der Sectiones				
Plazentabruttogewicht <sup>1</sup> in g	525*	557,5*	612,5*	550,5
Median	(305-725)	(303-873)	(401-1024)	(303-1024)
(Bereich)				
Plazentanettogewicht <sup>2</sup> in g	411,5*	441,5*	497,5*	435,5
Median	(260-580)	(233-780)	(312-834)	(233-834)
(Bereich)				

\* p&lt;0,05 Kruskal-Wallis-Test

<sup>1</sup> Plazentagewicht mit Nabelschnur und Eihaut <sup>2</sup> Plazentagewicht ohne Nabelschnur und Eihaut

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren im Alter der Mütter (p<0,001) und in dem vor der Geburt palpatorisch ermittelten Gestationsalter (p<0,001) festzustellen. Zusätzlich hatte die Parität einen signifikanten Einfluss auf das Gewicht der Plazentae, sowohl auf das Bruttogewicht (p<0,001) als auch auf das Nettogewicht (p<0,001). Eine Assoziation zwischen einer plazentaren Malaria und dem Plazentagewicht bestand nicht (p=0,65). Bezüglich des Körpergewichtes (p=0,08) und der Körpergröße (p=0,9) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

### 3.2.2 Deskription der Kenndaten der Neugeborenen

Von den 136 Neugeborenen waren 62 (45,6 %) weiblich und 74 (54,4 %) männlich. Beeinflusst durch das Geschlecht der Neugeborenen waren die Körpergröße und der Kopfumfang. Mit 49,3 cm (40-55) waren die Jungen im Schnitt 0,6 cm größer als die Mädchen (p=0,03; Mann-Whitney-U-Test) und der Kopfumfang der Jungen lag mit 34 cm (30-37,5) 0,7 cm über dem Kopfumfang der Mädchen (p=0,03; Mann-Whitney-U-Test). Die erhobenen Daten der Neugeborenen sind in der Tab. 3 dargestellt.

**Tabelle 3.** *Kenndaten der Neugeborenen in Median und Bereich*

Kenndaten	Verhältnis Weiblich/ Männlich	Apgar <sup>1</sup> 1/5/10 min.	Gestations- alter <sup>2</sup> in Wochen	Gewicht in Gramm	Größe in cm	Kopfumfang in cm
Neu- geborene (n=136)	62/74	8/9/10 (1-10)	38/3 (32-42/2)	2895 (1630-4500)	49 (40-55)	34 (29-37,5)

<sup>1</sup> der Apgar-Index nach 1, 5 und 10 Minuten nach der Geburt (Apgar et al. 1958)

<sup>2</sup> das Gestationsalter wurde 12 Stunden nach der Geburt nach Finnström et al. (1977) ermittelt.

Bei dem Apgar-Wert, dem Gestationsalter und dem Gewicht war kein Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellbar. An klinischen Parametern wurde bei den Neugeborenen die Körpertemperatur gemessen, die durchschnittlich  $36,6^{\circ}\text{C} \pm 1,1^{\circ}\text{C}$  betrug. Insgesamt hatten 6 der 136 Kinder (16,7 %) bei der Geburt Fieber unklarer Genese. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Temperatur der Neugeborenen und der Temperatur der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt oder einer maternalen Infektion mit *P. falciparum*.

Von den 136 Neugeborenen waren 24 (17,6 %) Frühgeborene (Gestationsalter < 37. Woche) und 22 (16,2 %) hatten ein reduziertes Geburtsgewicht (< 2500 g). 15 (11 %) der Frühgeborenen fielen gleichzeitig in die Gruppe der Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht. Als Risikofaktoren für eine Frühgeburt u./o. ein niedriges Geburtsgewicht wurden der Einfluss einer maternalen Infektion der Mutter mit *P. falciparum* sowie die Anzahl der vorausgegangenen Paritäten untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tab. 4 zusammengefasst. Die Neugeborenen der Mütter mit positivem *P. falciparum* Nachweis im plazentaren Blut mittels PCR hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt ( $p=0,04$ ), jedoch nicht für ein erniedrigtes Geburtsgewicht ( $p>0,9$ ). Bei den Primiparae war sowohl die Wahrscheinlichkeit, dass das Neugeborene vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche geboren wurde ( $p=0,005$ ) als auch dass es bei Geburt < 2500 g wog ( $p=0,004$ ), signifikant erhöht. Keinen signifikanten Einfluss auf das Gestationsalter und das Geburtsgewicht hatte eine maternale Anämie zum Zeitpunkt der Geburt. Von den 24 Neugeborenen, die vor der vollendeten 37. SSW zur Welt kamen, hatten 9 (37,5 %) Mütter eine Anämie vs. 15 (62,5 %) nicht-anämischer Mütter ( $p=0,4$ ;  $\chi^2$ -Test). Bei den 22 Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht < 2500 g konnte bei 8 (36,4 %) Müttern eine Anämie nachgewiesen werden. Die anderen 14 (63,6 %) Mütter zeigten keine laborchemischen Anzeichen einer Anämie ( $p=0,5$ ;  $\chi^2$ -Test).

**Tabelle 4.** Korrelation von Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht mit einer plazentaren Infektion bzw. der Parität der Mutter

	Frühgeborene <sup>1</sup> (n=24)	Geburtsgewicht < 2500 g (n=22)
Infizierte Mütter <sup>2</sup>	18 (75 %)	12 (54,5 %)
Nicht-infizierte Mütter	6 (25 %)	10 (45,5 %)
p-Wert ( $\chi^2$ -Test)	0,04	0,89
Primiparae	17 (70,8%)	16 (72,7%)
Multiparae	7 (29,2%)	6 (27,3%)
p-Wert ( $\chi^2$ -Test)	0,005	0,0004

<sup>1</sup> Frühgeborene: Gestationsalter < 37 Wochen

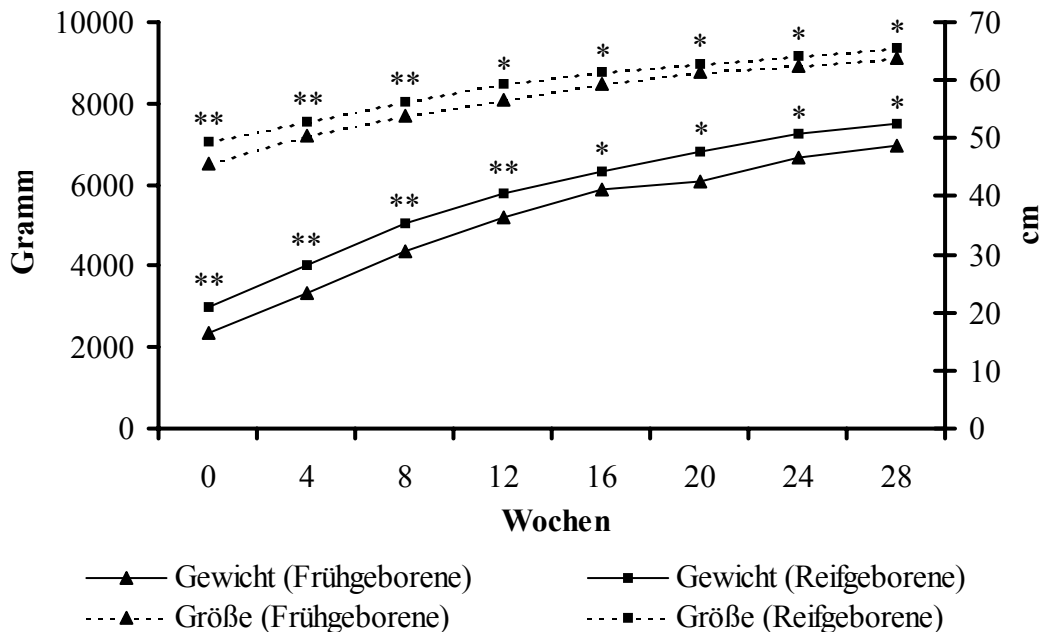
<sup>2</sup> *P. falciparum* Nachweis mittels PCR im plazentaren Blut

### 3.2.3 Deskription der Kenndaten der Säuglinge

Für die Beschreibung der Daten der Kinder im ersten halben Lebensjahr wurden die an den monatlichen Terminen gesammelten Befunde zu Gruppen zusammengefasst. Zu keinem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Körpergröße oder dem Körpergewicht und einer gleichzeitig bestehenden Infektion mit *P. falciparum*. Auch eine plazentare Infektion der Mutter mit *P. falciparum* übte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum und das Gewicht der Kinder im ersten halben Lebensjahr aus. In den ersten beiden Monaten waren Kinder der Primiparae im Schnitt um  $1,36 \pm 0,23$  cm signifikant kleiner und mit  $424 \pm 0,624$  g signifikant leichter als die Kinder der Multiparae. Ab der 12. Woche bestand kein signifikanter Unterschied mehr. Lediglich der Unterschied zwischen der Körpergröße und dem -gewicht von Früh- und Reifgeborenen blieb im Verlauf des gesamten ersten halben Lebensjahres signifikant. Die Frühgeborenen waren im Mittel 2,4 cm kleiner und 615,1 g leichter als ihre reifgeborenen Altersgenossen. Die Verläufe der Körpergröße und des -gewichts sind daher getrennt nach dem Gestationsalter in der Abbildung 3 dargestellt.

Die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Monat reduzierte sich von im Mittel 1026 g im 1. Monat auf 246 g im 6. Monat. Ausgehend von einer mittleren Gewichtszunahme von 750 g im 1.-3. Monat und 450 g im 3.-12. Monat (Keller *et al.*, 1991) lag die Gewichtszunahme ab der 20. Woche unterhalb der Norm. Das Längenwachstum beträgt vom 1.-3. Monat 3 cm und vom 4.-12. Monat 2 cm (Keller *et al.*, 1991). Im Rahmen dieser Studie lagen die mittleren monatlichen Größenzunahmen bei den Reifgeborenen ab der 16. Woche unterhalb der Norm.

**Abbildung 3.** Verlauf von Körpergewicht und -größe im ersten halben Lebensjahr unterteilt nach dem Gestationsalter (Median)



\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-U-Test

Vergleicht man Gewicht und Größe für Jungen und Mädchen getrennt mit den Referenzwerten der WHO (2006) so lagen durchschnittlich alle Werte zwischen der 15 % und der 50 % Perzentile. Die Körpergröße der Jungen war gegenüber der Körpergröße der Mädchen über den gesamten Beobachtungszeitraum im Mittel um  $1,58 \pm 0,54$  cm signifikant erhöht ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test). Das Körpergewicht der Jungen war von der 4.-28. Woche um durchschnittlich  $656,5 \pm 193,2$  g signifikant höher ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test) als bei den Mädchen.

### 3.2.4 Deskription der Kenndaten der Säuglinge an den Notfallambulanzvorstellungen

Außerhalb der regulär geplanten Kliniktermine wurden 47 Studienkinder in der Ambulanz der Kinderklinik vorgestellt. Der Median des Alters der Kinder war 19 Wochen (2-26 Wochen). Die häufigsten Gründe für die Konsultation waren Fieber und allgemeine Erkältungszeichen. Der Median der Körpertemperatur der Kinder betrug  $38^\circ \text{C}$  ( $36,6^\circ \text{C}$ - $40^\circ \text{C}$ ). Insgesamt hatten 33 (71,4 %) Kinder bei der Vorstellung Fieber (Körpertemperatur  $\geq 37,5^\circ \text{C}$ ).

### 3.3 Prävalenz einer Infektion mit *P. falciparum*

#### 3.3.1 Prävalenz einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* bei den Schwangeren

Wie den Tabellen 5a und 5b zu entnehmen ist, variierten die Ergebnisse der unterschiedlichen Diagnostikmethoden beim Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* erheblich. Die häufigsten positiven Befunde im peripheren Blut der Mutter konnten mittels PCR diagnostiziert werden, gefolgt von ICT und Mikroskopie. Bei allen Proben, bei denen das PCR Ergebnis negativ war, konnten auch mikroskopisch keine Plasmodien nachgewiesen werden.

**Tabelle 5 a.** Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* im peripheren Blut der Schwangeren in Abhängigkeit von der Parität mittels Mikroskopie, ICT und PCR

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; transform: rotate(-45deg); transform-origin: center;"> <b>Gruppen</b> <b>Methode</b> </div>	1. Parität (n=53)	2./3. Parität (n=47)	≥ 4. Parität (n=36)	Total (n=136)	p-Wert ( $\chi^2$ für Trend)
Mikroskopie (n=136)	9,6 %	3,7 %	1,4 %	14,7 %	0,03
ICT (n=128)	15,6 %	11,7 %	3,9 %	31,2 %	0,04
PCR (n=136)	21,3 %	17,6 %	7,4 %	46,3 %	0,03

Betrachtet man die Ergebnisse aus dem plazentaren Blut ergab sich ein ähnliches Bild. Die PCR erbrachte in 76 (55,9 %) der Fälle ein positives Ergebnis für *P. falciparum*. Danach folgte der ICT mit 48 (35,4 %) und die Mikroskopie mit 41 (30,1 %). Für die weiteren Berechnungen wurden alle Mütter als infiziert betrachtet, bei denen eine Infektion mit *P. falciparum* im plazentaren Blut mit der PCR nachweisbar war. Nach dieser Definition waren von den Infektionen 35 (46,1 %) submikroskopisch, d.h. die *Plasmodien* waren nur mit der PCR nachweisbar.

**Tabelle 5 b.** *Nachweis einer Infektion mit P. falciparum im plazentaren Blut der Schwangeren in Abhängigkeit von der Parität mittels Mikroskopie, ICT und PCR*

<b>Methoden</b> \ <b>Gruppen</b>	1. Parität (n=53)	2./3. Parität (n=47)	≥ 4. Parität (n=36)	Total (n=136)	p-Wert* ( $\chi^2$ für Trend)
Mikroskopie (n=136)	15,4 %	11,8 %	2,9 %	30,1 %	0,01
ICT (n=127)	18,1 %	12,6 %	4,7 %	35,4 %	0,02
PCR (n=136)	25,7 %	19,2 %	11,0 %	55,9 %	0,02

Wie aus den beiden Tabellen (5a und b) hervorgeht, waren die Primiparae signifikant häufiger mit *P. falciparum* infiziert als die Multiparae. Mit steigender Zahl der Paritäten sank die Anzahl der infizierten Schwangeren signifikant ab. Dieser Abfall konnte für alle Nachweismethoden beobachtet werden.

Die maternalen Proben wurden mit der PCR auf Infektionen mit *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* untersucht. Für alle untersuchten Blutproben fiel der Nachweis einer Infektion mit *P. malariae* negativ aus. Bei einer Mutter waren zusätzlich zu *P. falciparum* auch *P. ovale* nachweisbar. Der Nachweis von *P. ovale* wurde für die weiteren Ergebnisse nicht berücksichtigt.

### 3.3.2 Prävalenz einer Infektion mit *P. falciparum* bei den Neugeborenen

Bei keinem der 136 Neugeborenen konnte eine Infektion mit *P. falciparum* diagnostiziert werden. In den venösen Blutproben der Neugeborenen, die im Mittel 12 Stunden nach der Geburt entnommen wurden, waren weder mikroskopisch noch mit dem ICT oder der PCR Plasmodien im peripheren Blut nachzuweisen.

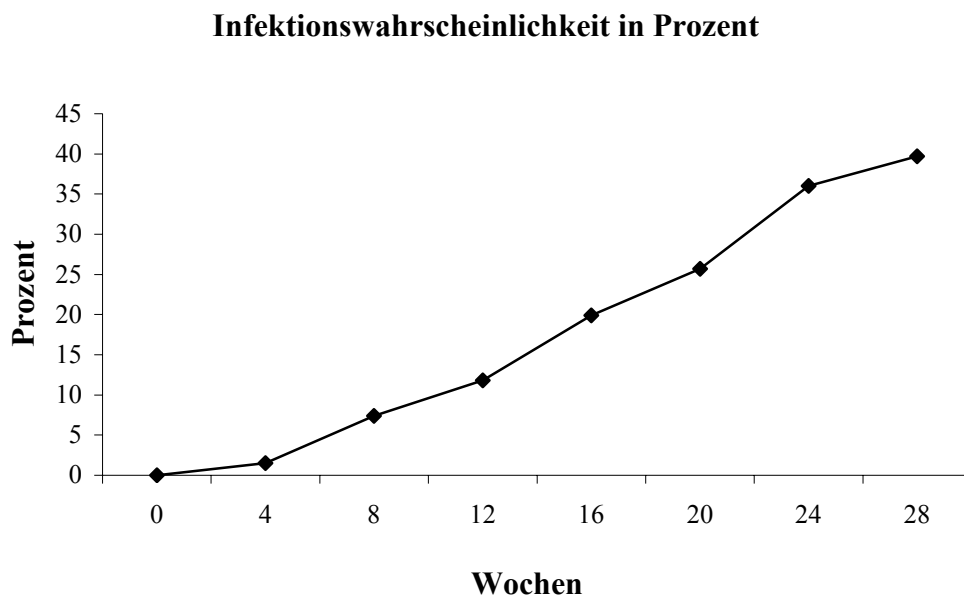
### 3.3.3 Prävalenz einer Infektion mit *P. falciparum* bei den Säuglingen

Bei 54 (39,7 %) der 136 beobachteten Kinder konnte im Laufe des ersten halben Jahres mindestens eine Infektion mit *P. falciparum* mit der PCR diagnostiziert werden. Von den infizierten Kindern waren 23 (42,6 %) Mädchen und 31 (57,4 %) Jungen. Der Geschlechtsunterschied war statistisch nicht signifikant. Bei 48 (88,9 %) Kindern wurde die erste Infektion an einem regulären Kliniktermin festgestellt. Die anderen 6 (11,1 %) Kinder



kamen aufgrund eines fieberhaften Infektes in die Notaufnahme des Krankenhauses. In der Abbildung 4 ist die mit dem Alter zunehmende Wahrscheinlichkeit für eine Infektion mit *P. falciparum* dargestellt. Als infiziert galt ein Kind bei einem positiven Nachweis von *P. falciparum* in der PCR.

**Abbildung 4.** Kumulativer Anteil (%) mit *P. falciparum* infizierter Säuglinge über den Zeitraum eines halben Jahres



Berücksichtigt man nur die Gruppe der infizierten Kinder, so betrug das mittlere Alter bei der Erstinfektion 17 (4-28) Wochen. Der jüngste Säugling mit einer (asymptomatischen) Infektion durch *P. falciparum* war 4 Wochen alt.

In der Tabelle 6 sind die mikroskopischen und submikroskopischen Infektionen mit *P. falciparum* sowie die Parasitendichten dargestellt. Die PCR wurde bei den Kindern nur zum Nachweis von *P. falciparum* durchgeführt. Die Tabelle berücksichtigt alle positiven PCR Ergebnisse für das jeweilige Alter, unabhängig davon, ob es sich um eine Erstinfektion oder eine chronisch-persistierende Infektion handelt. Deutlich zu erkennen ist eine kontinuierliche Zunahme der Infektionen mit *P. falciparum* mit steigendem Alter der Kinder. Zeitgleich kommt es zu einem Anstieg der mikroskopisch nachweisbaren Parasitämien im Vergleich zu der Gesamtanzahl der diagnostizierten Infektionen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum war ein Anstieg der mikroskopischen Infektionen zu verzeichnen. Statistisch signifikant war diese Zunahme jedoch erst für den Zeitraum von der 16. bis zur 28. Woche ( $p=0,01$ ,  $\chi^2$ -Test für Trend). Zwischen der Höhe der Parasitendichte und dem Alter der Kinder ließ sich kein signifikanter Zusammenhang herstellen.

**Tabelle 6.** Prävalenz der Infektion mit *P. falciparum* und Parasitendichte der Kinder im ersten halben Lebensjahr

Alter	N	Anteil pos. PCR <sup>1</sup>	Anteil mikr. Inf <sup>2</sup>	Parasitendichte (/µl) <sup>3</sup>
4 Wochen	135	2/135 (1,5 %)	1/135 (0,75 %)	174
8 Wochen	135	10/135 (7,4 %)	4/135 (3,0 %)	2289 (102-5432)
12 Wochen	135	16/135 (11,9 %)	8/135 (5,9 %)	1201 (522-2535)
16 Wochen	133	26/133 (19,6 %)	8/133 (6,0 %)	2777 (272-8623)
20 Wochen	134	30/134 (22,4 %)	11/134 (8,2 %)	1206 (32-9283)
24 Wochen	130	33/130 (25,4 %)	15/130 (11,5 %)	1404 (19-27686)
28 Wochen	129	40/129 (31 %)	24/129 (18,6 %)	1121 (79-13167)
Extra <sup>4</sup>	28	19/28 (67,9 %)	16/28 (57,1 %)	2218 (108-10546)
Total	959	176/959 (18,3 %)	74/959 (7,7 %)	1350 (19-27686)

<sup>1</sup> Anteil der Infektionen mit *P. falciparum* ermittelt durch PCR an allen Kindern (%)

<sup>2</sup> Anteil mikroskopischer Infektionen mit *P. falciparum* an allen Kindern (%)

<sup>3</sup> Mediane der Parasitendichte der in der Mikroskopie positiven Proben und deren Wertebereich

<sup>4</sup> Extrabesuche der Kinder

Berücksichtigt man nur die 29 Kinder, die mindestens zweimal im Rahmen dieser Studie mit *P. falciparum* infiziert waren, so waren die Plasmodien im Mittel über einen Zeitraum von 8-12 Wochen nach der Erstinfektion im Blut nachzuweisen. Anhand der PCR-Ergebnisse reichte die Zeitspanne von einem einmaligen Nachweis bis zu maximal 6 Monaten. Mit der Mikroskopie waren die Blutproben maximal 3 Monate hintereinander positiv.

### 3.4 Klinische Symptome einer Infektion mit *P. falciparum*

#### 3.4.1 Prävalenz von Fieber und Splenomegalie bei den Säuglingen

Die allgemeine klinische Untersuchung erfolgte mit besonderer Beachtung der klinischen Symptome, die auf eine Malaria im Kindesalter hinweisen. So wurde besonderes Augenmerk auf fieberhafte Infekte, Diarrhoe, Erbrechen, Ikterus, blasses Hautkolorit, Splenomegalie und Hepatomegalie gerichtet.

In die Auswertung für die vorliegende Arbeit wurde nur die Temperatur sowie die palpatorisch ermittelte Größe der Milz miteinbezogen. Eine Hepatomegalie wurde nur bei einem Kind diagnostiziert und entzog sich damit einer sinnvollen Auswertung.

Die klinischen Symptome wie Husten, Erbrechen und Diarrhoe wurden nicht berücksichtigt, da es sich hierbei zumeist um anamnestisch erhobene Daten handelte, die stark von der subjektiven Beurteilung der Mutter beeinflusst waren. In der Tab. 7 sind die Kinder mit erhöhter Temperatur und Splenomegalie für die einzelnen Altersgruppen getrennt dargestellt.

**Tabelle 7.** *Klinische Befunde im ersten halben Lebensjahr*

Zeitpunkt	4 Wo	8 Wo	12 Wo	16 Wo	20 Wo	24 Wo	28 Wo
Fieber <sup>1</sup> (%)	6/129 (4,4 %)	0/135 (0 %)	10/124 (7,5 %)	10/124 (7,5 %)	5/130 (3,7 %)	2/128 (1,5 %)	10/119 (7,8 %)
Milzvergr. <sup>2</sup> (%)	1/134 (0,7 %)	1/134 (0,7 %)	4/130 (3,0 %)	13/121 (9,7 %)	5/130 (3,7 %)	4/126 (3,1 %)	14/115 (10,9 %)

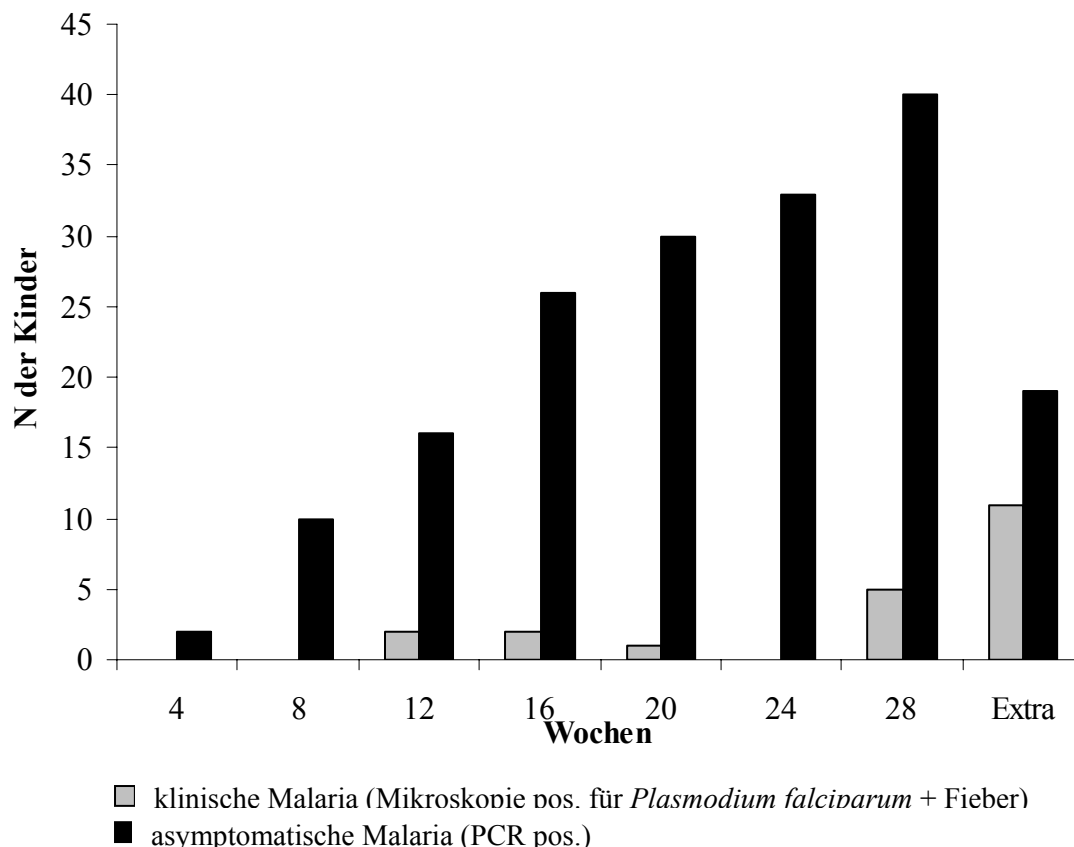
<sup>1</sup> Anteil der Kinder mit Fieber → Körpertemperatur  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$

<sup>2</sup> Milzvergrößerung → Anteil der Kinder mit palpabler Milz

#### 3.4.2 Prävalenz von klinisch manifester *Malaria tropica* bei den Säuglingen

Als klinische Malaria definierten wir den mikroskopischen Nachweis von Plasmodien im Blut bei gleichzeitiger Erhöhung der Körpertemperatur  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ . Die Abbildung 5 gibt das Verhältnis von Kindern mit klinisch manifester *Malaria tropica* zu Kindern mit einer asymptomatischen Parasitämie wieder. Insgesamt wurde bei 21 (15,4 %) Kindern im Untersuchungszeitraum eine klinische Malaria diagnostiziert, wovon 11 (52,3 %) außerhalb der regulären Termine in die Klinik kamen.

**Abb. 5** Verhältnis von klinischer *Malaria tropica* und asymptomatischer Parasitämie



Betrachtet man die Kinder über den gesamten Zeitraum von einem halben Jahr, so hatten 54 (39,7 %) von ihnen mindestens einmalig Fieber und 82 (60,3 %) Kinder blieben fieberfrei. Bei 30 (55,6 %) der fiebernden Kinder konnte eine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen werden. Bei den Kindern ohne erhöhter Körpertemperatur wurden 26 (31,7 %) positiv auf *P. falciparum* getestet. Demzufolge hatten im ersten halben Lebensjahr infizierte Kinder signifikant häufiger eine erhöhte Körpertemperatur ( $p=0,002$ ). Untersucht man Fieber gezielt als klinisches Symptom für eine Infektion mit *P. falciparum* zu den einzelnen Zeitpunkten, so war nur für die 16 Wochen und die 28 Wochen alten Säuglinge ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu erkennen. Mit 16 Wochen hatten 5 (19,2 %) der 26 infizierten Kinder Fieber ( $p=0,01$ ) und mit 28 Wochen zeigten 7 (18,4 %) der 38 infizierten Kinder eine erhöhte Körpertemperatur ( $p=0,004$ ). Kinder mit Fieber und positivem mikroskopischen Parasitennachweis im Beobachtungszeitraum hatten eine Parasitendichte von 492 (6-11896)/ $\mu\text{l}$ . Bei den fieberfreien Kindern wurden 473 (1-27696) Parasiten/ $\mu\text{l}$  Blut gezählt. Ein statistischer Zusammenhang bestand nicht. Untersucht man die Daten der monatlichen Termine, so konnte eine Assoziation zwischen Fieber und der Parasitendichte nur für die 28. Woche bestätigt werden ( $p=0,04$ ). Zu diesem Zeitpunkt hatten 10 Kinder eine erhöhte Körpertemperatur. Bei 50 % dieser Kinder konnte Parasiten in einer Dichte von 4539 (11896-

324) / $\mu$ l nachgewiesen werden. Bei den mit 28 Wochen fieberfreien Kindern (119) wurde bei 19 Kindern eine mikroskopische Infektion mit *P. falciparum* mit einer Parasitendichte von 1045 (13167-79) Parasiten/ $\mu$ l Blut diagnostiziert.

Von den 37 Kindern, die außerhalb der regulären Kliniktermine in der Notfallambulanz vorgestellt wurden, hatten 26 (71,4 %) Fieber. Bei 18 (70 %) von ihnen konnte gleichzeitig eine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen werden. Der Zusammenhang war statistisch nicht signifikant.

### **3.4.3 Splenomegalie in Assoziation zu einer Infektion mit *P. falciparum***

Bei 31 (22,8 %) Kindern wurde im ersten halben Jahr eine vergrößerte Milz diagnostiziert. 25 (80,7 %) dieser Kinder hatten innerhalb des Beobachtungszeitraumes einen positiven Nachweis von *P. falciparum* ( $p < 0,001$ ). Untersucht man den Zusammenhang zwischen dem gemeinsamen Auftreten einer Splenomegalie und einer Infektion mit *P. falciparum*, so waren von der 16. Woche bis zur 28. Woche zwischen 60 % und 100 % der Kinder mit palpabler Milz auch gleichzeitig mit *P. falciparum* infiziert. Statistisch signifikant war der Zusammenhang für die Wochen 16 ( $p < 0,001$ ), 24 ( $p = 0,004$ ) und 28 ( $p < 0,001$ ).

Eine Korrelation zwischen Parasitendichte und Splenomegalie bestand für die 28 Wochen alten Säuglinge ( $p = 0,03$ ). Von den 14 Kindern mit vergrößerter Milz waren 50 % mikroskopisch infiziert (2058 (198-4902) Parasiten/ $\mu$ l). Im Gegensatz dazu hatten in der 28. Woche von den 115 Kindern ohne Splenomegalie 17 Kinder eine mikroskopische Infektion (1045 (79-13167) Parasiten/ $\mu$ l).

Ein Zusammenhang zwischen dem gemeinsamen Auftreten von Fieber und einer Splenomegalie bestand nur für Säuglinge in der 28. Woche ( $p < 0,0001$ ). Ansonsten verhielten sich die beiden klinischen Merkmale statistisch unabhängig voneinander.

Bei den Kindern, die zum selben Zeitpunkt Fieber und eine Splenomegalie (insgesamt nur 9 Kinder) hatten, war immer auch eine Infektion mit *P. falciparum* nachweisbar. Statistisch signifikant war die Kombination in der 16. Woche ( $p = 0,03$ ) und in der 28. Woche ( $p < 0,001$ ). Bei den anderen Altersgruppen waren die Fallzahlen zu gering.

## **3.5 Einflussfaktoren auf eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* im ersten halben Lebensjahr**

### **3.5.1 Peripartale Infektion der Mutter mit *P. falciparum***

Eine plazentare, mit der PCR nachgewiesene Infektion der Mutter mit *P. falciparum* war signifikant mit einer Infektion der Kinder im ersten halben Lebensjahr assoziiert ( $p = 0,01$ ).

Von den 54 Kindern, die im Beobachtungszeitraum mindestens einmal mit *P. falciparum* infiziert waren, hatten 35 (64,8 %) Mütter eine plazentare Infektion (PCR positiv auf *P. falciparum*) gegenüber 19 (35,2 %) Kindern von Müttern ohne plazentarer Infektion. Unterteilt man die Kinder nach dem Alter, so waren die Kinder infizierter Mütter ab der 16. Woche signifikant häufiger mit *P. falciparum* infiziert als die Kinder von nicht-infizierten Müttern. Besonders deutlich war dieser Zusammenhang für die mikroskopisch nachweisbaren Infektionen der mütterlichen Plazenten. Die genauen Häufigkeiten für die einzelnen Altersgruppen sowie die dazugehörigen Signifikanzen sind in der Tab. 8 zusammengefasst.

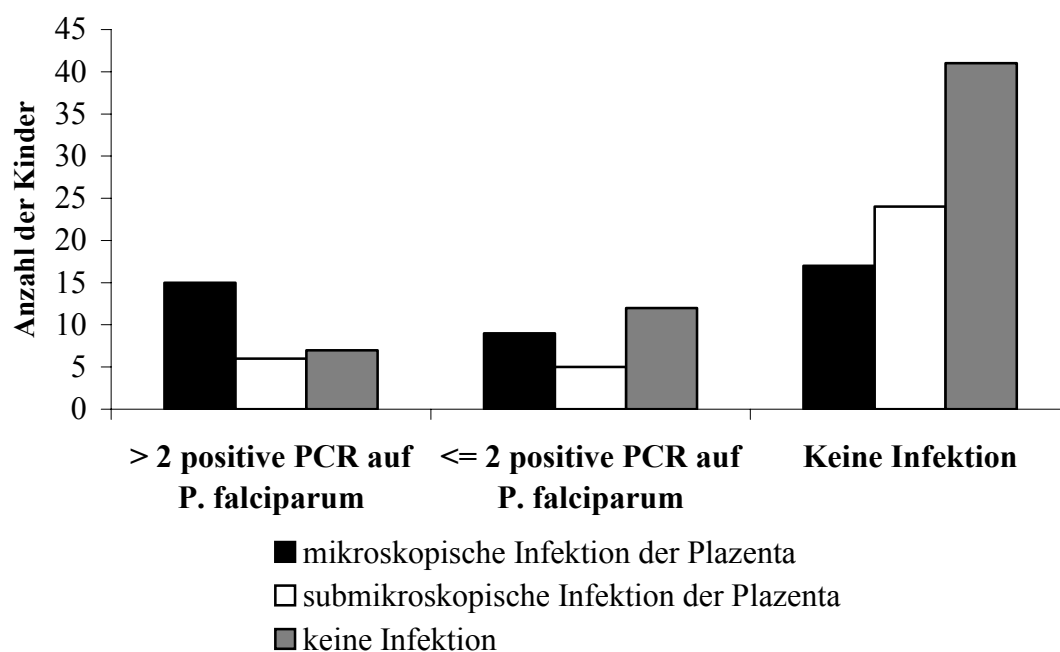
**Tabelle 8.** *Assoziation zwischen einer mikroskopisch nachweisbaren plazentaren Infektion der Mutter mit P. falciparum und einer Infektion des Kindes (positive PCR) mit P. falciparum im ersten halben Lebensjahr*

	PCR der Kinder	Anzahl	Mütter mit mikroskop. Infektion (n=41)	Nichtinfizierte Mütter <sup>1</sup> (n=60)	p-Wert <sup>2</sup> ( $\chi^2$ -Test)
4 Wochen	pos.	2	1 (50%)	1 (50%)	0,7
	neg.	133	40 (30,1%)	58 (43,6%)	
8 Wochen	pos.	10	5 (50%)	3 (30%)	0,4
	neg.	125	36 (28,8%)	56 (44,8%)	
12 Wochen	pos.	16	8 (50%)	4 (25%)	0,2
	neg.	119	33 (27,7%)	55 (46,2%)	
16 Wochen	pos.	26	16 (61,5%)	5 (19,2%)	0,0006
	neg.	107	25 (23,4%)	53 (48,6%)	
20 Wochen	pos.	30	15 (50%)	9 (30%)	0,02
	neg.	104	25 (24%)	50 (48,1%)	
24 Wochen	pos.	33	15 (45,5%)	9 (27,3%)	0,03
	neg.	97	23 (23,7%)	48 (49,5%)	
28 Wochen	pos.	40	19 (47,5%)	13 (32,5%)	0,02
	neg.	89	20 (22,5%)	44 (49,4%)	
Total	pos.	54	24 (44,4%)	19 (35,2%)	0,01
	neg.	82	17 (20,7%)	41 (50%)	

<sup>1</sup>negative plazentare PCR    <sup>2</sup>bezogen auf mikroskopische plazentare Infektion

In der Abbildung 6 ist der Zusammenhang zwischen einer plazentaren Infektion und der Anzahl der Infektionen mit *P. falciparum* bei den Säuglingen wiedergegeben. Die Kinder von Müttern mit mikroskopisch nachweisbarer plazentarer *P. falciparum* Infektion hatten signifikant häufiger mehr als 2 positive PCR Ergebnisse innerhalb der ersten 6 Lebensmonate im Vergleich zu den Müttern ohne oder mit submikroskopischer Infektion ( $p=0,02$ ,  $\chi^2$ -Test).

**Abbildung 6.** Anzahl der Kinder mit mehr als 2, weniger als 2 Infektperioden sowie ohne Infektion in Abhängigkeit einer mikroskopischen, submikroskopischen und keiner Infektion der Plazenta



Es bestand keine signifikante Assoziation zwischen der plazentaren Parasitendichte und der Anzahl der Infektionen im ersten halben Jahr ( $p=0,96$ ).

### 3.5.2 Mütterliches Alter

Kinder, die mindestens einmal in den ersten 6 Monaten mit *P. falciparum* infiziert waren, hatten signifikant jüngere Mütter, als Kinder, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht infiziert waren [21 Jahre (16-38) vs. 26 Jahre (15-38)  $p=0,01$ , Mann-Whitney-U-Test]. Ein Zusammenhang zwischen der Parität und einer Infektion des Kindes im ersten halben Lebensjahr bestand nicht ( $p=0,28$ ;  $\chi^2$ -Test).

### 3.5.3 Fetalen Hämoglobinspiegel

Von insgesamt 131 Kindern wurde der Anteil des fetalen Hämoglobins (HbF) am Gesamthämoglobin am 1. Lebenstag bestimmt. Der Median betrug 87,3 % mit einem

Minimum von 61 % und einem Maximum von 100 %. Ein HbF-Anteil > 85 % liegt oberhalb der Altersnorm (Nationales Hämoglobin Referenzlabor der Universitätskinderklinik Ulm). Von den untersuchten Neugeborenen hatten 91 (69,5 %) einen erhöhten fetalen Hämoglobinspiegel. In unserem Studienkollektiv hatten die Kinder mit erhöhtem HbF-Spiegel bei Geburt signifikant weniger Infektionen mit *P. falciparum* (p=0,03). In der Tabelle 9 ist der Zusammenhang zwischen der Höhe des HbF-Spiegels und einer Infektion mit *P. falciparum* im ersten halben Lebensjahr wiedergegeben.

**Tabelle 9.** Zusammenhang zwischen fetalem Hämoglobin und einer Infektion mit *P. falciparum* im ersten halben Lebensjahr

	Kinder mit mind. 1 Infektion <sup>1</sup> (n=52)	Kinder ohne Infektion (n=79)
HbF < 75 % (n=6)	4 (66,7 %)	2 (33,3 %)
HbF < 75 % u. ≤ 85 % (n=34)	17 (50 %)	17 (50 %)
HbF > 85 % (n=91)	31 (34,1 %)*	60 (65,9 %)*

<sup>1</sup> positive PCR im peripheren Blut

\* signifikant p=0,03,  $\chi^2$ -Test für Trend

### 3.6 Anämien

#### 3.6.1 Deskription der hämatologischen Basisdaten der Schwangeren und Prävalenz maternaler Anämien

Die hämatologischen Parameter der untersuchten Mütter wurden nicht signifikant von der Anzahl der vorausgegangenen Geburten beeinflusst. Bei 18 (13,2%) Erstgebärenden und 32 (23,5%) Multiparae wurde eine Anämie diagnostiziert (p=0,85). Aus diesem Grund wurden die hämatologischen Daten der Mütter in der Tab. 10 nicht wie zuvor nach Anzahl der Paritäten, sondern nach mit *P. falciparum* infizierten und nicht-infizierten Müttern unterteilt. Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich hatten infizierte Mütter einen niedrigeren Hämoglobinspiegel, ein geringeres mittleres Erythrozytenvolumen (MCV) und ein erniedrigtes mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) als die nicht-infizierten Mütter.



**Tabelle 10.** *Hämatologische Parameter der Mütter (Median und Bereich)*

Parameter	Hb* (g/dl)	Hkt (%)	EZ ( /pl)	LZ ( /nl)	MCV* (fl)	MCH* (pg)
Infizierte Mütter <sup>1</sup> (n=76)	11,3 (7,9-15,6)	31,7 (18,3-40,4)	3,3 (2,1-4,7)	8,8 (5,8-18,8)	89 (78-125)	32,7 (24,8-60,8)
Nichtinfizierte Mütter (n=60)	11,9 (8,8-16,4)	32,4 (21,8-49,1)	3,5 (2,4-5,9)	9,8 (4,1-24,6)	92 (73-104)	33,9 (17,7-50,2)

<sup>1</sup> positive PCR auf *P. falciparum* des plazentaren Blutes Hb → Hämoglobin; Hkt → Hämatokrit; EZ → Erythrozytenzahl; LZ → Leukozytenzahl; MCV → Mean corpuscular volume; MCH → Mean corpuscular hemoglobin; \* = p < 0,05, (Mann-Whitney-U-Test)

Definiert man eine Schwangerschaftsanämie als einen Hämoglobinspiegel < 11 g/dl, so waren im Rahmen dieser Studie 41 (30,1 %) Mütter bei der Geburt anämisch. Statistisch nicht signifikant (p=0,06, Fisher's exakter P-Wert) war der Zusammenhang zwischen einer Anämie der Mutter und einer gleichzeitig bestehenden Infektion mit *P. falciparum*. Bei 28 (68,3 %) anämischen Müttern war eine Infektion mit *P. falciparum* im plazentaren Blut mittels PCR nachweisbar. Im Vergleich hierzu waren in der Gruppe der nicht-anämischen Mütter nur 48 (50,5 %) mit *P. falciparum* infiziert.

Zwei (4,9 %) der Anämien waren mikrozytär, 37 (90,2 %) normozytär und 2 (4,9 %) makrozytär. Die Hälfte der Frauen mit mikrozytären, 67,6 % der Frauen mit normozytärer und alle der Frauen mit makrozytärer Anämie hatten eine Infektion mit *P. falciparum* (p=0,8).

### 3.6.2 Deskription der hämatologischen Basisdaten der Neugeborenen und Prävalenz der Neugeborenenanämien

Die hämatologischen Parameter der Neugeborenen sind getrennt nach Geschlecht sowie dem Infektionsstatus der Mutter (plazentare PCR positiv bzw. negativ auf *P. falciparum*) in der Tab. 11 dargestellt.

**Tabelle 11.** *Hämatologische Parameter der Neugeborenen (Median und Bereich)*

Parameter	Hb (g/dl)	Hkt (%)	EZ ( /pl)	LZ ( /nl)	MCV (fl)	MCH (pg)
Neugeborene (n=136)	16,9 (11,5-21,2)	47,0 (30,3-62,6)	4,4 (2,6-6,2)	15,1 (8,0-30,4)	107 (86-123)	38,1 (30-50,8)
Männlich (n=74)	16,8 (11,5-21,1)	44,3 (30,3)-62,6)	4,3 (2,6-5,9)	15 (8-30,4)	106 (86-122)	38,5 (31,7-50,7)
Weiblich (n=62)	17* (13,1-21,2)	48,7* (36,3-62,1)	4,6* (3,3-6,2)	15,1 (10,3-25,5)	108 (96-123)	37,8 (30-50,8)
Infizierte Mutter <sup>1</sup> (n=76)	16,9 (11,5-21,2)	48 (30,3-62,6)	4,5 (2,6-5,9)	14,9 (8-25,5)	107 (92-123)	37,8 (31,1-49,8)
Nicht-infizierte Mutter <sup>2</sup> (n=60)	16,8 (11,5-20,0)	46,1 (31,2-62,1)	4,3 (3,0-6,2)	15,2 (10-30,4)	107 (86-122)	38,4 (30-50,8)

<sup>1</sup> Neugeborene von Müttern mit positivem Nachweis von *P. falciparum* mittels PCR im plazentaren Blut

<sup>2</sup> Neugeborene von Müttern mit negativem Nachweis von *P. falciparum* mittels PCR im plazentaren Blut

Hb → Hämoglobin; Hkt → Hämatokrit; EZ → Erythrozyten; LZ → Leukozyten; MCV → Mean corpuscular volume; MCH → Mean corpuscular hemoglobine

\* = p < 0,05, (Mann-Whitney-U-Test)

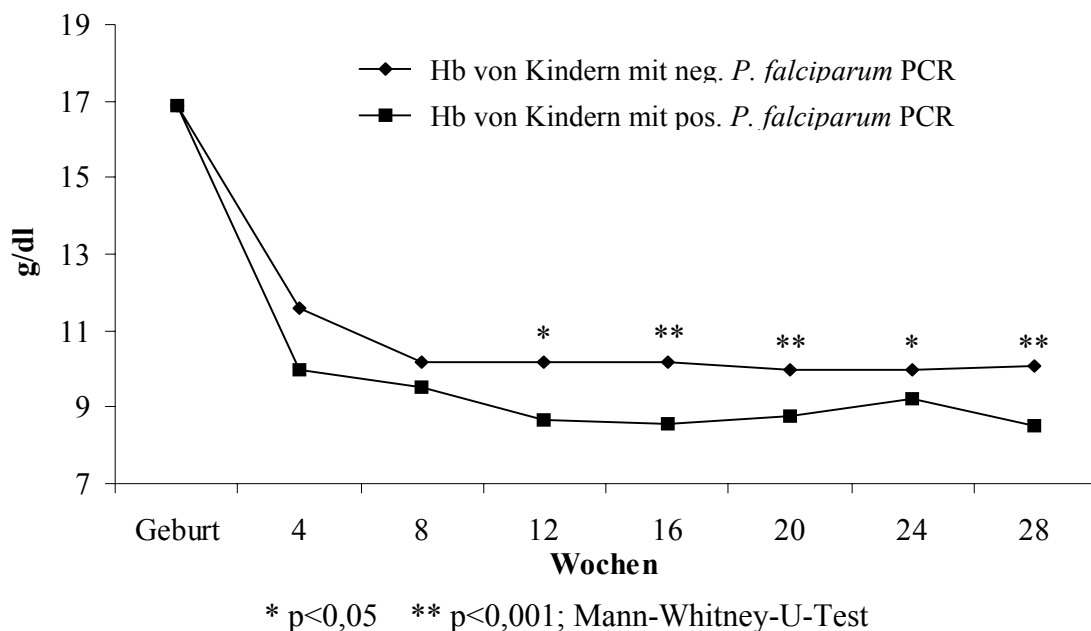
Die hämatologischen Parameter der Neugeborenen von infizierten Müttern unterschieden sich nicht von denen der nicht-infizierten Mütter. Weibliche Neugeborene hatten signifikant höhere Werte für Hb, Hkt und EZ (Tab. 11). Von den Neugeborenen waren 13 (9,7 %) anämisch (Hb < 14 g/dl, Keller *et al.*, 1991). Davon waren 2 (15,4 %) Mädchen und 9 (84,6 %) Jungen (p=0,04; Fisher's exakter P-Wert). Eine (7,7 %) Anämie war makrozytär und 12 (92,3 %) waren normozytär.

### 3.6.3 Deskription der hämatologischen Basisdaten der Kinder und Prävalenz kindlicher Anämien

Mädchen zeigten während der ersten 28 Lebenswochen durchgehend höhere Hämoglobinspiegel (p=0,0005, Mann-Whitney-U-Test) als ihre männlichen Altersgenossen. Der Hämatokrit der weiblichen Säuglinge war bis zur 8. Woche und in der 24. und 28. Woche signifikant höher als der Hkt. der Jungen (p=0,006, Mann-Whitney-U-Test). Die Erythrozytenzahlen der Kinder zeigten ab der 8. Woche keinen geschlechtsspezifischen

Unterschied mehr. Die Auswertung der hämatologischen Parameter erfolgte getrennt für infizierte und nicht-infizierte Säuglinge. Signifikante Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Säuglingen waren bei den Werten für Hb und Hkt zu beobachten. Der Verlauf der Hb-Konzentration ist in der Abb. 7 dargestellt. Hier ist ab der 12. Woche ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Hb-Konzentration zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Die mittlere Hämoglobindifferenz zwischen infizierten und nicht-infizierten Kindern betrug  $1,1 \pm 0,52$  g/dl.

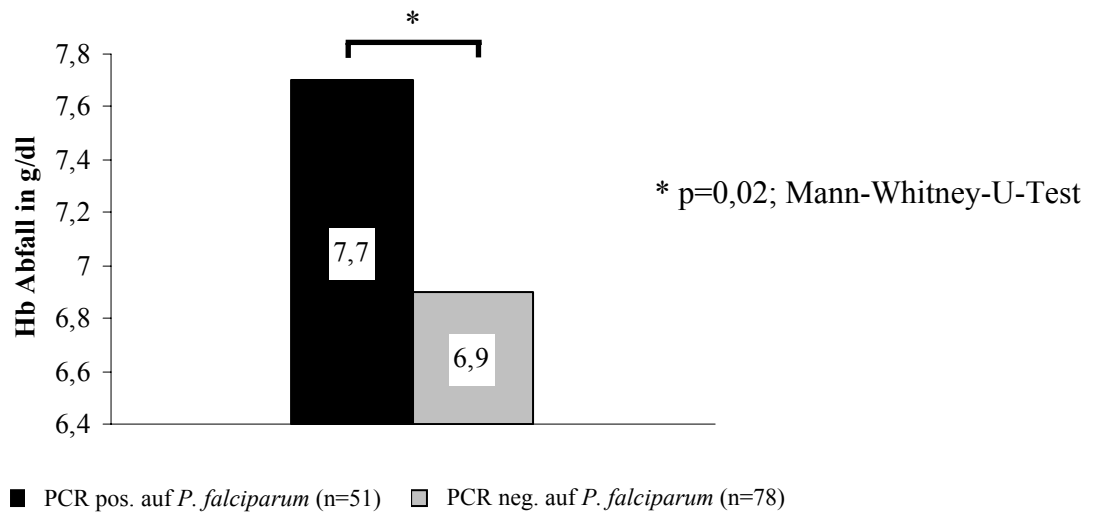
**Abbildung 7.** Vergleich mittlerer Hämoglobinwerte von infizierten und nicht-infizierten Kindern (Median)



Auch bei den Kindern, die in der Notfallambulanz vorgestellt wurden, war der Hb-Wert im Falle einer *P. falciparum* Infektion niedriger (Median 9,0 g/dl, 4,6-11,6) als bei den nicht-infizierten Kindern (Median 9,8 g/dl, 6,8-11,5). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Der Abfall des Hämoglobinspiegels über die Zeit variierte bei den Kindern, die nicht mit *P. falciparum* infiziert waren, zwischen einem Minimum von 2,2 g/dl und einem Maximum von 13,4 g/dl. Bei den Kindern, die in dem Beobachtungszeitraum mindestens einmal mit *P. falciparum* infiziert waren, variierte der Abfall zwischen 3,1 g/dl und 12 g/dl. Der mittlere Hämoglobinspiegelabfall ist in der Abb. 8 dargestellt. Hier ist ein signifikant stärkerer Hb-Abfall in der Gruppe der infizierten Kinder zu beobachten (p=0,02).

**Abbildung 8.** Medianer Abfall des Hämoglobinspiegels im ersten Lebenshalbjahr, getrennt nach dem Auftreten von mindestens einer Infektion mit *P. falciparum*



Es bestand jedoch keine signifikante Assoziation zwischen dem Abfall des Hämoglobinspiegels und der Anzahl der Infektionen mit *P. falciparum* bei den Säuglingen ( $p=0,07$ ). Kinder mit mehr als 2 Infektionen zeigten einen Hb-Abfall von im Median 7,95 (3,1-12,1) g/dl, gefolgt von Kindern mit weniger als 2 Infektionen mit einer Reduktion im Median von 7,5 (4,8-11,5) g/dl. Bei den nicht-infizierten Kindern konnte der geringste mediane Hb-Abfall von 6,9 (2,2-13,4) g/dl beobachtet werden.

Der Hämatokrit ist zusammen mit der Erythrozytenzahl, der Leukozytenzahl, dem mittleren Erythrozytenvolumen und dem Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten für infizierte und nicht-infizierte Kinder in der Tab. 12 wiedergegeben.

**Tabelle 12.** *Hämatologische Basisdaten der Kinder in Abhängigkeit von der Infektion mit P. falciparum (Median und Bereich)*

Alter	PCR	Anzahl	HKT (%)	EZ (/pl)	LZ (/nl)	MCV (fl)	MCH (pg)
4 Wochen	pos.	2	31,2 (25-37,4)	3,8 (2,8-4,8)	9,5 (5,8-13,1)	83,5* (78-89)	28,5 (20,7-36,2)
	neg.	133	32,2 (17,2-63,8)	3,3 (1,7-6,9)	8,4 (3,0-22,8)	97 (67-109)	35,5 (19,2-54,9)
8 Wochen	pos.	10	27,7 (22,6-32,1)	3,1 (2,4-3,5)	8,1 (6,2-12,0)	92 (74-98)	31,2 (28,6-37,5)
	neg.	125	27,7 (12,3-38,6)	3,1 (1,3-5,2)	8,6 (2,2-19,7)	89 (70-104)	32,3 (17,8-26,4)
12 Wochen	pos.	16	24,4* (12,3-34,3)	3,2 (1,8-4,0)	9,0 (4,9-13,1)	79* (70-86)	29,6 (23,9-49,4)
	neg.	119	28,5 (12,6-48,5)	3,4 (1,5-6,0)	8,9 (3,8-24,8)	84 (68-100)	30,0 (18,2-72,5)
16 Wochen	pos.	26	24,1* (13,6-34,6)	3,3 (1,6-4,5)	10,7* (6,7-19,4)	78,5 (64-86)	25,7* (19,4-49,4)
	neg.	107	28,6 (12,2-35,1)	3,6 (1,4-4,6)	9,0 (4,4-17,1)	81 (61-97)	28,0 (18,2-56,2)
20 Wochen	pos.	30	25,0* (15,6-35,1)	3,3 (1,9-4,7)	9,7 (4,0-21,0)	75,5 (65-89)	25 (19,2-40,7)
	neg.	104	30,0 (13,7-43,4)	3,9 (2,2-5,1)	9,3 (3,6-18,5)	78 (56-91)	26,3 (14,1-61,6)
24 Wochen	pos.	33	27,6* (14,7-40,6)	3,8* (1,4-4,7)	10,8* (4,1-22,4)	75 (61-98)	23,6 (18,3-77,8)
	neg.	97	29,5 (15,7-51,9)	3,9 (2,0-6,4)	8,3 (4,1-23,0)	76 (55-89)	25,3 (16,3-51,5)
28 Wochen	pos.	40	27,7* (13,6-37,7)	3,6* (1,9-20,3)	8,5 (2,9-15,6)	74,5 (63-86)	25,1 (3,0-37,8)
	neg.	89	29,0 (17,6-43)	3,9 (1,0-5,2)	8,2 (3,9-15,6)	74 (60-87)	25,5 (17,5-43,6)
Extra-Kinder <sup>1</sup>	pos.	19	24,0 (13,5-35,9)	3,1 (1,7-4,6)	8,4 (13,6-22,4)	78,5 (65-89)	28,3 (20-40,5)
	neg.	9	28,2 (18,3-33,5)	3,1 (2,4-4,2)	6,8 (5,4-12,3)	78,5 (67-84)	28,4 (23,9-37,1)

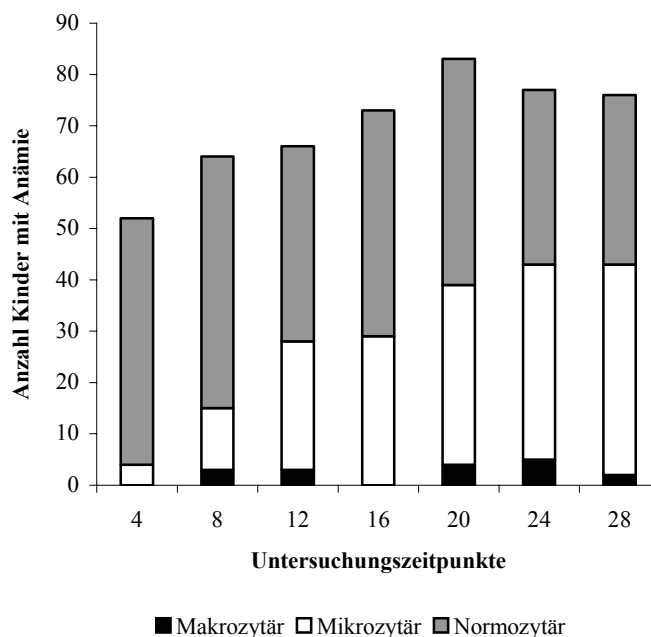
\* = p<0,05 signifikanter Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Kindern zum selben Zeitpunkt, Hb → Hämoglobin; Hkt → Hämatokrit; EZ → Erythrozyten; LZ → Leukozyten; MCV → Mean corpuscular volume; MCH → Mean corpuscular hemoglobine

<sup>1</sup> Extrabesuche der Kinder

Mit 4 Wochen wurde bei 52 (38,5 %) Kindern eine Anämie (Hb < 11 g/dl; Keller *et al.*, 1991) diagnostiziert. In den folgenden Wochen wurde die Gruppe der anämischen Kinder (Hb < 10 g/dl; Keller *et al.*, 1991) kontinuierlich größer. In der 20. Woche war der Anteil anämischer Kinder mit 61,5 % (83/135 Kindern) am höchsten. Danach erfolgte eine leichte Reduktion auf 58,5 % (76/130 Kindern) in der 28. Woche.

Eine weitere Aufteilung der Anämien in mikro-, makro- oder normozytär ist in der Abbildung 9 dargestellt. Als mikrozytär wurde ein MCV < 100 fl für die Neugeborenen definiert, der kontinuierlich bis auf einen MCV < 73 fl für die 28 Wochen alten Kinder abfiel. Der MCV für eine Makrozytose fiel von einem MCV > 125 fl für Neugeborene bis zu einem MCV > 84 fl für die 28 Wochen alten Kinder ab. Über den Untersuchungszeitraum nahm der Anteil an mikrozytären Anämien signifikant zu ( $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ -Test für Trend).

**Abbildung 9.** Klassifizierung der Anämien nach dem MCV



### 3.7 Einflussfaktoren auf den hämatologischen Status bzw. auf die Prävalenz einer Anämie bei den Säuglingen mit einem halben Lebensjahr

#### 3.7.1 Einfluss peripartaler Parameter auf eine Anämie mit 28 Wochen

Von den 21 Kindern mit einem niedrigem Geburtsgewicht waren 13 (62 %) in der 28. Woche anämisch. Bei 63 (58 %) der 109 zur Geburt normalgewichtigen Kinder konnte eine Anämie in der 28. Woche diagnostiziert werden. Der Zusammenhang zwischen einer Anämie und dem Geburtsgewicht war nicht signifikant ( $p = 0,1$ ;  $\chi^2$ -Test). Auch Frühgeburtlichkeit ( $p = 0,097$ ), Parität ( $p = 0,2$ ), Anämie der Mutter ( $p = 0,7$ ) und HbF-Konzentration bei den Säuglingen ( $p = 0,8$ ) hatten keinen Einfluß auf die Häufigkeit einer kindlichen Anämie in der 28. Woche

### 3.7.2 Eine Infektion mit *P. falciparum* als Risikofaktor für eine Anämie bei den Säuglingen

Im folgenden wird sowohl der Zusammenhang zwischen einer Anämie und einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* der Mutter als auch einer Infektion der Kinder näher untersucht.

Eine plazentare Malaria der Mutter stellte sich als bereits vorgeburtlich bestehender Risikofaktor für eine Anämie bei den Säuglingen dar ( $p=0,023$ ;  $\chi^2$ -Test). Von den 72 Kindern der Mütter mit plazentarer Infektion hatten 49 (68,1%) eine Anämie im 6. Monat. Im Gegensatz waren 27 (46,6%) der 58 Kinder, bei deren Mütter keine plazentare Infektion nachweisbar war, anämisch. Bei genauerer Differenzierung war nur die mikroskopisch nachweisbare plazentare Infektion mit *P. falciparum* signifikant mit einer Anämie bei den 6 Monate alten Säuglingen assoziiert ( $p=0,007$ ). Eine submikroskopische Infektion hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anämieprävalenz mit 6 Monaten ( $p=0,197$ ; s. Tab. 13).

**Tabelle 13.** Zusammenhang zwischen einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* und einer Anämie bei den Säuglingen

		Anämische (Hb < 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche	Nicht-anämische (Hb > 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche
<b>Infektionsstatus der Plazenta</b>	<b>Mikroskopische Infektion</b>	<b>74,4%</b> <sup>1,3</sup> 29/39	<b>25,6%</b> <sup>1,3</sup> 10/39
	<b>Submikroskopische Infektion</b>	<b>60,6%</b> <sup>2</sup> 20/33	<b>39,4%</b> <sup>2</sup> 13/33
	<b>Keine Infektion</b>	<b>46,6%</b> 27/58	<b>53,4%</b> 31/58

<sup>1</sup>  $p<0,007$

<sup>2</sup>  $p=0,2$

<sup>3</sup>  $p=0,2$

mikroskopische Infektion vs. keine Infektion

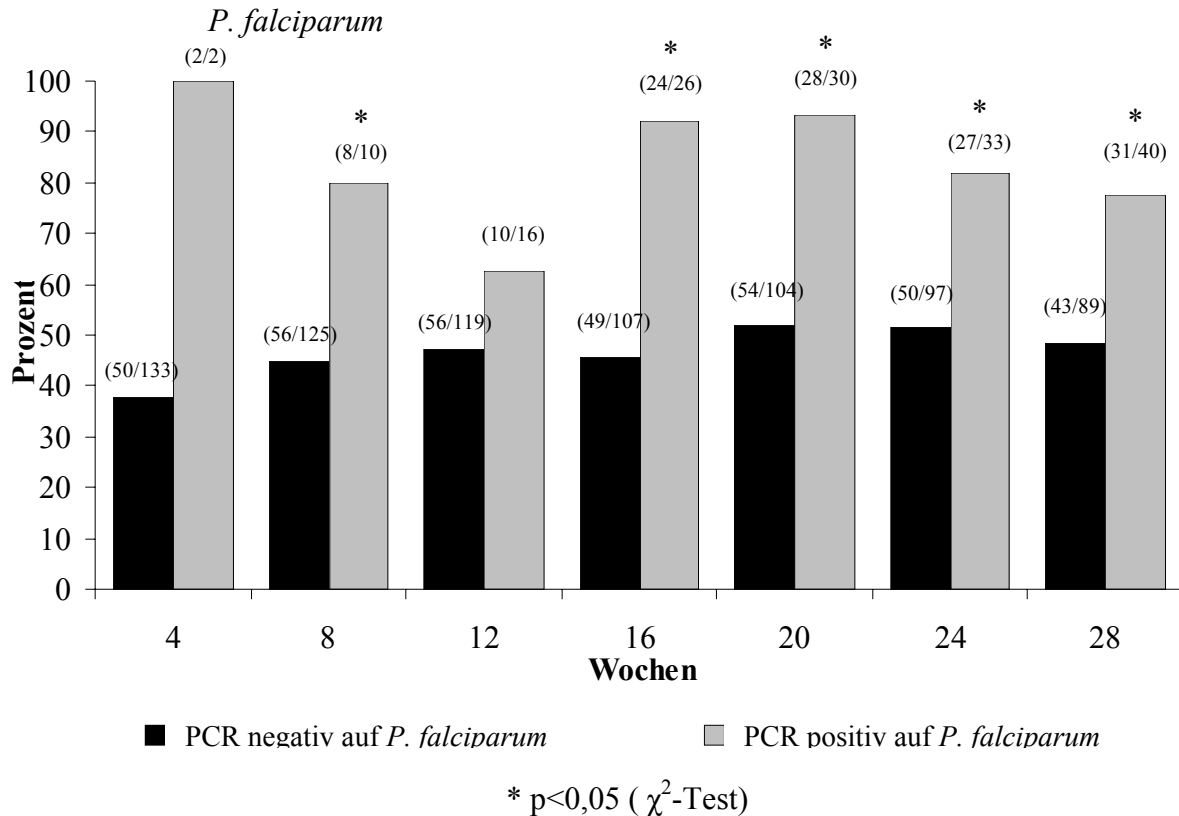
submikroskopische Infektion vs. keine Infektion

mikroskopische Infektion vs. submikroskopische Infektion

Ein deutlicher Risikofaktor für eine Anämie war eine zeitgleich diagnostizierte Infektion des Kindes mit *P. falciparum*. Abbildung 10 zeigt den Anteil der Kinder mit einer Anämie sowohl für die Gruppe der infizierten als auch der nicht-infizierten Kinder. Die 8, 16, 20, 24 und 28 Wochen alten mit *P. falciparum* infizierten Säuglinge hatten signifikant häufiger eine Anämie als ihre nicht-infizierten Altersgenossen. Bei Infektion des Kindes mit *P. falciparum* war

sowohl eine mikroskopische als auch eine submikroskopische Infektion signifikant mit einer Anämie bei den 28 Wochen alten Säuglingen assoziiert (s. Tab.14).

**Abbildung 10.** Anteil der anämischen Kinder in Abhängigkeit von der Infektion mit



**Tabelle 14.** Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *P. falciparum* und einer Anämie mit 28 Wochen

		Anämische (Hb < 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche	Nicht-anämische (Hb > 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche
Infektionsstatus der Kinder in der 28. Woche	<b>Mikroskopische Infektion</b>	<b>79,2%<sup>1,3</sup></b> 19/24	<b>20,8%<sup>1,3</sup></b> 5/24
	<b>Submikroskopische Infektion</b>	<b>81,3%<sup>2</sup></b> 13/16	<b>18,7%<sup>2</sup></b> 3/16
	<b>Keine Infektion</b>	<b>48,9%</b> 44/90	<b>51,1%</b> 46/90

<sup>1</sup> p<0,007

<sup>2</sup> p=0,015

<sup>3</sup> p=0,9

mikroskopische Infektion vs. keine Infektion  
submikroskopische Infektion vs. keine Infektion  
mikroskopische Infektion vs. submikroskopische Infektion



Obwohl der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Malariaepisoden und dem hämatologischen Status nicht signifikant war (s. 3.6.3 und 3.7.1), bestand ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,043$ ) zwischen einer Anämie bei den 6 Monate alten Säuglingen und der Anzahl der diagnostizierten Malariaepisoden im gesamten Beobachtungszeitraum (Tab. 15).

**Tabelle 15.** Zusammenhang zwischen einer Anämie und der Anzahl der Malariaepisoden

		<b>Anämische (Hb &lt; 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche</b>	<b>Nicht-anämische (Hb &gt; 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche</b>
<b>Malariaepisoden</b> (Anzahl der positiven PCR bei den Kindern über den Untersuchungszeitraum)	<b>0</b>	<b>51,9%</b> 41/79	<b>48,1%</b> 38/79
	<b>1</b>	<b>44,4%</b> 4/9	<b>55,6%</b> 5/9
	<b>2</b>	<b>71,4%</b> 10/14	<b>28,6%</b> 4/14
	<b>3</b>	<b>37,5%</b> 3/8	<b>62,5%</b> 5/8
	<b>4</b>	<b>90,9%</b> 10/11	<b>9,1%</b> 1/11
	<b>5</b>	<b>83,3%</b> 5/6	<b>16,7%</b> 1/6
	<b>6</b>	<b>100%</b> 3/3	<b>0%</b> 0/3

$p=0,043$   $\chi^2$ -Test

### 3.7.3 Fieber und Splenomegalie als Risikofaktoren für eine Anämie

Fieber und Splenomegalie waren beide signifikant mit einer Infektion mit *P. falciparum* assoziiert, sowohl zu dem Zeitpunkt 28 Wochen als auch allgemein über den gesamten Studienverlauf betrachtet (s. 3.4.3 und 3.4.4). Ebenso waren Kinder die im Beobachtungszeitraum mindestens eine Fieberepisode hatten, mit 28 Wochen signifikant häufiger anämisch als Kinder bei denen keine Fieberepisode diagnostiziert wurde [69,8% (37/53) vs. 50,6% (39/77),  $p=0,03$ ;  $\chi^2$ -Test]. Auch zu dem Untersuchungszeitpunkt 28 Wochen waren febrile Kinder signifikant häufiger anämisch [90% (9/10) vs. 55,6% (65/117),  $p = 0,03$ ]. Sowohl eine Splenomegalie im Beobachtungszeitraum [80% (24/30) vs. 52% (52/100),  $p = 0,006$ ], als auch mit 28 Wochen war signifikant mit einer Anämie bei den 28 Wochen alten Säuglingen assoziiert [85,7% (12/14) vs. 55,2% (64/116),  $p = 0,03$ ].

### 3.7.4 Eisenmangel als Risikofaktor für eine Anämie

Für 98 Kinder wurde in der 28. Lebenswoche der Ferritinspiegel bestimmt. Der Median des Ferritinspiegels betrug 23,7 ng/ml mit einem Minimum von 0,1 ng/ml und einem Maximum von 624,4 ng/ml. Als Normbereich für diese Altersgruppe wurde ein Bereich von 20-140 ng/ml definiert (Saarinen *et al.*, 1978). Aufgrund dieser Definition lag der Ferritinspiegel für 48 (49,0 %) Kinder im Normbereich. Bei 43 (43,9 %) Kindern wurde ein erniedrigter Ferritinspiegel gemessen, während für 7 (7,1 %) Kinder ein erhöhter Ferritinspiegel bestimmt wurde.

Bei den 30 Kindern, die zum Zeitpunkt 28 Wochen mit *P. falciparum* infiziert waren, konnte ein signifikant höherer Ferritinspiegel im Median von 48,8 (3,9 - 624) ng/ml gegenüber der Gruppe der nicht-infizierten Kinder von 20,1 (1,5-199,2) beobachtet werden ( $p < 0,001$ ). Die 43 Kinder mit niedrigen Ferritinwerten waren signifikant seltener [83,7% (36/43)] mit *P. falciparum* infiziert als die 55 Kinder mit normalen / hohen Ferritinspiegel [58,2% (33/55);  $p = 0,02$ ].

Von den 58 Säuglingen, bei denen nach einem halben Jahr eine Anämie diagnostiziert wurde, zeigten 35 (60,3 %) einen Ferritinspiegel im Normbereich (Tab. 16). Bei den restlichen 23 (39,7 %) anämischen Kindern war der Ferritinspiegel erniedrigt ( $p = 0,02$ ).

**Tabelle 16.** Zusammenhang zwischen Anämie und dem Ferritinspiegel im ersten halben Lebensjahr

	Anämische (Hb < 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche	Nicht-anämische (Hb > 10 mg/dl) Kinder in der 28. Woche
<b>Ferritin ≥ 20 ng/ml</b>	28 (48,3%)	27 (67,5%)
<b>Ferritin &lt; 20 ng/ml</b>	30 (51,7 %)	13 (32,5 %)*

\*  $p = 0,02$ ,  $\chi^2$ -Test

Von denselben 98 Kindern wurde mit 28 Wochen das C-reaktive Protein bestimmt. Der Median des CRP betrug 5,6 µg/l. CRP-Werte < 6 µg/l wurden als physiologisch angesehen (Wasunna *et al.*, 1990). Von den untersuchten Kindern hatten 41 (41,8 %) ein erhöhtes CRP. Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhtem CRP und einer Anämie im 6. Lebensmonat ( $p = 0,47$ ). Bei 29 (70,7%) der Kinder mit hohen CRP-Werten konnte gleichzeitig ein Ferritinwert > 20 ng/ml nachgewiesen werden v.s. 12 (29,3%) Kinder mit Ferritinspiegeln < 20 ng/ml ( $p = 0,008$ ). Eine Erhöhung des CRP war signifikant assoziiert mit einer Infektion mit *P. falciparum* ( $p = 0,02$ ). 20 (66,7 %) der zum Zeitpunkt 28 Wochen mit *P.*

*falciparum* infizierten 30 Kinder hatten pathologisch erhöhte CRP-Werte. Bei den nicht mit *P. falciparum* infizierten Kindern betrug der Anteil mit erhöhten CRP-Werten 51,2 % (21/41). Untersucht man nun den Zusammenhang zwischen Eisenmangel und Anämie, wobei ein Eisenmangel wie folgt definiert ist CRP < 6 µg/l und Ferritin < 20 ng/ml bzw. CRP ≥ 6 µg/l und Ferritin < 50 ng/ml, so kann bei 39 (67,2%) anämischen Kindern ein Eisenmangel nachgewiesen werden (Tab. 17).

**Tabelle 17.** Korrelation zwischen Eisenmangel und einer Anämie bei den Kindern in der 28. Woche

	Anämische Kinder (Hb<10g/dl; n=58)	Nicht-anämische Kinder (Hb>10g/dl; n=40)
<b>Eisenmangel</b>		
CRP < 6 µg/l und Ferritin < 20 ng/ml	22 (37,9%)	10 (25%)
CRP ≥ 6 µg/l und Ferritin < 50 ng/ml	17 (29,3%)	8 (20%)
<b>Kein Eisenmangel</b>	19 (32,8%)	22 (55%)

### 3.7.5 Multivariate Analyse der in den univariaten Analysen ermittelten Assoziationen zu einer Anämie bei den Säuglingen

Die in der univariaten Analyse ermittelten signifikanten Assoziationen zu einer Anämie der Säuglinge wurden in einer multivariaten Analyse mittels logistischer Regression überprüft. Folgende Parameter wurden untersucht: plazentare Infektion mit *P. falciparum*, aktuelle Infektion mit *P. falciparum*, Anzahl der Infektionen mit *P. falciparum*, Anzahl der Fieber-Episoden und diagnostizierte Splenomegalien im ersten halben Lebensjahr, sowie jeweils mit 28 Wochen und der Ferritin- Spiegel mit 28 Wochen (Tab. 18).

Für die multivariate Analyse wurde die aktuelle kindliche Infektion aufgrund der kleinen Einzelgruppen (submikroskopische Infektion 16 Kinder, mikroskopische Infektion 24 Kinder) und dem fast identischen Anteil an anämischen Kindern in der univariaten Analyse in beiden Gruppen nur in 2 Gruppen (Aktuelle Infektion Ja/Nein) unterteilt. Der Anteil der anämischen Kinder in der univariaten Analyse bei submikroskopische Infektion mit *P. falciparum* beträgt 81,3 % und bei mikroskopischer Infektion 79,2 %.

Die logistische Regression ergab folgende Risikofaktoren für eine Anämie mit 6 Monaten: Eisenmangel, aktuelle Infektion der Kinder, sowie eine mikroskopische plazentare Infektion.

**Tab. 18** *Multivariate Analyse mittels logistischer Regression der zuvor bestimmten Risikofaktoren für eine Anämie*

<b>Risikofaktor</b>	<b>N</b>	<b>Anteil mit Anämie (%)</b>	<b>Odds ratio (95%KI)</b>	<b>p</b>	<b>Adjustierte Odds Ratio (95%KI)</b>	<b>p</b>
<b>Aktueller Eisenmangel</b>						
Nein	68	51,5	1		1	
Ja	30	76,7	3,10 (1,08-9,21)	0,02	4,27 (1,49-12,22)*	0,007
<b>Aktuelle <i>P. falciparum</i> Infektion des Kindes</b>						
Nein	89	48,3	1		1	
Ja	40	80,0	4,28 (1,65-11,39)	0,0007	3,47 (1,19-10,07)	0,02
<b><i>P. falciparum</i> Infektion der Plazenta</b>						
Keine	58	46,6	1		1	
Submikroskopisch	33	60,6	1,77 (0,68-4,62)	0,20	1,08 (0,36-3,25)	0,90
Mikroskopisch	39	74,4	3,33 (1,27-8,91)	0,007	3,03 (1,0-9,07)	0,048
<b><i>P. falciparum</i> Infektionen in den ersten 6 Lebensmonaten</b>						
Keine	79	51,9	1			
>= 2	23	60,9	1,44 (0,51-4,13)	0,45		
>2	28	75,0	2,78 (0,98-8,18)	0,03		
<b>Aktuelles Fieber</b>						
Nein	117	55,6	1			
Ja	10	90,0	7,2 (0,93-321,5)	0,04		
<b>Fieber in den ersten 6 Lebensmonaten</b>						
Nein	77	50,6	1			
Ja	53	68,9	2,25 (1,01-5,04)	0,03		
<b>Aktuelle Splenomegalie</b>						
Nein	116	55,2	1			
Ja	14	85,7	4,88 (1,01-46,32)	0,03		
<b>Splenomegalie in den ersten 6 Lebensmonaten</b>						
Nein	100	52,0	1			
Ja	30	80,0	3,69 (1,31-11,9)	0,006		

Adjustierte Odds Ratios stammen aus einem logistischen Regressionsmodell mit schrittweiser Entfernung von Faktoren, die in multivariater Analyse nicht assoziiert sind ( $p > 0,05$ ). Das finale Modell enthält Daten von 98 Kindern ( $R^2 = 0,15$ ). \*, weitere Adjustierung des Modells für normale vs. hohe CRP-Spiegel verändert den Risikoschätzer nur minimal: aOR: 4,29 (95%KI: 1,49-12,35);  $p = 0,007$ .

## **4. Diskussion**

Die Diskussion der vorliegenden Arbeit gliedert sich in zwei thematische Schwerpunkte. Im ersten Teil der Diskussion werden der Aufbau der Studie und die angewandten Methoden kritisch erörtert. Im zweiten Teil erfolgt die Diskussion der erhobenen Ergebnisse.

### **4.1 Diskussion des Studiendesigns und der verwendeten Methoden**

#### **4.1.1 Studiendesign**

Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten von 136 Müttern und deren Neugeborenen ausgewertet. Aufgrund der mangelnden Infrastruktur vor Ort und der nötigen monatlichen Termine in der Klinik war zur Aufrechterhaltung der Compliance ein studienortnaher Wohnort der Probanden ein wichtiges Einschlusskriterium. 88,2 % der Frauen lebten direkt in Agogo, 11,8 % der Frauen kamen aus den umliegenden Dörfern. Vorteil der relativ kleinen Studiengruppe war die verhältnismäßig niedrige Ausfall-Quote von 9,3 %. Nachteilig war die bis zur 12. Woche kleine Untergruppe der mit *P. falciparum* infizierten Säuglinge. Eine statistische Auswertung war erst ab der 16. Lebenswoche sinnvoll. Die Rekrutierungsphase dauerte von Januar bis August 2000. Dadurch waren die Probanden unterschiedlichen klimatischen Expositionen ausgesetzt. Generell erstreckt sich die Trockenzeit in dem Studiengebiet von Januar bis April und die Regenzeit von April bis Juni. Exakte Daten über die Niederschlagsmenge vor Ort wurden nicht erhoben. Im Vergleich zu anderen Studien waren die saisonalen Unterschiede bezüglich der Prävalenz einer Malaria aber nur gering. Eine plazentare Infektion konnte in der Trockenzeit bei 58,3 % der Mütter diagnostiziert werden während in der Regenzeit 54,0 % der Mütter infiziert waren. Bei den Säuglingen betrug der Anteil infizierter Kinder in der Regenzeit 16,6 % und in der Trockenzeit 16,9 %. Aufgrund der nur geringen Schwankungsbreite wurde auf eine gesonderte Betrachtung verzichtet.

Bei der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse muss bezüglich der Anämie-Prävalenz und der Persistenz der Infektion mit *P. falciparum* berücksichtigt werden, dass die Kinder mit Fieber und nachweisbarer Infektion aus medizinischen und ethischen Gründen suffizient therapiert wurden und sich somit das Ausmaß der Anämie in dem Probandenkollektiv gegebenenfalls verringert hat.

#### **4.1.2 Klinische Untersuchung der Gebärenden und Gewinnung von plazentarem Blut**

Die klinische Untersuchung der Schwangeren erfolgte durch verschiedene Hebammen des Agogo Krankenhauses. Die Ergebnisse der Untersuchungen unterlagen aufgrund der zum Teil subjektiven Beurteilung individuellen Schwankungen.

Die Blutgewinnung aus der Plazenta erfolgte nach Inzision (s. 2.3.3). Die verschiedenen Methoden der plazentaren Blutgewinnung zeigen in der Literatur untereinander keine signifikanten Unterschiede in Spezifität und Sensitivität im Vergleich zur Histologie (Rogerson *et al.*, 2003).

#### **4.1.3 Klinische Untersuchungen der Kinder**

Die Bestimmung des Geburtsgewichtes erfolgte immer mit derselben Waage, so dass diese Ergebnisse gut vergleichbar sind. Die Messung der Länge erfolgte entweder mit einer speziellen Messlatte oder mit einem Zentimetermaß, so dass zwischen diesen Methoden Unterschiede bestehen können. Die von der WHO (2006) verwendeten Referenzwerte sind speziell für gestillte Kinder aus verschiedenen Ethnien entwickelt worden.

Die Bestimmung des Gestationsalters erfolgte nach Finnström *et al.* (1977). Unklar ist, ob das ursprünglich für Kaukasier entwickelte Verfahren direkt auf afrikanische Neugeborene übertragen werden kann. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der stärkeren Hautpigmentierung und der vermehrten Kopfbehaarung die Neugeborenen der Studie tendenziell als zu reif beurteilt wurden. Eine an afrikanische Neugeborene angepasste Bestimmungsmethode existiert nicht.

Bei der Bewertung der Daten bezüglich der Splenomegalie ist zu berücksichtigen, dass eine sonographische Bestimmung der Milzgröße aus logistischen Gründen nicht durchgeführt wurde und die palpatorische Beurteilung der Milzgröße relativ ungenau ist. Bei einer atypischen Lage der Milz kann eine Splenomegalie übersehen werden (Burchard *et al.*, 2001). Zuverlässige Daten über die Ernährung der Kinder, insbesondere über das Stillen, liegen nicht vor. Eine Prüfung der These, wonach Muttermilch ein Teil des vermuteten „Nestschutzes“ der Säuglinge ist (Hendrickse *et al.*, 1958), konnte nicht erfolgen.

#### **4.1.4 Diagnostik einer Infektion mit *P. falciparum* mittels Mikroskopie, PCR und ICT**

Für die Bestimmung der peripheren Parasitämien wurde die Anzahl der asexuellen Parasiten auf 500 Leukozyten bestimmt und die Parasitämie rechnerisch aus der Zahl der Leukozyten/ $\mu$ l Blut und der Anzahl der ausgezählten Plasmodien ermittelt. Im Vergleich zur Auszählung der

Parasiten auf 200 Leukozyten können so auch geringe Parasitendichten bis zu 10 Parasiten/ $\mu$ l Blut erfasst werden (Clendennen *et al.*, 1995). Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass inter-individuelle Schwankungen der Leukozytenzahl zu einer veränderten Parasitendichte führen. Zur Bestimmung der plazentaren Parasitämie erfolgte die Auszählung der Parasiten pro 100 Blickfelder. Eine Auszählung der Parasiten auf die Anzahl der Leukozyten bedingt ungenaue Ergebnisse, da keine sicheren Normwerte zu Leukozytenzahlen in plazentarem Gewebe existieren und diese zusätzlich durch die chronische Intervillositis verändert sind (Ordi *et al.*, 1998). Genereller Nachteil der Mikroskopie ist, dass Sensitivität und Spezifität von der Erfahrung und der Motivation des Untersuchers sowie der Laborausstattung abhängig sind (Ohr *et al.*, 2007). Zur Erfassung submikroskopischer Infektionen wurde von allen Proben eine PCR durchgeführt. Mit der PCR ist es möglich, Parasitendichten bis zu einer unteren Grenze von 2,5 Parasiten/ $\mu$ l Blut zu erfassen (Snounou *et al.* 1993).

Zunehmend verbreitet sind die „Malaria-Schnelltests“ (Ohr *et al.*, 2007). Wir führten den ICT Malaria P.f./P.v.®, Becton Dickinson, durch. Dieser Test hat, verglichen mit der PCR, eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 97 %. Ursache von falsch-negativen Ergebnissen sind zumeist Parasitendichten  $< 100$  Parasiten/ $\mu$ l Blut (Pieroni *et al.* 1998). Vorteile des ICT gegenüber Mikroskopie und PCR sind die schnelle und einfache Handhabung, die weitgehend unabhängig von der Erfahrung des Untersuchers ist. Nachteil ist die geringere Sensitivität beim Nachweis anderer Plasmodien als *P. falciparum*.

#### **4.1.5 Bestimmung der hämatologischen Parameter und Definition einer Anämie**

Für die Bestimmung des Hämatokrits, der Erythrozytenzahl, des mittleren korpuskulären Volumens und der Leukozytenzahl wurde ein halbautomatisches Zellzählgerät, der Clinicon HC555 verwendet. Da dieses Gerät durch die klimatischen Bedingungen bei der Bestimmung des Hämoglobingehaltes sehr störanfällig war, erfolgte die Bestimmung des Hämoglobingehaltes mit dem HemoCue Photometer. Der HemoCue Photometer liefert im Vergleich zu konventionellen Zellzählgeräten verlässliche Werte und eignet sich zur initialen Diagnostik einer Anämie (Munoz *et al.*, 2005).

Die genauen, verwendeten altersspezifischen Grenzwerte sind im Ergebnisteil beschrieben (siehe 3.6.3), sie orientieren sich an den Referenzwerten für europäische Kinder. Spezielle Grenzwerte für Anämien bei afrikanischen Kindern existieren nicht.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Zusammenhänge zwischen milden und moderaten Anämien und asymptomatischen Parasitämien im ersten halben Lebensjahr sowie den Einfluss maternaler Infektionen auf die Prävalenz von Anämien bei sechs Monate alten Säuglingen näher zu untersuchen. Als Risikofaktoren für eine Anämie bei den Säuglingen wurden mit der multivariaten Analyse mittels logistischer Regression Eisenmangel, eine zeitgleich bestehende Infektionen mit *P. falciparum* und eine mikroskopisch nachweisbare plazentare Infektion ermittelt.

### 4.2.1 Prävalenz maternaler Infektionen mit *P. falciparum* und maternaler Anämie

Trotz der in Endemiegebieten gebildeten Teilimmunität bei Erwachsenen ist das Risiko für eine Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft deutlich erhöht (Menendez *et al.*, 2000). Die in dieser Studie mittels PCR diagnostizierte Prävalenz einer plazentaren Malaria von 55,9 % deckt sich mit anderen Ergebnissen aus dem Studiengebiet (Mockenhaupt *et al.*, 2000 & 2002 & 2006).

Die beschriebene unzureichende Aussagekraft der Mikroskopie des peripheren Blutes zur Diagnostik einer Malaria in der Schwangerschaft konnte in dieser Studie bestätigt werden (Mockenhaupt *et al.*, 2002 & 2006). Bei 55,9 % der Mütter konnte mit der PCR eine Infektion mit *P. falciparum* in der Plazenta nachgewiesen werden, während die Mikroskopie des peripheren dicken Tropfens nur bei 14,7 % der Proben positiv war. Die PCR des peripheren Blutes der Mutter wies in 46,3 % Infektionen nach. Der ICT war in dieser Studie wie auch schon in der Literatur beschrieben (Mockenhaupt *et al.*, 2006) sensitiver im Nachweis einer maternalen Malaria als die Mikroskopie. Für die erhöhte Malariaprävalenz in der Schwangerschaft, insbesondere die plazentare Malaria, werden spezifische Stämme von *P. falciparum* verantwortlich gemacht (s. 1.1.5).

Vergleichbar zu anderen Studienergebnissen (Menendez *et al.*, 2000; Mockenhaupt *et al.*, 2002) war die Infektionsprävalenz bei den Primiparae deutlich höher als bei den Multiparae. Erstgebärende hatten im Vergleich zu den Mehrfachgebärenden (Parität  $\geq 4$ ) ein signifikant erhöhtes Risiko für eine plazentare Infektion mit *P. falciparum* (Tab. 5 b). Diese Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass es mit zunehmender Parität zur Entwicklung spezifischer Immunmechanismen kommt (Buffet *et al.*, 1999; Ricke *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie bestand kein Zusammenhang zwischen der Parität und dem Besuch der Schwangerschaftsvorsorge und dem Bildungsstand der Frauen. Exakte Daten über die Nutzung von Präventionsmaßnahmen, z.B. die wöchentliche Einnahme von Pyrimethamin (25



mg) und die Nutzung von Moskitonetzen liegen nicht vor. Auffällig zwischen den Gruppen war das signifikant niedrige Plazentagewicht der Primiparae. Eine Assoziation zwischen einer plazentaren Malaria und dem Plazentagewicht bestand nicht. Diese Beobachtung stützt die Ergebnisse von McGregor *et al.* (1983), die ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bezügl. des Plazentagewichts zwischen infizierten und nicht-infizierten Plazenten fanden.

Von den Frauen waren 30,1 % bei der Geburt anämisch (Grenzwert Hb < 11 g/dl). Im Vergleich zu anderen Studien ist diese Anämie-Prävalenz für ein Malariaendemiegebiet niedrig (Rogerson *et al.*, 2000; Mockenhaupt *et al.*, 2006). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die hämatologischen Parameter der Schwangeren kurz vor der Geburt erhoben wurden, einem Zeitpunkt, zu dem der Hb-Spiegel oft wieder ansteigt (Brabin, 1990). Eine Anämie ist als eine der Hauptmanifestationen einer Malaria in der Schwangerschaft in Endemiegebieten beschrieben (Guyatt *et al.*, 2001). Diese Beobachtung konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Es bestand keine signifikante Assoziation zwischen einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* und maternaler Anämie. Auch das erhöhte Risiko Erstgebärender für eine Anämie (Brabin, 1990; Mockenhaupt *et al.*, 2000) traf bei unseren Probandinnen nicht zu. Die in der Literatur beschriebene Assoziation zwischen maternaler Anämie und Frühgeburtslichkeit (Stoltzfus *et al.*, 1997) konnte, am wahrscheinlichsten aufgrund der zu kleinen Gruppengröße, in unserem Studienkollektiv ebenfalls nicht beobachtet werden.

In die Differentialdiagnostik sind weitere Ursachen einer Anämie in der Schwangerschaft wie der erhöhte Eisen- und Folsäurebedarf von Schwangeren sowie die in der Einleitung (s. 1.2.1) beschriebenen Ursachen einer Anämie wie Infektionen und Hämoglobinopathien (Fleming *et al.*, 1989) mit einzubeziehen.

#### **4.2.2 Konnatale Malaria**

Im Rahmen dieser Studie konnte bei keinem Kind eine konnatale Malaria diagnostiziert werden. Die Blutprobe wurde innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt entnommen und entsprach somit nicht der Definition von konnataler Malaria nach Balaka *et al.* (2000). Eine Blutprobe nach 7-10 Tagen wurde nicht abgenommen (McGregor *et al.*, 1983; Balaka *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu unserer Studie konnten Wagner *et al.* (1998) im südlichen Ghana bei 13,6 % der Neugeborenen direkt nach Geburt eine Infektion mit *P. falciparum* mit der PCR im peripher-venösen Blut diagnostizieren. Die mit der PCR ermittelte Prävalenz maternaler Malaria im peripheren Blut war geringer als in unserer Studie (25 % vs. 46,3 %). Kein Kind in der Studie aus Südghana hatte klinische Symptome einer Malaria und nach 2 Wochen waren bei keinem der zuvor positiv getesteten Säuglinge noch Parasiten nachzuweisen. Diese Beobachtung unterstützt einerseits die Theorie, dass Säuglinge über Mechanismen verfügen,

die die Parasitenreplikation unterbinden können (Brabin *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1998). Andererseits könnte es sich bei der postpartum positiv getesteten Blutprobe um eine Kontamination handeln.

Die Symptome konnataler Malaria sind zumeist unspezifisch, jedoch zeigt eine Auswertung von 49 dokumentierten Fällen von Viaraghaven *et al.* (2000), dass 100 % der Kinder unter Fieber litten. In unserer Studie hatten 16,7 % der Kinder bei Geburt Fieber. Bei keinem dieser Kinder konnte eine Infektion mit *P. falciparum* diagnostiziert werden. Auch der Zusammenhang zwischen Fieber der Neugeborenen und einer plazentaren Infektion der Mutter war statistisch nicht signifikant. Weitere klinische Symptome sind postpartal nicht erhoben wurden.

#### **4.2.3 Einfluss der plazentaren Infektion mit *P. falciparum* auf den Fetus**

Eine plazentare Infektion mit *P. falciparum* erhöht das Risiko für ein niedriges Geburtsgewicht entweder bedingt durch eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) oder Frühgeburtlichkeit (Sullivan *et al.*, 1999, Menendez *et al.*, 2000). 16,2 % der Kinder kamen mit einem Geburtsgewicht < 2500 g zur Welt. Knapp 70 % der Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht wurden vor vollendeter 37. Schwangerschaftswoche geboren. Mütter, die ein Kind mit niedrigem Geburtsgewicht gebären, waren zu 72,7 % Erstgebärende. Die Abhängigkeit des Geburtsgewichts von der Parität wird durch andere Studien (Menendez *et al.*, 2000, Okoko *et al.*, 2002) in endemischen Malariagebieten bestätigt. Eine plazentare Infektion mit *P. falciparum*, unabhängig von der Parität, führte in unserem Probandenkollektiv, im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien (Okoko *et al.*, 2002; Rogerson *et al.*, 2003) nicht zu einem reduzierten Geburtsgewicht.

Sullivan *et al.* (1999) beschrieben, dass insbesondere eine Infektion in einem späten Stadium der Schwangerschaft das Risiko für eine Frühgeburt erhöht. In der vorliegenden Studie ging sowohl eine plazentare Infektion als auch das Vorliegen einer ersten Schwangerschaft mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine Frühgeburt einher. Insgesamt 17,6 % der Neugeborenen kamen vor vollendeter 37. Schwangerschaftswoche zur Welt. 75 % der infizierten Mütter sowie 70,8 % der Primiparae gebären ein Kind frühzeitig. Genaue Angaben über den Infektionszeitpunkt liegen nicht vor. Mögliche Ursache der Frühgeburtlichkeit ist der inflammatorische Prozess in der Plazenta, der zu einem Ungleichgewicht der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 führt (Suguitan *et al.*, 2003).

#### **4.2.4 Infektion mit *P. falciparum* im ersten halben Lebensjahr**

Aufgrund des in der Einleitung beschriebenen „Nestschutzes der Neugeborenen“ wie hohe Spiegel an fetalem Hämoglobin (Pasvol *et al.*, 1976 & 1977), transplazentare Übertragung mütterlicher Antikörper (Brabin *et al.*, 1990), geringe Zufuhr an para-Aminobenzoesäure mit der Muttermilch (Maegraith *et al.*, 1952) und transplazentare Übertragung von Malariamedikamenten von der Mutter auf das Kind (Mutabingwa *et al.*, 1994) wird in Malariaendemiegebieten sowohl die Prävalenz klinisch manifester Malaria tropica in den ersten 6 Lebensmonaten (Brabin *et al.*, 1990) als auch die Prävalenz von asymptomatischen Parasitämien, insbesondere in den ersten 3-4 Lebensmonaten, gering eingeschätzt (Hogh *et al.*, 1991; Akanmori *et al.*, 1995). Es existieren jedoch nur wenige Längsschnittstudien über die Prävalenz asymptomatischer Parasitämien bei Kindern unter 6 Monaten.

##### **4.2.4.1 Prävalenz und Risikofaktoren einer Infektion mit *P. falciparum***

Bei 39,7 % der Kinder konnte im ersten halben Lebensjahr mindestens eine Infektion mit *P. falciparum* diagnostiziert werden. Die früheste Infektion wurde bei einem Kind mit 4 Wochen diagnostiziert. Das mittlere Alter bei der ersten Infektion lag bei 17 Wochen. Die Punktprävalenzen der Infektion stiegen kontinuierlich von 1,5 % bei den 4 Wochen alten Säuglingen bis auf 31 % bei den 28 Wochen alten Säuglingen an (siehe Tab. 6 und Abb. 4). Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren nicht signifikant. Knapp 90 % der Infektionen wurden an den Routineterminen diagnostiziert. Deutlich geringere Prävalenzen asymptomatischer Parasitämien beschrieben Wagner *et al.* (1998) in einer vergleichbaren Längsschnittstudie im südlichen Ghana in einem Gebiet direkt an der Küste. Sie ermittelten mit der PCR eine Infektionsprävalenz von 1,5 % mit 2 Wochen und einen Anstieg auf 9,7 % mit 26 Wochen. Auch die durchschnittlich erste Infektion trat wesentlich später als in unserer Studie auf (42 Wochen vs. 17 Wochen). Eine wahrscheinliche Erklärung für die unterschiedlichen Infektionshäufigkeiten ist die höhere Endemizität in der Ashanti Region, dem Studiengebiet der vorliegenden Arbeit, gegenüber der Küstenregion (Browne *et al.*, 2000).

Klinkenberg *et al.* (2006) ermittelten für Kinder in elf Gemeinden in Kumasi eine mikroskopische Parasitenprävalenz zwischen 2,3 % und 32,7 % (Mittelwert von 8,6 %) im peripheren Blutaussstrich. Die Daten lassen sich nur eingeschränkt mit unseren vergleichen, da die Kinder zwischen 6 und 60 Monaten alt waren. Die von uns beobachteten Prävalenzen mikroskopischer Parasitämien lagen ab der 12. Woche über dem von Klinkenberg *et al.* (2006) für die Gemeinden Kumasis bestimmten Mittelwert. Mögliche Ursache ist das ländlichere Studiengebiet Agogos im Vergleich zu Kumasi. Die höhere Malariatransmission

in ländlichen Gebieten Afrikas ist beschrieben (Hay *et al.*, 2005). Gründe hierfür sind höhere Vektordichte, schlechtere Wohnverhältnisse und schlechtere Kanalisation (Lindsay *et al.*, 1990). Durch einen eingeschränkteren Zugang zu Krankenhäusern bzw. Gesundheitszentren wird die Morbidität und Mortalität der Malaria zusätzlich gesteigert (Hay *et al.*, 2005).

Wie aufgrund der abnehmenden Immunitätsmechanismen, die vor einer Parasitenreplikation jedoch nicht vor einer Infektion *per se* schützen, zu erwarten war, nahm ab der 16. Woche der Anteil der mikroskopischen Infektionen kontinuierlich zu. Mit 16 Wochen waren 30,8 % der Infektionen mikroskopisch nachweisbar und mit 28 Wochen 60 % der Infektionen (Tab. 6). Ein Anstieg der Prävalenz einer Infektion mit *P. falciparum* stimmt mit den Ergebnissen anderer wissenschaftlicher Arbeiten überein (Brabin *et al.*, 1990; Kitua *et al.* 1996). Eine der möglichen Ursachen ist die Abnahme des fetalen Hämoglobins im Rahmen der physiologischen Trimenonreduktion (Pasvol *et al.*, 1976 & 1977; Shear *et al.*, 1998). Angaben zum HbF-Anteil liegen für die Kinder bei der Geburt vor. Kinder, die bei Geburt einen mittleren höheren HbF-Spiegel hatten, waren im gesamten Beobachtungszeitraum seltener mit *P. falciparum* infiziert als die Kinder mit niedrigeren fetalen Hämoglobinspiegeln (siehe Tab. 9).

Die Parasitendichte stand in keinem signifikanten Zusammenhang zum Alter der Kinder. Die höchsten Parasitendichten wurden mit 16 Wochen bestimmt und die niedrigsten mit 4 Wochen, gefolgt von den 28 Wochen alten Säuglingen. Die Ergebnisse widersprechen denen anderer Studien (Hogh *et al.*, 1995; Henning *et al.*, 2004), die einen Anstieg der Parasitendichten bis zur 28. Woche beschrieben. Aufgrund der kleinen Gruppe der Kinder mit mikroskopisch nachweisbarer Infektion sind die Angaben zur Parasitämie mit Vorbehalt zu betrachten.

Wie auch in anderen Studien beschrieben (Le Hesran *et al.*, 1997) bestand bei unseren Probanden eine signifikante Assoziation zwischen maternaler Malaria und der Infektionswahrscheinlichkeit der Kinder. Konnte bei der Mutter eine plazentare Malaria diagnostiziert werden, waren die Kinder ab der 16. Woche signifikant häufiger mit *P. falciparum* infiziert (Tab. 8) und hatten insgesamt längere Infektionsperioden bzw. häufigere Infektionen als die Kinder von nicht-infizierten Müttern. Eine weitere Beobachtung ist, dass die Kinder, die im ersten halben Lebensjahr mit *P. falciparum* infiziert waren, signifikant jüngere Mütter hatten. Beide Beobachtungen lassen sich am ehesten mit sozioökonomischen Faktoren wie Wohnort (Pichainarong *et al.*, 2004), fehlende Verwendung von Moskitonetzen und Insektensprays, Bildungsstand der Mutter (Mwangi *et al.*, 2003) und finanziellem Status (Onwujekwe *et al.*, 2005) erklären.

Weiterhin kann ein durch die plazentare Malaria bedingtes niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtslichkeit (Sullivan *et al.*, 1999, Menendez *et al.*, 2000) zu Dystrophie und einer generell erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen führen. Gegen diese Annahme spricht, dass bei den untersuchten Kindern zu keinem Zeitpunkt eine Assoziation zwischen dem Gewicht und einer Infektion mit *P. falciparum* bestand.

#### **4.2.4.2 Klinisch-manifeste Malaria im ersten halben Lebensjahr**

Als klinisch-manifeste Malaria definierten wir den mikroskopischen Nachweis von Plasmodien und Fieber (Gilles *et al.*, 1991). Die insgesamt im Gegensatz zu den asymptomatischen Infektionen deutlich niedrigere Prävalenz klinischer Malaria (Abb. 5) deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Brabin *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1998). Die erste klinische Malaria manifestierte sich im dritten Lebensmonat, mit Maximalwerten mit 28 Wochen (siehe 3.4.2). Auch Hogg *et al.* (1995) beobachteten in Liberia die meisten Fälle klinisch-manifester Malaria bei Säuglingen in diesem Alter.

Die Abgrenzung zwischen asymptomatischer Parasitämie und unkomplizierter Malaria ist schwierig, da keine eindeutigen Definitionen vorliegen. Kriterien wie Fieber, andere unspezifische Symptome und unterschiedliche Parasitendichten werden verwendet, oft wird jedoch Afebrilität mit Asymptomatik gleichgesetzt. Fieber als Manifestation einer Malaria (Cox *et al.*, 1994) eignet sich aufgrund der zirkardianen Periodik und der oft untypischen Klinik im Kindesalter nur bedingt. Parasitendichten werden zudem unterschiedlich toleriert. Säuglinge in Tanzania reagieren ab einer Parasitämie von ca. 100 Plasmodien/ $\mu$ l Blut mit Fieber, wohingegen Kinder < 2 Jahren erst ab ca. 3500 Parasiten/ $\mu$ l Fieber entwickeln (Premji *et al.*, 1995). Zudem hängen die pyrogenen Grenzwerte von der Endemizität ab.

Die insgesamt niedrige Prävalenz von Fieber mit durchschnittlich knapp 5 % an den Routineterminen im Gegensatz zu durchschnittlich 20,6 % bei Kindern < 6 Monaten in einer Studie von Bloland *et al.* (1999) erklärt sich am ehesten durch eine antipyretische Therapie durch die Eltern. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer bestehenden Infektion mit *P. falciparum* und Fieber bestand lediglich für die Kinder mit 16 und 28 Wochen. Die Körpertemperatur an den einzelnen Terminen war unbeeinflusst davon, ob die zeitgleich bestehende Infektion mikroskopisch oder submikroskopisch nachweisbar war. Eine Assoziation zwischen der Parasitendichte und Fieber bestand nur bei Kindern mit 28 Wochen. Die mangelnde Korrelation zwischen Fieber und einer Infektion mit *P. falciparum* wurde auch in anderen endemischen Malariagebieten beobachtet (Rogier *et al.*, 1996; Bouvier *et al.*, 1997). Von den Kindern, die außerhalb der regulären Termine kamen, hatten 71,4 % Fieber und bei 70 % konnte eine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen werden. Jedoch war der

Zusammenhang aufgrund der kleinen Fallzahl nicht signifikant. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass Fieber und die Parasitendichte tageszeitlichen Schwankungen unterliegen (Färnert *et al.*, 1997; Delley *et al.*, 2000) und dadurch unserer Erfassung entgingen.

Zusätzlich zum Fieber untersuchten wir die Prävalenz einer Splenomegalie als mögliche klinische Manifestationsform einer Infektion mit *P. falciparum*. Eine Splenomegalie spricht für die Existenz chronisch-persistierender Parasitämien (May *et al.*, 1999). Der Prozentsatz der Splenomegalie (Tab. 7) liegt unter den Erwartungen für ein endemisches Malariagebiet (Garnham *et al.*, 1966). Jedoch werden für die Splenomegalie insbesondere Mischinfektionen verantwortlich gemacht (May *et al.*, 1999). Angaben über Mischinfektionen bei den Kindern liegen nicht vor. Für die 16, 24 und 28 Wochen alten Säuglinge bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *P. falciparum* und einer Splenomegalie. Eine Korrelation zwischen hoher Parasitendichte und Splenomegalie bestand für die 24 und 28 Wochen alten Säuglinge. Bei den Kindern, bei denen zeitgleich Fieber und eine Splenomegalie bestand, konnte immer eine Infektion mit *P. falciparum* diagnostiziert werden. Aufgrund der niedrigen Fallzahl (9 Kinder insgesamt) sind weitere Aussagen nicht möglich.

Eine zerebrale Malaria als klinische Manifestation einer Infektion mit *P. falciparum* wurde in dem beschriebenen Beobachtungszeitraum nicht diagnostiziert. Die zerebrale Manifestation einer Infektion mit *P. falciparum* wird vermehrt bei älteren Kindern und in Gebieten mit niedriger Erregerübertragung beobachtet (WHO, 2000; Oduro *et al.*, 2007).

#### **4.2.5 Anämie und Malaria im ersten halben Lebensjahr**

Die Häufigkeit der Anämie in unseren Untersuchungen lag bei 52,4 %, mit einem Minimum von 38,5 % bei den 4 Wochen alten Säuglingen und einem Maximum von 61,5 % mit 20 Wochen (Abb. 10). Zu einem vergleichbaren Ergebnis bezüglich der Anämiehäufigkeit (47,2 %), allerdings bei wesentlich älteren Kindern, kam eine Querschnittsstudie in Ghana in den Städten Accra und Kumasi (Klinkenberg *et al.*, 2006). Im Vergleich zu anderen Studien (Kitua *et al.*, 1997; Bloland *et al.*, 1999; Schellenberg *et al.*, 2003) in Gebieten mit ganzjähriger Malariaübertragung ist die Anämieprävalenz als gering einzustufen. Mögliche Gründe hierfür sind die regelmäßigen Besuche der Schwangerschaftsvorsorge sowie die kostenfreie ärztliche Betreuung der Kinder. Unsere Probandinnen besuchten durchschnittlich viermal die Schwangerschaftsvorsorge und erhielten dort regulär eine Eisen- und Folsäuresubstitution, so dass der Anteil an Eisen- und Folsäuremangelanämien reduziert sein könnte. Zudem wurden die Kinder im Rahmen der Studie regelmäßig in der Klinik untersucht und eine Infektion mit *P. falciparum*, aber auch andere Erkrankungen, die mit einer Anämie assoziiert sein können, wurden adäquat therapiert.

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Ursachen der Anämie im Kindesalter multifaktoriell (Crawley, 2004). Neben einer Malaria müssen auch andere Ursachen wie Mangelernährung, insbesondere Folsäure- und Eisenmangel, Bilharziose, hereditäre Hämoglobinopathien, Infektionen mit Hakenwürmern oder dem HI-Virus berücksichtigt werden (Stoltzfus *et al.*, 2000; Crawley, 2004). Von den möglichen differentialdiagnostischen Ursachen erfassten wir in unserer Studie das Vorliegen einer Eisenmangelanämie.

Trotz der vielfältigen Ätiologien wird eine Anämie in Malariaendemiegebieten hauptsächlich durch eine Infektion mit *P. falciparum* hervorgerufen (Menendez *et al.*, 2000). Untersucht man die Prävalenz einer Anämie getrennt für die infizierten und die nicht-infizierten Säuglinge dieser Studie, so hatten mit Ausnahme der 4. und 12. Lebenswoche die Säuglinge mit einer *P. falciparum* Infektion signifikant häufiger eine Anämie (Abb. 10). Die Hauptmechanismen, die zur Malaria-assoziierten Anämie führen, sind neben der Hämolyse infizierter Erythrozyten (Phillips *et al.*, 1992) der Abbau nicht-infizierter Zellen (Looareesuwan *et al.*, 1987) und die Dyserythropoese (Clark *et al.*, 1988).

Der Hämoglobinwert fiel im Rahmen der physiologischen Trimenonreduktion sowohl bei den infizierten als auch bei den nicht-infizierten Kindern bis zur 12. Lebenswoche kontinuierlich ab (Abb. 7). Ab der 12. Woche blieb der Hb-Wert der nicht-infizierten Kinder auf einem konstant niedrigen Niveau, während der Hb-Wert der infizierten Kinder bis zur 16. Woche weiter abfiel. Im selben Zeitraum wurde eine deutliche Zunahme der Infektionen mit *P. falciparum* beobachtet. Der Hämoglobin-Abfall war in der Gruppe der infizierten Kinder deutlich ausgeprägter als bei den nicht-infizierten Kindern (Abb. 8).

Die mangelnde Korrelation zwischen Parasitendichte und der Schwere der Anämie wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Dondrop *et al.*, 1999; Schellenberg *et al.*, 1999). Als Erklärung kommt am ehesten die Phagozytose der nicht-infizierten Erythrozyten durch die verstärkte Aktivität des retikuloendothelialen Systems in Frage. Ekvall *et al.* (2001) konnten in Tanzania bei Kindern < 2 Jahren keinen Zusammenhang zwischen der aktuellen Parasitendichte und dem Hb-Spiegel feststellen, beobachteten aber einen kumulativen Effekt der Parasitämie bei der Entwicklung einer Anämie.

Kontroverse Meinungen existieren darüber, ob mikroskopische oder submikroskopische Infektionen verstärkt die Entwicklung einer Anämie beeinflussen. Einige Autoren postulieren, dass insbesondere niedrige bzw. asymptomatische Infektionen mit *P. falciparum* wesentliche Ursache für die Anämien bei Kindern in Malariaendemiegebieten sind (Kitua *et al.*, 1997; Schapira *et al.*, 1993, Schellenberg *et al.*, 2003). Ob hierfür eher die Dyserythropoese (Clark *et al.*, 1988) oder eine verstärkte Hämolyse von infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten (Kitua *et al.*, 1997) verantwortlich ist, bleibt strittig. Wir fanden keinen signifikanten

Unterschied beim Hämoglobin-Abfall zwischen mikroskopischen und submikroskopischen Infektionen. Eine andere Theorie ist, dass die Anämie bei Kindern mit klinisch-manifester Malaria stärker ausgeprägt ist als bei Kindern mit asymptomatischen Parasitämien (Ekvall, 2001). Eine Vermutung ist, dass es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer unspezifischen Immunantwort, Ausschüttung von O<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub>-Radikalen durch Makrophagen kommt und diese zu oxidativen Schäden an parasitär befallenen, aber auch besonders an nicht-parasitierten Erythrozyten führt (Greve *et al.*, 2000, Griffiths *et al.*, 2001). Eine Überprüfung dieser These war in unserer Arbeit, bedingt durch die wenigen Fälle klinischer Malaria, nicht sinnvoll.

#### **4.2.6 Risikofaktoren für eine Anämie**

In der univariaten Analyse wurden folgende Einflussfaktoren für eine Anämie mit 28 Wochen ermittelt: plazentare Infektion mit *P. falciparum*, aktuelle Infektion der Kinder, Anzahl der Malariaepisoden im gesamten Beobachtungszeitraum, Eisenmangel, Fieber und Splenomegalie. In der multivariaten Analyse mittels logistischer Regression ließen sich Eisenmangel, aktuelle Infektion mit *P. falciparum*, sowie eine plazentare mikroskopische Infektion als Risikofaktoren für eine Anämie bestätigen. Keinen Einfluss auf eine Anämie hatten eine peripartale Anämie der Mutter, die Anzahl der Gravidität, das Geburtsgewicht, das Gestationsalter und der fetale Hämoglobin-Spiegel.

##### **4.2.6.1 Infektion mit *P. falciparum***

Cornet *et al.* (1998) ermittelten in einer Studie im südlichen Kamerun eine plazentare Malaria als Risikofaktor für eine Anämie bei 6 Monate alten Säuglingen. Diese Beobachtung ließ sich in unserer Studie nur zum Teil bestätigen. Nach logistischer Regression erwies sich nur eine mikroskopische plazentare Infektion als Risikofaktor für eine Anämie. Der Einfluss der submikroskopischen plazentaren Infektion war nicht signifikant. Kinder, bei deren Müttern peripartal eine mikroskopische plazentare Infektion mit *P. falciparum* nachweisbar war, hatten 1,6-mal häufiger eine Anämie mit 28 Wochen als die Kinder, deren Mütter peripartal nicht infiziert waren. Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen plazentarer Malaria und kindlicher Anämie sind die im Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen sozioökonomischen Faktoren, die sowohl eine maternale Malaria als auch eine Infektion der Kinder mit *P. falciparum* begünstigen und dadurch das Risiko einer Anämie bei den Säuglingen erhöhen. Allerdings konnten Cornet *et al.* (1998) eine plazentare Malaria in der multivariaten Analyse als größten unabhängigen Risikofaktor für eine Anämie bei Säuglingen bestimmen. Daraus lässt sich schließen, dass eine direkte Assoziation zwischen plazentarer Malaria und Anämien



im Säuglingsalter besteht (Reed *et al.*, 1994; Cornet *et al.*, 1998). Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind ungeklärt. Denkbar ist eine reduzierte transplazentare Nährstoffzufuhr des Feten, insbesondere von Eisen, Folsäure und B12, vermittelt durch physikalische Alterationen der Trophoblastenmembran der infizierten Plazenta (Cornet *et al.*, 1998). Eine weitere These ist, dass immunologische Prozesse direkt die Hämolyse oder die Dyserythropoese beeinflussen (Reed *et al.*, 1994). Ein anderer Ansatz ist, dass die in-utero Exposition mit Malaria-Antigenen die immunologische Toleranz des Fetus beeinflusst und die Empfänglichkeit für eine Infektion mit *P. falciparum* erhöht (Nossal *et al.*, 1989; Le Hesran *et al.*, 1997) und es somit, wie es auch in unserem Probandenkollektiv zu beobachten war, zu rezidivierenden bzw. längeren Infektionsperioden kommt. Durch die wiederholte bzw. längere Exposition gegenüber den Parasiten wird wiederum das Risiko für eine Anämie erhöht. Wir beobachteten in unserer Studie, dass in der univariaten Analyse rezidivierende oder chronische Infektionen mit *P. falciparum* mit einem erhöhten Anämierisiko assoziiert waren. In der multivariaten Analyse war der Einfluss nicht mehr signifikant, am wahrscheinlichsten aufgrund von Interaktionen zwischen den Variablen. Es ist bekannt, dass Infektionen mit *P. falciparum* bei Erwachsenen über lange Zeit persistieren können. Bei einer Studie in Ghana persistierten die Infektionen (positiver Mikroskopiebefund) bei Säuglingen < 5 Monaten durchschnittlich nur ca. 4 Wochen, erst bei den Säuglingen > 5 Monaten wurden deutlich längere Infektionsperioden beschrieben (Franks *et al.*, 2001). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Studienergebnissen, wonach Infektionen mit *P. falciparum* bei Säuglingen nur von kurzer Dauer sind und folglich eher primär eliminiert als kontrolliert werden (Kitua *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1999). Die durchschnittliche Persistenz einer Infektion mit *P. falciparum* in unserer Studie betrug 8-12 Wochen, variierte jedoch mit den Diagnostikmethoden. Mikroskopisch war ein Parasitennachweis bis zu maximal 3 Monaten möglich, während mit der PCR niedrige Parasitämien bei einem Kind durchgehend von der 4. bis zur 28. Lebenswoche nachweisbar waren. Eine Erklärung hierfür ist der Nachweis niedrigerer Parasitämien mit der PCR (Snounou *et al.*, 1993) und unterstützt die Theorie, dass bereits im Säuglingsalter chronische, zumeist asymptomatische Malariaepisoden durchgemacht werden (Wagner *et al.*, 1998). Eine andere mögliche Erklärung ist die Erfassung parasitärer DNA sequestrierter Parasiten (Snounou *et al.*, 1993; Färnert *et al.*, 1999). Gegen diese Theorie sprechen die Beobachtungen von Jarra & Snounou (1998), die am Mausmodell nur für einen kurzen Zeitraum von 2 Tagen parasitäre DNA ohne aktuelle Infektion bestimmen konnten. Koram *et al.* (2003) beobachteten in Nordghana die niedrigsten Hb-Spiegel bei Kindern am Ende der Regenzeit und vermuteten, dass chronische u./o. rezidivierende Infektionen zu einem allmähliche Hb-Abfall führen. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass das

Knochenmark bei chronisch-rezidivierenden oder persistierenden Infektionen Anzeichen von Dyserythropoese und Erythrophagozytose zeigt (Clark *et al.*, 1988). Unklar ist, ob ein erhöhter TNF- $\alpha$ -Spiegel oder ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen diesen Prozess verursachen (Menendez *et al.*, 2000). Auch ungeklärt ist, inwieweit die Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum* das Ausmaß der Anämie beeinflusst. Mockenhaupt *et al.* (2003) zeigten in einer Studie in Nordghana, dass eine hohe Multiplizität zu einer Anämie bei Kindern mit klinisch-manifester Malaria führt. Die in Endemiegebieten hohe Multiplizität (Owusu-Agyei *et al.*, 2002) resultiert vor allen aus dem kumulativen Erwerb verschiedener Parasitenklone, also rezidivierenden Infektionen, die wiederum das Risiko einer Anämie erhöhen.

#### **4.2.6.2 Eisenmangelanämien**

Neben einer Infektion mit *P. falciparum* ist Eisenmangel eine weit verbreitete Ursache einer Anämie in Afrika südlich der Sahara (Stoltzfus *et al.*, 1997). Da Eisenmangelanämien zumeist erst ab dem 6. Monat beobachtet werden (Dallman *et al.*, 1980; Cornet *et al.*, 1998; Crawley, 2004), bestimmten wir das Ferritin nur für die 28 Wochen alten Säuglinge. Kinder mit niedrigem Ferritinspiegel hatten 1,5 mal häufiger eine Anämie im Vergleich zu den Kindern mit Ferritinspiegeln im Normbereich. Ferritin als sensitivster Indikator für einen Eisenmangel steigt bereits bei asymptomatischen Infektionen mit *P. falciparum* im Rahmen der akuten Phase-Antwort an und kann zu Fehlinterpretationen führen (Galan *et al.*, 1988). Um diesen Effekt auszugleichen bestimmten wir mit 28 Wochen zusätzlich zum Ferritin das CRP. Von den anämischen Kindern hatten 17 % gleichzeitig erhöhte Ferritin- und CRP-Werte, jedoch waren alle Ferritinwerte < 50 ng/ml und erfüllten damit die Kriterien eines Eisenmangels (siehe Tab. 17).

Ein kontroverses Thema ist die Eisensubstitution in Malariaendemiegebieten. Angaben über eine Eisensubstitution bei den Probanden, sowohl in der Schwangerschaft als auch bei den Kindern liegen nicht vor. Bekannt ist, dass Infektionen über eine verminderte Eisenresorption im Duodenum, vermittelt durch eine verstärkte Expression von Hepcidin (Ganz, 2003) sowie eine verstärkte Eisensequestrierung in Makrophagen zu einer Anämie führen können (Crawley *et al.*, 2004). Vermutet wird eine dadurch bessere Resistenz gegenüber Infektionen, da den Parasiten nicht genügend Eisen für den eigenen Stoffwechsel zur Verfügung steht (Jurado, 1997). Eine Studie in Sansibar zeigte, dass die Routinesupplementierung mit Eisen und Folsäure bei Kleinkindern in Malariaendemiegebieten zu vermehrten stationären Behandlungen und Todesfällen führte (Sazawal *et al.*, 2006). Ein Ansatz in der Anämitherapie bzw. Prävention ist, die Eisenspeicher in einer Zeitspanne aufzufüllen, in der

das Risiko für eine Malaria, bedingt durch den Nestschutz, gering ist (Crawley, 2004). In einer Studie in Tanzania wurde eine Eisensubstitution nur bei den 2 bis 6 Monate alten Säuglingen durchgeführt. Die Anämieprävalenz mit einem Jahr konnte signifikant gesenkt werden, ohne dass ein Anstieg klinisch-manifester Malaria zu verzeichnen war (Menendez *et al.*, 1997).

### **4.3 Schlussfolgerungen**

Anämien stellen weiterhin eines der größten Probleme des öffentlichen Gesundheitssystems in Afrika südlich der Sahara dar. Genauso wie die Genese der Anämie in Malariaendemiegebieten komplex ist, setzt sich auch eine sinnvolle Therapie bzw. Prävention aus verschiedenen Ansätzen zusammen.

Aufgrund der ausführlich diskutierten Risikofaktoren für eine Anämie kommt der Bekämpfung der Malaria eine Schlüsselrolle zu. Ein erfolgsversprechender Ansatz in der Reduktion der Infektionshäufigkeit mit *P. falciparum* bei Schwangeren ist die intermittierende präventive Behandlung mit einer Kombination aus Sulfadoxin und Pyrimethamin (IPT, intermittent preventive treatment). In dem selben Studiengebiet der vorliegenden Arbeit führte IPT in der Schwangerschaft zu einer Reduktion von plazentarer Malaria, maternaler Anämie und niedrigem Geburtsgewicht (Hommerich *et al.*, 2007). Eine dadurch bedingte Reduktion der Anämie bei den Säuglingen ist sehr wahrscheinlich, genaue Daten hierüber liegen nicht vor. IPT bei Kleinkindern in Ghana konnte die Inzidenz von Malaria, asymptomatischen Parasitämien und Anämien reduzieren, jedoch wurde nach Beendigung der Intervention ein Anstieg komplizierter Malaria, insbesondere schwerer Malaria-assoziiertes Anämien beobachtet (Mockenhaupt *et al.*, 2007). Zur Beurteilung von IPT im Kindesalter sind weitere Untersuchungen, insbesondere über den Einfluss der IPT in der Entwicklung der Teilimmunität, nötig.

Des Weiteren sollte die Malariatherapie möglichst kostengünstig sein, um die weit verbreitete Eigentherapie zu reduzieren, da asymptomatische Parasitämien, oft nach inadäquater Therapie, ursächlich für lebensbedrohliche Anämien sein können (Schapira *et al.*, 1993) und zur weiteren Resistenzbildung führen.

Von großer Bedeutung in der Reduktion der Malaria-assoziierten Anämien ist eine bessere Verbreitung imprägnierter Bettnetze, die allein (Lengeler *et al.*, 2004) oder besonders in Kombination mit IPT (Menendez *et al.*, 2007) das Malariarisiko deutlich senken konnten. Eine bessere Ausbildung und gesundheitliche Aufklärung der Frauen sowie eine Bekämpfung der Mangelernährung, insbesondere eine suffiziente Versorgung mit Mikronährstoffen wäre wünschenswert. Die gezielte Substitution mit Eisen und Vitaminen in Verbindung mit einer

adäquaten Malariatherapie reduziert vermutlich synergistisch die Prävalenz von Anämien bei Kindern in Malariaendemiegebieten (Ekvall *et al.*, 2000).

Zusammengefasst scheint eine gezielte Eisensubstitution in den ersten 6 Lebensmonaten, die Verwendung von imprägnierten Bettnetzen und eine adäquate Malariatherapie, eventuell eine Prävention als IPT, sinnvoll in der Anämieprävention im Säuglingsalter zu sein. Um dies zu gewährleisten, muss der Zugang zur medizinischen Versorgung in vielen ländlichen Gebieten Afrikas deutlich verbessert werden, um im Rahmen von Geburtskliniken oder Impfprogrammen Bettnetze zu verteilen, Eisen zu substituieren, eine adäquate Malariatherapie sowie Aufklärungskampagnen durchzuführen. Um die Präventionsansätze zu optimieren, ist ein besseres Verständnis der Pathogenese der Malaria-induzierten Anämien, insbesondere eine Gewichtung der unterschiedlichen Mechanismen sowohl bei asymptomatischen Parasitämien, als auch bei klinischer Malaria dringend erforderlich.

## 5. Zusammenfassung

Die Malaria stellt weiterhin eine der Hauptursachen für die Mortalität bei Kleinkindern in Afrika südlich der Sahara dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Prävalenz, Prädiktoren und Folgen einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* bei Säuglingen in einem holoendemischen Malariagebiet näher zu untersuchen. Schwerpunkt der Arbeit waren die Zusammenhänge zwischen asymptomatischen Parasitämien und milden bis moderaten Anämien im ersten halben Lebensjahr.

Die Studie fand in Ghana am Presbyterian Mission Hospital in Agogo von Januar 2000 bis Juli 2001 statt. Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten von 136 Kindern und deren Müttern ausgewertet. Die Neugeborenen wurden von Geburt an monatlich bis zu ihrer 28. Lebenswoche untersucht. An jedem regulären Termin sowie bei zusätzlichen Konsultationen in der Klinik aufgrund akuter Erkrankung erfolgte eine klinische, hämatologische und parasitologische Untersuchung. Bei der klinischen Untersuchung standen Fieber und Splenomegalie im Vordergrund. Die Hämoglobin (Hb)-Konzentration wurde photometrisch gemessen und eine Anämie als  $Hb < 10$  bzw.  $< 11$  g/dl definiert. Eine Infektion mit *P. falciparum* wurde vor Ort mittels Mikroskopie und immunchromatographischem Schnelltest diagnostiziert. Eine Malaria wurde definiert als Fieber und mikroskopisch positivem Parasitennachweis, unabhängig von der Parasitendichte. Zur Erfassung auch submikroskopischer Infektionen mit *P. falciparum* wurde am Institut für Tropenmedizin Berlin für jede Blutprobe eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Als Infektion wurde der Nachweis von Plasmodien durch die PCR definiert.

Eine Infektion mit *P. falciparum* konnte im ersten halben Lebensjahr bei 39,7 % (54/136) der Kinder mindestens einmalig diagnostiziert werden. Eine klinisch-manifeste Malaria war dagegen mit 15,4 %, von denen die Hälfte außerhalb der regulären Termine diagnostiziert wurden, deutlich seltener. Es wurde kein Fall von konnataler Malaria beobachtet. Im Beobachtungszeitraum zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Infektionen. Mit einem Lebensalter von 4 Wochen waren 1,5 % der Kinder infiziert und mit 28 Wochen 31 % der Kinder. Das mittlere Alter bei der Erstinfektion lag bei 17 Wochen. Die Plasmodien waren im Mittel über 8-12 Wochen nach der Erstinfektion nachzuweisen. Eine plazentare Malaria konnte bei 55,9 % der Schwangeren diagnostiziert werden. Die plazentare Malaria war signifikant mit einer Infektion der jeweiligen Kinder im ersten halben Lebensjahr assoziiert.

Insgesamt hatten 91,2 % der Kinder mindestens eine Anämie im ersten halben Lebensjahr. Die Anämie war signifikant mit einer gleichzeitig bestehenden Infektion mit *P. falciparum* assoziiert. Die mittlere Hämoglobindifferenz zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Kindern betrug 1,1 g/dl.

In der multivariaten Analyse mittels logistischer Regression wurden folgende Risikofaktoren für eine Anämie mit 6 Monaten ermittelt: Eisenmangel (odds ratio (OR): 4,3; 95% Konfidenzintervall: 1,5-12,2), eine aktuelle Infektion mit *P. falciparum* (OR: 3,5 (1,2-10,1)), sowie eine mikroskopisch nachweisbare plazentare Infektion der Mutter bei der Geburt (OR: 3,0 (1,0-9,1)).

Die genauen Pathomechanismen der Malaria-assoziierten Anämie wie die Hämolyse infizierter Erythrozyten, der Abbau nicht-infizierter Erythrozyten und die Dyserythropoese sind dabei unzureichend verstanden. Kontrovers diskutiert wird der Einfluss asymptomatischer Parasitämien und submikroskopischer Infektionen in der Entstehung der Malaria-assoziierten Anämie. Schwierig gestaltet sich die Abgrenzung asymptomatischer Parasitämien zur milden klinisch manifesten Malaria. Ob Fieber ein sinnvolles Kriterium zur Diagnostik einer klinisch manifesten Malaria bei Säuglingen ist, bleibt strittig. Zur Klärung der klinischen Folgen asymptomatischer Parasitämien und milder bis moderater Anämien auf die kognitive und die motorische Entwicklung bei Säuglingen und Kleinkindern sind weitere Längsschnittstudien erforderlich. Auch nicht eindeutig geklärt ist die Frage der Eisensubstitution in Malariaendemiegebieten. Sinnvoll erscheint die gezielte Eisensubstitution in Verbindung mit einer adäquaten Malariaphylaxe bzw. Malariatherapie.

## 6. Literaturverzeichnis

Achidi EA, Perlmann H, et al. A longitudinal study of seroreactivities to Plasmodium falciparum antigens in Nigerian infants during their first year of life. *Acta Trop* 1995; 59(2): 173-183.

Achidi EA, Salimonu LS, et al. Studies on Plasmodium falciparum parasitemia and development of anaemia in Nigerian infants during their first year of life. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(2): 138-143.

Akanmori BD, Afari EA, et al. A longitudinal study of Malaria infection, morbidity and antibody titres in infants of a rural community in Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 560-561.

Angus BJ, Chotivanich K, et al. In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood* 1997; 90: 2037-2040.

Anstey NM, Granger DL, et al. Nitric oxide, malaria and anaemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(2): 249-253.

Apgar V, Holaday DA, et al. Evaluation of the newborn infant; second report. *J Am Med Assoc* 1958; 168(15): 1985-1988.

Balaka B, Agbere AD, et al. Congenital malaria disease due to Plasmodium falciparum in high-infection-risk newborn. *Arch Pediatr* 2000; 7(3): 243-248.

Black RE, Morris SS, et al. Where and why are 10 million children dying every year. *Lancet* 2003; 361(9376): 2226-2234.

Bloland PB, Boriga DA, et al. Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission II. Descriptive epidemiology of malaria infection and disease among children. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(4): 641-648.

Bottius E, Guanzirolli A, et al. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90(1): 15-19.

Bouvier P, Rougemont A, et al. Seasonality and malaria in a west African village: does high parasite density predict fever incidence ? *Am J Epidemiol* 1997; 145(9): 850-857.

Brabin B. An Analysis of malaria parasite rates in infants: 40 years after MacDonald. *Trop Dis Bull* 1990; 87(10): 1-21.

Bradley-Moore AM, Greenwood BM, et al. Malaria chemoprophylaxis with chloroquine in young Nigerian children. I. Its effect on mortality, morbidity and the prevalence of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1985; 79(6): 549-562.

Browne EN, Frimpong E, et al. Malariometric update for the rainforest and savanna of Ashanti region, Ghana. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94(1): 15-22.

Buffet PA, Gamain B, et al. Plasmodium falciparum domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(22): 12743-12748.

Burchard GD, Browne EN, et al. Spleen size determined by ultrasound in patients with sickle cell trait, HbAC trait and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in a malaria hyperendemic area (Ashanti Region, Ghana). Acta Trop 2001; 80(2): 103-109.

Burk M, Schneider W. Anämien. In: Thiemes Innere Medizin – TIM 1. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999, S. 827-850.

Clark IA, Chaudhri G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. Br J Haematol 1988; 70(1): 99-103.

Casals-Pascual, Kai O, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. Blood 2006; 108(8): 2569-2577.

Clendennen TE 3rd, Long GW, et al. QBC and Giemsa-stained thick blood films: diagnostic performance of laboratory technologists. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89(2): 183-184.

Commey JO, Dekyem P, et al. Childhood deaths from anaemia in Accra, Ghana. West Afr J Med 1995; 14(2): 101-104.

Cornet M, Le Hesran JY, et al. Prevalence of and risk factors for anemia in young children in southern Cameroon. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(5): 606-611.

Cox MJ, Kum DE, et al. Dynamics of malaria parasitaemia associated with febrile illness in children from a rural area of Madang, Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88(2): 191-197.

Crawley J. Reducing the burden of anemia in infants and young children in malaria-endemic countries of Africa: from evidence to action. Am J Trop Med Hyg 2004; 71(2): 25-34.

Dallman PR, Siimes MA, et al. Iron deficiency in infancy and childhood. Am J Clin Nutrition 1980; 33: 86-118.

Delley V, Bouvier P, et al. What does a single determination of malaria parasite density mean? A longitudinal survey in Mali. Trop Med Int Health 2000; 5(6): 404-412.

Dondorp AM, Angus BJ, et al. Red blood cell deformability as a predictor of anaemia in severe falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1999; 60(5): 733-737.

Ekvall H, Premji Z, et al. Micronutrient and iron supplementation and effective antimalarial treatment synergistically improve childhood anaemia. Trop Med Int Health 2000; 5(10): 696-705.

Ekvall H, Premji Z, et al. Hemoglobin concentration in children in a malaria holoendemic area is determined by cumulated Plasmodium falciparum parasite densities. Am J Trop Med Hyg 2001; 64(1,2): 58-66.

Ekvall H. Malaria and anemia. Curr Opin Hematol 2003; 10(2): 108-114.



- el Hassan AM, Saeed AM, et al. Decreased erythropoietin response in Plasmodium falciparum malaria-associated anaemia. *Eur J Haematol* 1997; 59(5): 299-304.
- Färnert A, Rooth J, et al. A complexity of Plasmodium falciparum infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis* 1999; 179(4): 989-995.
- Finnström O. Studies on maturity in newborn infants. IX. Further observations on the use of external characteristics in estimating gestational age. *Acta Paediatr Scand* 1977; 66(5): 601-604.
- Fischer PR. Congenital malaria: an African survey. *Clin Pediatr Phila* 1997; 36(7): 411-413.
- Fleming-AF. Tropical obstetrics and gynaecology. 1. Anaemia in pregnancy in tropical Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 441-448.
- Fleming AF. The presentation, management and prevention of crisis in sickle cell disease in Africa. *Blood Rev* 1989; 3(1): 18-28.
- Franks S, Koram KA et al. Frequent and persistent asymptomatic Plasmodium falciparum infections in african infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis* 2001; 183: 796-804.
- Galan P, Davila M, et al. Iron deficiency, inflammatory processes and humoral immunity in children. *Int J Vitam Nutr Res* 1988; 58(2): 225-230.
- Ganz T. Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102(3): 783-788.
- Gilles H. Management of severe and complicated malaria: A practical handbook. World Health Organisation 1991, Geneva.
- Gillespie DA, Hardman N. Microbubbles in Replicating Nuclear Deoxyribonucleic Acid from Physarum polycephalum. *Biochem J* 1997; 183: 477-480.
- Giribaldi G, Ulliers D, et al. Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anaemia. *Haematol* 2004; 89(4):492-493.
- Gosh K, Gosh K. Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. *Parasitol Res* 2007; 101: 1463-1469.
- Grantham-McGregor S, Ani C. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr* 2001; 131: 649-668.
- Greve B, Kremsner PG, et al. Malarial anaemia in African children associated with high-oxygen-radical production. *Lancet* 2000; 355(9197): 40-41.
- Griffiths MJ, Ndungu F, et al. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. *Br J Haematol* 2001; 113(2): 486-491.

Guyatt HL, Snow RW. The epidemiology and burden of Plasmodium falciparum-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1-2): 36-44.

Haas JD, Brownlie T 4th. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a casual relationship. *J Nutr* 2001; 131(2): 676-690.

Hay SI, Guerra CA et al. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol* 2005; 31(1): 81-90.

Helleberg M, Goka BQ, et al. Bone marrow suppression and severe associated with persistent Plasmodium falciparum infection in African children with microscopically undetectable parasitaemia. *Malar J* 2005; 4:56.

Hendrickse RG, King MA. Anaemia of uncertain origin in infancy. *Br Med J* 1958; 2(5097): 662-669.

Henning L, Schellenberg D, et al. A prospective study of Plasmodium falciparum multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98(12): 687-694.

Hogh B, Marbiah NT et al. A longitudinal study of seroreactivities to Plasmodium falciparum antigens in infants and children living in a holoendemic area of Liberia. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44(2): 191-200.

Hogh B, Marbiah NT et al. Relationship between maternally derived anti-Plasmodium falciparum antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, West Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect Immun* 1995; 63(10): 4034-4038.

Hommerich L, Oertzen v. C et al. Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. *Malar J* 2007; 6:144.

Howard RJ, Uni S, et al. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Cell Biol* 1986; 103(4): 1269-1277.

Jaffar S, Leach A, et al. Season of birth is not associated with delayed childhood mortality in Upper River Division, The Gambia. *Trop Med Int Health* 2000; 5(9): 628-623.

Jarra W, Snounou G, et al. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun* 1998; 66(8): 3783-3787.

Jurado RL. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis* 1997; 25(4): 888-895.

Keller, Wiskott et al. *Lehrbuch der Kinderheilkunde*, 6. Auflage; Thieme-Verlag, 1991.

Kitua AY, Smith T, et al. Plasmodium falciparum malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health* 1996; 1(4): 475-484.

- Kitua AY, Smith TA, et al. The role of low level Plasmodium falciparum parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health* 1997; 2(4): 325-333.
- Klinkenberg E, McCall PJ, et al. Urban malaria and anemia in children: a cross-sectional survey in two cities of Ghana. *Trop Med Int Health* 2006; 11(5): 578-588.
- Koram KA, Owusu-Asyei S, et al. Severe anaemia in young children after high and low malaria transmission seasons in the Kassena-Nankana district of Northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(6): 670-674.
- Koram KA, Owusu-Asyei S, et al. Seasonal profiles of malaria infection, anaemia, and bednet use among age groups and communities in northern Ghana. *Trop Med Health* 2003; 8(9): 793-802.
- Kulmala T, Vaahtera M, et al. The importance of preterm birth for peri-and neonatal mortality in rural Malawi. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2000; 14(3): 219-226.
- Kurtzhals JA, Rodrigues O, et al. Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in Plasmodium falciparum malaria. *Br J Haematol* 1997; 97(1): 169-174.
- Lang W and Löscher T. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Stuttgart, New York, Thieme 2000.
- Larkin GL, Thuma PE. Congenital malaria in a hyperendemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45(5): 587-592.
- Lawless JW, Latham MC, et al. Iron supplementation improves appetite and growth in anemic Kenyan primary school children. *J Nutr* 1994; 124(5): 645-654.
- Le Hesran JY, Cot M, et al. Maternal placental infections with Plasmodium falciparum and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 1997; 146(10): 826-31.
- Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (2):CD000363.
- Lindsay SW, Campbell H, et al. Malaria in a peri-urban area of the Gambia. *Ann Trop Med Parasitol* 1990; 84(6): 553-562.
- Looareesuwan S, Wattanagoon Y, et al. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med* 1987; 317(11): 675-679.
- Maegraith BC, Deegan T, et al. Suppression of malaria (plasmodium berghei) by milk. *Br Med J* 1952; 2(4799): 1382-1384.
- May J, Mockenhaupt FP, et al. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(2): 339-343.
- McGregor IA, Wilson ME, et al. Malaria infection of the placenta in the Gambia, West Africa; its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77(2): 232-244.

- Menendez C, Kahigwa, et al. Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet* 1997; 350(9081): 844-850.
- Menendez C, Ordi J, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 2000; 181(5):1740-1745.
- Menendez C, Fleming AF, et al. Malaria-related Anaemia. *Parasitol Today* 2000b; 16(11): 469-476.
- Menendez C, Schellenberg D, et al. Varying efficacy of intermittent preventive treatment for malaria in infants in two similar trials: public health implications. *Malar J* 2007; 6:132.
- Missinou MA, Lell B, et al. Uncommon asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in Gabonese children. *Clin Infect Dis* 2003; 36(9): 1198-1202.
- Mockenhaupt FP, Rong B, et al. Anaemia in pregnant Ghanaian women: importance of malaria, iron deficiency, and haemoglobinopathies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(5): 477-483.
- Mockenhaupt FP, Ulmen U, et al. Diagnosis of placental malaria. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1): 306-308.
- Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, et al. *Plasmodium falciparum* multiplicity correlates with anaemia in symptomatic malaria. *Trop Med Health* 2003; 8(10): 857-859.
- Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, et al. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J* 2006; 5:119.
- Mockenhaupt FP, Reither K, et al. Intermittent treatment in infants as a means of malaria control: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial in northern Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9): 3278-3281.
- Molyneux M. *The Child Health Dialogue - Recognition of Malaria*. Wellcome Trust Centre; Blantyre 1999; Malawi.
- Moormann AM, Sullivan AD, et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis* 1999; 180(6): 1987-1993.
- Munoz M, Romero A, et al. Utility of point-care haemoglobin measurement in the HemoCue-B haemoglobin for the initial diagnosis of anaemia. *Clin Lab Haematol* 2005; 27(2): 99-104.
- Murphy SC, Breman JG. Gaps in childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1,2): 57-67.
- Mutabingwa TK, de Geus A, et al. Malaria chemosuppression during pregnancy. VI. Some epidemiological aspects of malaria in infants. *Trop Geogr Med* 1994; 64(1): 1-7.
- Mwangi TW, Ross A, et al. The effects of untreated bednets on malaria infection and morbidity on the Kenyan Coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97(4): 369-372.

- Nossal GJ. Immunologic tolerance. In: Paul WE, ed Fundamental immunology. 2<sup>nd</sup> ed. New York; NY: Raven Press 1989: 571-586.
- Oduro AR, Kwadwo AK et al. Severe falciparum malaria in young children of the Nankana district of northern Ghana. *Malar J* 2007; 6:96.
- Ohr C, Obare P, et al. Establishing a malaria diagnostic centre of excellence in Kenya. *Malar J* 2007; 6:79.
- Okoko BJ, Ota MO, et al. Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian McGregor. *J Health Popul Nutr* 2002; 20(1): 4-11.
- Omer FM, Riley EM, et al. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med* 1988; 188(1): 39-48.
- Onwujekwe O, Ojukwu J, et al. Where do people from different socio-economic groups receive diagnosis and treatment for presumptive malaria, in south-eastern Nigeria? *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99(5): 473-481.
- Oppenheimer SJ. The interaction of alpha thalassaemia with malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81(2): 322-326.
- Oppenheimer SJ. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr* 2001; 131(2S-2): 616-633; discussion 633-635. Review.
- Ordi J, Ismail MR et al. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(8): 1006-1011.
- Owusu-Agyei-S, Fryauff-D, et al. Characteristics of severe anemia and its Association with malaria in young children of the Kassana-Nankana District of Northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(4):371-377.
- Pasvol G, Weatherall DJ, et al. Fetal Hemoglobin and Malaria. *Lancet* 1976; 1: 1269-1272.
- Pasvol G, Weatherall DJ, et al. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1977; 270(5633): 171-173.
- Petersen E, Høgh B, et al. A longitudinal study of antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA and immunity to malaria infection in adults Liberians. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(3): 339-345.
- Phillips RE, Pasvol G. Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillieres Clin Haematol* 1992; 5(2): 315-330.
- Pichainarong N, Chaveepojnkamjorn W, et al. Malaria infection and life-style factors among hilltribes along the Thai-Myanmar border area, northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004; 35(4): 834-839.
- Pieroni P, Mills CD, et al. Comparison of the ParaSight-F test and the ICT Malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92(2): 166-169.

Premji Z, Hamisi Y, et al. Anaemia and Plasmodium falciparum infections among young children in an holoendemic area, Bagamoyo, Tanzania. *Acta Tropica* 1995; 59(1): 55-64.

Redd SC, Wirima JJ et al. Risk factors for anaemia in young children in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51(2): 170-174.

Reither K, Ignatius R, et al. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis* 2007; 7:104.

Ricke CH, Staalsoe T, et al. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J Immunol* 2000; 165(6): 3309-3316.

Rogerson SJ, van den Broek NR, et al. Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(3): 335-340.

Rogerson SJ, Brown HC, et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun* 2003; 71(1): 267-270.

Rogerson SJ, Mkundika P, et al. Diagnosis of Plasmodium falciparum malaria at delivery: comparison of blood film preparation methods and of blood films with histology. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1370-1374.

Rogier C, Commenges D, et al. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of Plasmodium falciparum parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(6): 613-619.

Saarinen UM. Need for iron supplementation in infants on prolonged breast feeding. *J Pediatr* 1978; 93(2): 177-180.

Saiki RK, Scharf S, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-1354.

Sazawal S, Black RE, et al. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in pre-school children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2006; 367(9505): 133-143.

Schapira A, Beales PF, et al. Malaria : living with drug resistance. *Parasitol Today* 1993; 9(5): 168-174.

Schellenberg D, Menendez C, et al. African children with malaria in an area of intense Plasmodium falciparum transmission: features on admission to the hospital and risk factors for death. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(3): 431-438.

Schellenberg D, Schellenberg JR, et al. The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a community-based study. *Bull World Health Organ* 2003; 81(8): 581-590.

Schwarzer E, Ludwig P, et al. 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes. *Parasitol* 1999; 41(1-3): 199-202.

Sharp PA, Sugden B, et al. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973; 12(16): 3055-3063.

Shear HL, Grinberg L, et al. Transgenic Mice Expressing Human Fetal Globin Are Protected From Malaria by a Novel Mechanism. *Blood* 1998; 92(7): 2520-2526.

Skorokhod OA, Schwarzer E, et al. Malarial pigment haemozin, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-I beta and LPS do not stimulate expression of inducible nitric oxid synthase and production of nitric oxide in immuno-purified human monocytes. *Malar J* 2007; 6:73.

Smith T, Beck HP, et al. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(1): 15-20.

Smith T, Felger I, et al. Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(1): 35-39.

Smith T, Felger I, et al. Premunition in *Plasmodium falciparum* infections insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(1): 59-64.

Snounou-G, Viriyakosol-S, et al. High sensitivity of human malaria parasites by use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 315-320.

Snow RW, Craig M, et al. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ*; 77(8): 624-640.

Steketee RW, Nahlen BL et al. (2001). The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 64 (1,2): 28-35.

Stoltzfus RJ, Chwaya HM, et al. Epidemiology of iron deficiency anaemia in Zanzibari schoolchildren: the importance of hookworms. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(1): 153-159.

Stoltzfus RJ, Chwaya HM et al. Malaria, hookworms and recent fever are related to anaemia and iron status indicators in 0- to 5-y old Zanzibari children and these relationships change with age. *J Nutr* 2000; 129(9): 1723-1733.

Suguitan AL Jr, Cadigan TJ, et al. Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term delivery in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69(6): 574-581.

Sullivan AD, Nyirenda T, et al. Malaria Infection during Pregnancy: Intrauterine Growth and Retardation and Preterm Delivery in Malawi. *J Infect Dis* 1999; 179:1580-1583.

Trape JF, Zoulani A, et al. Assessment of the incidence and prevalence of clinical malaria in children exposed to intense and perennial transmission. *Am J Epidemiol* 1987; 126(2): 193-201.

Trape JF, Rogier C, et al. The Dielmo Project: A longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51(2):123-137.

Tsuji M, Zavala F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends in Parasitology* 2003; 19(2): 88-93.

Viraraghavan R, Jantusch B, et al. Congenital malaria: diagnosis and therapy. *Clin Pediatr (Phila)* 2000; 39(1): 66-67.

Wagner-G, Koram-K, et al. High incidence of asymptomatic malaria infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(1): 115-123.

Wasunna A, Whitelaw A, et al. C-reactive protein and bacterial infection in preterm infants. *Eur J Pediatr* 1990; 149(6): 424-427.

WHO. Expert Committee on Malaria. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 892: i-v, 1-74.

WHO. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(1): 1-74.

WHO. Roll Back Malaria, Unicef. *World Malaria Report 2005*. Annex 1: 129-133.

WHO. *Child Growth Standards*. Departement of Nutrition for Health and Development 2006.



## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>ml</b>	Milliliter
<b>AK</b>	Antikörper	<b>mM</b>	millimolar
<b><math>\alpha</math></b>	alpha	<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>bp</b>	Basenpaare	<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b><math>\mu</math>M</b>	micromolar
<b>ca.</b>	circa	<b>n</b>	Fallzahl
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein	<b>ng</b>	Nanogramm
<b>CSA</b>	Chondroitinsulfat A	<b>nm</b>	Nanometer
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>nM</b>	nanomolar
<b>dATP</b>	Deoxyadenosintriphosphat	<b>P.</b>	Plasmodien
<b>dCTP</b>	Deoxycytosintriphosphat	<b>PABA</b>	Paraaminobenzoessäure
<b>dGTP</b>	Deoxyguanintriphosphat	<b>PFHPR-2</b>	P. falciparum-histidinerich-membrane-proteine-2
<b>dNTP</b>	Deoxyribonukleotide	<b>PBS</b>	phosphate buffer saline
<b>dTTP</b>	Deoxythymidintriphosphat	<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>EPO</b>	Erythroetin	<b>RR</b>	Blutdruck
<b>EZ</b>	Erythrozytenzahl	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>g/dl</b>	Gramm je Deziliter	<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>Hb</b>	Hämoglobin	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor beta
<b>HbF</b>	fetales Hämoglobin	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>HkT</b>	Hämatokrit	<b>Tris</b>	2-Amino-2 (hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
<b>IgG</b>	Immunglobulin G	<b>U/l</b>	unit/liter
<b>IUGR</b>	intrauterine Wachstumsretardierung	<b>u./o.</b>	und/oder
<b>IL</b>	Interleukin	<b>UpM</b>	Umdrehung pro Minute
<b>LBW</b>	Low Birth Weight	<b>vol/vol</b>	Volumen pro Volumen
<b>LZ</b>	Leukozytenzahl	<b>vs.</b>	versus
<b>M</b>	molar	<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>MCV</b>	mean corpuscular volume		
<b>MCHC</b>	mean corpuscular hemoglobine		
<b>mg</b>	Milligramm		

## **7.2 Lebenslauf:**

“Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

### 7.3 Erklärung

„Ich, Iris Christine Hannibal, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Prävalenz, Prädiktoren und Folgen einer Infektion mit Plasmodium falciparum bei Säuglingen in einem holoendemischen Malariagebiet in Ghana“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Ich danke meiner Mutter, die mir mein Studium und die Erstellung der vorliegenden Arbeit ermöglicht hat.

Dem ehemaligen und verstorbenen Institutsleiter Herrn Prof. Dr. U. Bienzle sei für seine wissenschaftliche Hilfe und Unterstützung gedankt.

Herrn PD Dr. F. P. Mockenhaupt danke ich für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung und konstruktive Kritik. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die Überlassung der nicht selbstständig gewonnenen Daten.

Für die freundliche Aufnahme am „Presbyterian Mission Hospital Agogo“ danke ich Herrn Dr. Thompson, der Pädiaterin Frau Christiane von Gaertner, der Kinderkrankenschwester Grace, den Fieldworkern Mr. Lartey, Mr. Kcey und Joyce und dem medizinisch-technischen Assistenten Patrick.

Nicht zuletzt danke ich Sebastian für seine unendliche Geduld sowie emotionale Unterstützung. Meinen Kindern Mia und Linus danke ich für den täglichen Sonnenschein in meinem Leben.