

## 4. Diskussion

Im Folgenden werden Methodik und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert. Nach einer kritischen Bewertung der verwendeten Methoden folgt die Einordnung der Ergebnisse zur Epidemiologie der Malaria. Weiterhin wird der Einfluss der genetischen und sozioökonomischen Faktoren auf die Basisparameter Infektion, Parasitendichte, klinisch-manifeste Malaria und Malaria-Anämie diskutiert.

### 4.1. Kritische Bewertung der verwendeten Methodik

#### 4.1.1. Aufbau der Studie

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Befunde wurden im Rahmen einer einjährigen Längsschnittstudie erhoben. Ein solches Studiendesign ermöglicht in erster Linie eine Aussage zur Inzidenz eines oder mehrerer Faktoren. Die Längsschnittstudie erlaubt die Beobachtung einer definierten Studiengruppe über einen längeren Zeitraum mit altersabhängiger Veränderung der untersuchten Parameter und deren Einflussfaktoren. Mit ihrer Hilfe können kausale Zusammenhänge besser nachgewiesen werden als im Rahmen einer Querschnittstudie, bei der die Probanden nur einmal untersucht werden. Auf Grund des logistischen und zeitlichen Aufwands kann jedoch nur eine relativ kleine Probandenzahl verfolgt werden. Außerdem muss die definierte Population eine gewisse Stabilität aufweisen, so dass wenige Ab- und Zugänge (z.B. durch Umzug) zu verzeichnen sind. Diese Voraussetzungen waren in unserer Studie gegeben.

Da der *P. falciparum*-Nachweis mit Hilfe der PCR im Vergleich zur Mikroskopie die sensitivere Methode darstellt (Abb. 1), wurde eine Plasmodien-Infektion mit einem positiven PCR-Ergebnis gleichgesetzt. Trotz des insgesamt seltenen Auftretens von Fieber bestand eine hochsignifikante Assoziation zwischen einer Plasmodien-Infektion und Fieber ( $p < 0.0001$ ; GEE). Wie schon Gilles (1991) definierten wir die klinisch-manifeste Malaria als mikroskopisch-nachgewiesener Parasit und Fieber.

Die sozioökonomischen Daten wurden objektiv und standardisiert im Rahmen des Besuchs der Familien durch die Verfasserin dieser Arbeit und geschulte Studienhelfer erhoben.

Da im Verlauf des ersten Lebensjahres keine sichere Aussage über das Ende eines alten und den Beginn eines neuen Ereignisses gemacht werden konnte, wurde zur Darstellung der Häufigkeiten der Basisparameter die *area under the curve* gewählt.

### 4.1.2. Nachweis der *P. falciparum*-Infektion durch die PCR und Mikroskopie

Der sichere Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* und die Bestimmung der Parasitendichte stellten die Grundlage der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse dar. Der sensitivste Nachweis einer *Plasmodium falciparum*-Infektion erfolgte durch die PCR. So konnten auch geringste, nicht mehr mikroskopisch erfassbare Parasitendichten im Blut festgestellt werden. Der mikroskopische Plasmodien-Nachweis war zur Diagnose einer klinisch-manifesten Malaria von Bedeutung. Die Parasiten wurden auf 500 Leukozyten ausgezählt und anschließend auf ihre Anzahl in einem Mikroliter Blut hochgerechnet. Dieses Verfahren gewährleistete, ganz im Gegensatz zu der in vielen anderen Studien verwendeten Auszählung auf nur 200 Leukozyten, die Erfassung auch geringerer Parasitendichten von bis zu 10 Parasiten/ $\mu$ l Blut (Clendenennen *et al.*, 1995). Die eingeschränkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Studien wiegt dagegen nur gering.

Da die Parasitendichten submikroskopischer Infektionen durch den fehlenden mikroskopischen Nachweis nicht ausgezählt werden konnten, wurden sie mit einer Anzahl von 5 Plasmodien/ $\mu$ l Blut gleichgesetzt.

### 4.1.3. Hämatologische Parameter

Die Messung des Hämoglobingehaltes der Probanden erfolgte mit Hilfe des Hemocue® Photometers. Eine Anämie wurde als eine Unterschreitung altersabhängiger Grenzwerte des Hb (Nathan und Oski, 1992) definiert. Die dazu herangezogenen Referenzwerte entstammen europäischen Populationen. Die Durchschnittswerte hämatologischer Parameter von Menschen unterschiedlicher ethnischer Herkunft weichen auch nach Ausschluss von Eisenmangel und Hämoglobinopathien zum Teil erheblich voneinander ab (Dallman *et al.*, 1978; Oski, 1992; Tillyer *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1996). So liegen zum Beispiel die Hämoglobinwerte von Afroamerikanern ca. 0.5 g/dl unter denen europäischer Vergleichsgruppen (Dallman *et al.*, 1978). Da keine definierten Werte für afrikanische Vergleichsgruppen vorliegen, ist letztendlich nur der Vergleich mit hämatologischen Werten von Europäern möglich. Somit kann eine Abweichung des mittleren Hb bei Afrikanern nicht zwangsläufig mit einer manifesten Erkrankung gleichgesetzt werden.

### **4.1.4. Bestimmung der Promoterpolymorphismen von Interleukin 10 -1082G/A und Tumornekrosefaktor alpha -308G/A mittels PCR**

Die Genfrequenzen der Promoterpolymorphismen IL-10 -1082G/A und TNF- $\alpha$  -308G/A wurden mit Hilfe der PCR ermittelt. Diese zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse aus. Bei allen 140 Kindern konnten die Promotertypen festgestellt werden. Zur Bestimmung der IL-10 -1082G/A-Promotertypen wurde die Versuchsanordnung von Bezrafshani *et al.* (2000) verwendet. Das Verfahren von Wilson *et al.* (1992) diente als Vorlage zum Nachweis der TNF- $\alpha$  -308G/A-Promotertypen. Durch die verwendeten Verfahren kann der Wildtyp (GG) von heterozygoten (GA) und homozygoten (AA) Promotertypen unterschieden werden. Die Methode von Bezrafshani *et al.* (2000) stellt ein relativ neues Nachweisverfahren des IL-10 -1082G/A-Promoterpolymorphismus dar, das schnell durchführbar und zuverlässig ist ohne die Notwendigkeit einer oligonukleotiden Prüfung.

### **4.1.5. Ermittlung sozioökonomischer Einflussfaktoren**

Die Familien der 140 Studienkinder wurden zu Hause besucht. Dabei konnte man den Wohnort, die Sauberkeit in Haus und Hof, das Vorhandensein offener Wasserstellen in unmittelbarer Nähe des Wohnhauses und die Anwendung und Art eines Moskitoschutzes feststellen. Der Besuch war zudem wichtig, um den Familien die Bedeutung der regelmäßigen Teilnahme an der Studie nahe zu bringen und den Studienhelfern vor Ort einen objektiven Eindruck von der Wohnsituation und den sozialen Verhältnissen der Familie zu verschaffen. Teilweise gestaltete sich die Abgrenzung benachbarter Kategorien bestimmter Einflussfaktoren, z.B. Unterscheidung eines mittelmäßig sauberen von einem schmutzigen Zustand des Hauses, als schwierig. Dennoch konnte in den meisten Berechnungen ein signifikanter Trend dieses Einflusses auf die Basisparameter festgestellt werden.

Des Weiteren wurden die Eltern zur eigenen Schulbildung und dem Lesevermögen in der regionsüblichen Sprache (Twi) befragt. Diese erfragten Faktoren waren einer relativen Unsicherheit unterlegen: die Eltern wurden deshalb einer Schrift- und Leseprobe unterzogen. Leider waren Väter bei der Befragung nicht immer anwesend, so dass Auskünfte über deren Bildungsstand teilweise über die Mütter eingeholt werden mussten. Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass der wichtigere Marker für die Bildung der Eltern nicht die Stufe der Schulbildung, sondern das Lesevermögen war. So bestand kein signifikanter Unterschied des Einflusses der benachbarten Kategorien „keine Bildung“ und „primary school“ auf die verschiedenen Basisparameter. Eine Ursache eben dieses Sachverhaltes könnte die Tatsache sein, dass Eltern trotz des Besuches einer Grundschule meist nicht lesen und schreiben konnten.

Die Eltern schätzten außerdem grob die durchschnittliche Anzahl an Moskitos im Haus, ohne dass dieses Ergebnis jedoch messtechnisch verifiziert wurde. Natürlich war dieser Wert vom subjektiven Empfinden der Familien abhängig. Trotzdem konnte häufig ein signifikanter oder tendenzieller Einfluss der geschätzten Moskitozahl auf die Basisparameter festgestellt werden.

### 4.2. Diskussion der Ergebnisse

Der Schwerpunkt dieser Studie bestand darin, den Einfluss genetischer und sozioökonomischer Faktoren auf Wahrscheinlichkeit, Zeitpunkt des ersten Auftretens und Häufigkeit von *P. falciparum*-Infektionen, klinischer Malaria, Malaria-Anämie und auf die Höhe der Parasitendichte im ersten Lebensjahr zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Dabei zeigte sich, dass sozioökonomische Faktoren nicht nur den größeren Einfluss auf das Auftreten einer *P. falciparum*-Infektion, sondern auch auf das aller anderen Basisparameter innehatten. Im Vergleich dazu spielte der Einfluss der beiden Promoterpolymorphismen nur eine untergeordnete Rolle: So wiesen Kinder mit homozygotem Merkmal des IL-10 -1082G/A-Promoterpolymorphismus nur in der univariaten Analyse signifikant weniger Episoden in den Kategorien „klinisch-manifeste Malaria“ (Tab. 3.10) und „schwere Malaria-Anämie“ auf (Tab. 3.13). Bei Kindern mit mutiertem Allel des TNF- $\alpha$  -308G/A-Promoterpolymorphismus bestand eine signifikante Reduktion des mittleren Hb nur dann, wenn man die Daten unabhängig vom Infektionsstatus der Kinder betrachtete.

*Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:*

- Im Holoendemiegebiet von Agogo beeinflussten sozioökonomische Faktoren, jedoch nicht die untersuchten Promoterpolymorphismen, signifikant das Auftreten einer *P. falciparum*-Infektion und die Höhe der Parasitendichte von Kindern im ersten Lebensjahr.
- Probanden der homozygoten Gruppe des IL-10 -1082G/A-Promoterpolymorphismus wiesen nur in der univariaten Analyse signifikant weniger Episoden klinischer Malaria und schwere Malaria-Anämie im ersten Lebensjahr auf. Der sozioökonomische Einfluss in diesen beiden Kategorien war demgegenüber viel bedeutender.
- Das TNF- $\alpha$  -308A-Allel war nur unabhängig vom Infektionsstatus der Kinder mit einer signifikanten Reduktion des mittleren Hb assoziiert.

Im Gegensatz zu verschiedenen sozioökonomischen Faktoren besitzen somit die untersuchten Promoterpolymorphismen des IL-10 und TNF- $\alpha$  keine wesentliche Bedeutung für die Malaria im ersten Lebensjahr.

#### 4.2.1. *P. falciparum*-Infektion, Parasitendichte und klinisch-manifeste Malaria

Obwohl mehr als 66 % der 140 Studienkinder zu einem bestimmten Zeitpunkt im ersten Lebensjahr eine *P. falciparum*-Infektion aufwiesen, trat Selbige nur bei 24 % aller Besuche auf (Tab. 3.2). Somit machten viele Kinder nur relativ wenige *P. falciparum*-Attacken pro Jahr, nämlich durchschnittlich 3,2, durch. Auch Henning *et al.* (2004) stellten eine Infektions-Prävalenz von ca. 25 % am Ende des ersten Lebensjahres fest. In Tansania liegt jedoch eine geringere Endemizität als in Ghana vor. Nur 15,3 % (314/2054) der Mikroskopie-Ergebnisse waren positiv. In anderen Studien lag dieser Anteil bei über 50 % (Trape *et al.*, 1994; Kitua *et al.*, 1996; Bloland *et al.*, 1999). Neugeborene waren nie infiziert. Die Punktprävalenzen der mittels PCR und Mikroskopie erhobenen Infektion stiegen bis zur 28. Lebenswoche an und fielen bis zur Vollendung des ersten Lebensjahres langsam wieder ab (Abb. 1). Im 6. Lebensmonat wurden Maximalwerte beider Parameter erreicht. Ähnliche Verläufe der Punktprävalenzen wurden auch in Liberia mit jedoch durchschnittlich höheren Prävalenzen der positiven Mikroskopie-Ergebnisse (6. Monat: 45 % vs. 25 % in unserer Studie), ermittelt (Hogh *et al.*, 1995). Auch in Tansania wurden höhere Prävalenzen mit jedoch gleichbleibend hohen Werten bis zum Ende des ersten Lebensjahres verzeichnet (Kitua *et al.*, 1996).

Insgesamt ist also festzuhalten, dass der zeitliche Verlauf der Punktprävalenzen im ersten Lebensjahr dem anderer Studien ähnelt, jedoch viel weniger mittels PCR oder Mikroskopie ermittelte Infektionen zu verzeichnen waren. Als Ursache für diesen relativ seltenen *P. falciparum*-Nachweis in einem holoendemischen Gebiet wie Ghana, welches höhere Prävalenzen erwarten lassen würde, kommen mehrere Faktoren in Betracht: Der mangelnde Regenfall dieses Jahres und die damit verbundene geringere Vermehrung der Moskitos könnten eine Ursache seltener Infektionen sein. Außerdem wohnten über 82 % der Kinder im Stadtzentrum oder der Peripherie, so dass der zu häufigeren Infektionen und höheren Parasitendichten führende Faktor „Leben im Regenwald“ in Bezug auf die Gesamtheit der Studienpopulation kaum zur Geltung kam. Weiterhin wurden Eltern im Rahmen der Studie über Transmissionswege, die richtige Anwendung eines Moskitoschutzes und das Verhalten bei Malaria aufgeklärt. Dieser Umstand könnte zum Rückgang der Infektionshäufigkeit im Verlauf des ersten Lebensjahrs, wie auch schon in anderen Studien beobachtet (Nkuo Akenji *et al.*, 2005), beigetragen haben.

Die Parasitendichten/ $\mu$ l Blut stiegen diskontinuierlich bis zum Ende des ersten Lebensjahres an mit einem ersten Spitzenwert in der 28. und einem zweiten in der 52. Lebenswoche. Auch diese Ergebnisse ähneln denen anderer Studien (Hogh *et al.*, 1995; Kitua *et al.* 1996; Bloland *et al.*, 1999; Henning *et al.*, 2004). Erst im späteren Kindesalter fallen die durchschnittlichen Dichten

#### 4. DISKUSSION

bis zum Erwachsenenalter ab (Petersen *et al.*, 1991; Bloland *et al.*, 1999). Trotzdem lagen die durchschnittlichen Parasitendichten je Lebensmonat unter denen anderer Studien. Ursächlich hierfür könnte die Tatsache sein, dass Kinder mit hohen Parasitendichten im Rahmen der Studie medikamentös behandelt wurden, jedoch solche mit geringeren Parasitendichten ohne klinische Symptome unbehandelt blieben (Tab. 2.1). Auch in Agogo und Umgebung ist der häusliche Gebrauch von Chloroquin und Paracetamol bei Verdacht auf eine *Plasmodien*-Infektion oder andere fieberhafte Erkrankungen durchaus üblich. So berichteten 66 % der erwachsenen Studienteilnehmer einer Studie in der Ashanti-Region von Selbstmedikation vor Aufsuchen eines Arztes, über 85 % von ihnen verwandten regelmäßig oder gelegentlich Chloroquin. Messbare Chloroquinspiegel wurden bei fast 30 % der Studienteilnehmer nachgewiesen (Marks *et al.*, 2005). Die geringen Dosen an Chloroquin führen im Allgemeinen zu einer Reduktion der Parasitendichte, jedoch nicht zur völligen Eradikation der Parasiten. Dieses Verhalten kann, außer zu einer ungenügenden Ausreifung des kindlichen Immunsystems und der Bildung von Resistenzen gegen Chloroquin, auch die Studiendaten manipulieren und geringere Parasitendichten und submikroskopische Infektionen erzeugen. In einer Studie in Nigeria wurde sogar bei 81 % der Kinder ein häuslicher Gebrauch einer Mixtur aus Antipyretika, Antibiotika und Malariamedikamenten festgestellt, bevor sie die Klinik erreichten und untersucht werden konnten (Olaogun *et al.*, 2005).

Eine klinisch-manifeste Malaria war auf Grund des häufigen Fehlens von Fieber nur selten diagnostizierbar. Obwohl rund 43 % der Kinder (60/140) mindestens eine Episode aufwiesen, trat bei insgesamt nur 5 % (98/2054) aller Besuche mit einem Mikroskopie-Ergebnis eine klinische Malaria auf. Im zeitlichen Verlauf manifestierten sich erste Ereignisse im dritten Lebensmonat, mit Maximalwerten in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien beobachtet (Brabin, 1990; Snow *et al.*, 1998; Mackinnon *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2004). Das seltene Auftreten von Fieber könnte durch die häusliche Gabe von antipyretisch wirkenden Medikamenten wie Paracetamol und Chloroquin verursacht worden sein.

Bei mehr als 7 % der Besuche mit einem negativen Mikroskopie-Ergebnis konnte mit Hilfe der PCR dennoch eine *P. falciparum*-Infektion nachgewiesen werden (Abb. 3). Ursache dafür ist nach vorherrschender Lehrmeinung eine unter der Nachweisgrenze der Lichtmikroskopie liegende Parasitämie (Bottius *et al.*, 1996). Es ist jedoch denkbar, dass parasitäre DNA auch nach Ablauf einer Infektion zu einem positiven PCR-Ergebnis führen könnte, so wie sich Antigene von *P. falciparum* noch Tage nach einer erfolgreichen Therapie nachweisen lassen (Humar *et al.*, 1997). Jedoch sprechen verschiedene Hinweise gegen diese Annahme und für das

tatsächliche Auftreten einer Infektion unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze. So war eine submikroskopische Infektion signifikant mit einer Reduktion des mittleren Hämoglobingehaltes verbunden (Tab. 3.4). Zwar könnte dieser Hb-Abfall auch Folge einer abgelaufenen Infektion sein. Da er jedoch nicht so ausgeprägt war wie bei Probanden mit höheren Parasitendichten, ist das Bestehen einer aktuellen Infektion wahrscheinlicher. Außerdem wurde in der Studie von Jarra & Snounou (1998) am Mausmodell ein nur kleines Zeitfenster (48 h) für den Nachweis von parasitärer DNA ohne aktuelle Infektion bestimmt.

#### **4.2.2. Anämie und *P. falciparum*-Infektion**

Der mittlere Hämoglobingehalt fiel nach der Geburt bis zur 8. Lebenswoche hin deutlich ab und verblieb bis zum Ende des ersten Lebensjahres auf annähernd gleichbleibendem niedrigen Niveau. Es war kein Anstieg nach der physiologischen Hb-Reduktion im zweiten bis dritten Lebensmonat festzustellen (Abb. 5). Im gleichen Maße stiegen die Punktprävalenzen der Anämie auf fast 90 % in der 16. Lebenswoche an und verblieben auf ähnlicher Höhe (Abb. 5). Diese Ergebnisse ähneln denen anderer Studien in Gebieten mit ganzjähriger Malariaübertragung (Kitua *et al.*, 1997; Bloland *et al.*, 1999; le Cessie *et al.*, 2002; van Eijk *et al.*, 2002; Schellenberg *et al.*, 2003; Crawley *et al.*, 2004) und lassen auf eine Plasmodien-Infektion als wahrscheinlichste Ursache schließen. Schwere Anämien traten kaum auf und erreichten Maximalwerte der Prävalenz in der 28. Lebenswoche, in der auch die meisten Infektionen vorlagen.

Alle 140 Studienkinder wiesen im ersten Lebensjahr mindestens eine anämische Episode auf. Die Genese der Anämie in Malariagebieten ist oft multifaktoriell bedingt. Zu den pränatalen Risikofaktoren gehören die plazentare Malaria, Unterernährung, Wurmbefall oder eine HIV-Infektion der Mutter. Unter den postnatalen Faktoren sind vor allem *P. falciparum*-Infektionen, aber auch Mangelernährung (v.a. Eisen- und Folatmangel), Hakenwurmbefall, Billharziose, HIV und hereditäre Hämoglobinopathien des Kindes zu nennen (Übersicht in Phillips & Pasvol, 1992; Crawley *et al.*, 2004).

Eine *P. falciparum*-Infektion führte zu einer signifikanten Reduktion des mittleren Hb von der 12. Lebenswoche an in allen nachfolgenden Monaten (Abb. 7). Diese Reduktion war umso ausgeprägter, je höher die Parasitendichten waren (Tab. 3.3 und 3.4). Erstaunlicherweise wurde der größte Anteil dieser Hb-Senkung durch submikroskopische Infektionen hervorgerufen. Im Vergleich dazu führten höhere Parasitämien zu weniger ausgeprägten Hb-Veränderungen.

Die durch eine niedrige Parasitämie gekennzeichnete *P. falciparum*-Infektion ist als eine wesentliche Ursache von Anämien bei afrikanischen Kindern beschrieben worden (Kitua *et al.*,

#### 4. DISKUSSION

1997). Die Hauptmechanismen, die zur Malaria-assoziierten Anämie führen sind neben der Hämolyse infizierter Erythrozyten (Abdalla *et al.*, 1980; Warrell *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 1992), der Abbau nicht-infizierter Zellen (Knüttgen, 1961; Looareesuwan *et al.*, 1987) und die Dyserythropoese (Abdalla *et al.*, 1980). Die Rolle der Autoimmunhämolyse ist noch umstritten (Abdalla & Weatherall, 1982; Phillips *et al.*, 1992) und das Ausmaß der Beteiligung der einzelnen Mechanismen an der Entstehung der Malaria-Anämie unklar. Unsere Beobachtung, dass schon submikroskopische Infektionen (2.5-5 Parasiten/ $\mu$ l Blut) zu einer erheblichen Hb-Reduktion führen, spricht dafür, dass neben der direkten Zerstörung infizierter Erythrozyten bei Parasitendichten  $< 1000/\mu$ l Blut (Kitua *et al.*, 1997) auch andere Mechanismen der Anämiegenese eine wichtige Rolle spielen müssen.

Eine moderate *P. falciparum*-Anämie trat bei unseren Probanden sehr häufig auf. Inwiefern diese jedoch Krankheitswert besitzt, bzw. durch ethnische Unterschiede hämatologischer Parameter zu erklären ist (Dallman *et al.*, 1978), bleibt unklar. In Gebieten hoher Malariaübertragung zählt die schwere Anämie zu den häufigsten Ursachen kindlicher Mortalität (Snow *et al.*, 1994; Brabin *et al.*, 2001). In unserer Studie trat eine schwere Anämie jedoch nur selten auf und ein mit ihr in Zusammenhang zu bringender Kindstod konnte nicht nachgewiesen werden.

##### **4.2.3. Einfluss sozioökonomischer Faktoren auf die Basisparameter**

Die sozioökonomischen Faktoren unserer Studie beeinflussten in erster Linie das Auftreten einer *P. falciparum*-Infektion aber auch die Manifestation der Malaria. Dieser Einfluss auf alle Basisparameter ist wahrscheinlich in erster Linie durch die Modulation der Infektionshäufigkeit erklärlich. Je öfter Kinder infiziert werden, desto größer ist natürlich auch die Wahrscheinlichkeit, sekundär eine klinische Malaria oder Malaria-Anämie auszubilden und höhere Parasitendichten zu entwickeln. Allerdings können auch Faktoren, wie z.B. die Bildung der Eltern oder die Lokalisation des Wohnortes die Schwere der Erkrankung beeinflussen.

Ein Einfluss des sozioökonomischen Status auf die Infektions-Prävalenz (Sambia National Malaria Control Program, unveröffentlichte Daten) und die Schwere der Erkrankung in Form erhöhter Kindersterblichkeit bei akutem Fieber (Mwangi *et al.*, nicht publizierte Daten; Barat *et al.*, 2004) konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden, wohingegen nur eine geringe (Filmer *et al.*, 2002) oder gar keine Assoziation zur Fieber-Inzidenz bei Malaria (Schellenberg *et al.*, 2003) bestand. In anderen Studien wurden als Ursache schwerer Manifestationen bei niedrigem sozialen Status ein erschwerten Zugang zu präventiven Maßnahmen und einer wirkungsvollen Therapie durch begrenzte finanzielle Mittel, als auch eine geringere Bildung und eine oft größere Entfernung vom Behandlungsort angesehen (Barat *et al.*, 2004).

#### 4. DISKUSSION

Die zentrale Rolle unter den sozioökonomischen Faktoren nahm in unserer Studie der Wohnort der Familie ein. So infizierten sich im Regenwald lebende Kinder signifikant wahrscheinlicher (Tab. 3.6), früher (Abb. 10) und häufiger (Tab. 3.7, Abb. 14) als Kinder, die im Stadtzentrum oder der Stadtperipherie wohnten. Weiterhin war das Leben im Regenwald mit höheren Parasitendichten (Tab. 3.8), früheren und häufigeren Malaria-Attacken (Tab. 3.9, 3.10; Abb. 17, 20) und Malaria-Anämie-Attacken (Tab. 3.11, 3.12, 3.13; Abb. 21, 23, 28, 29) verbunden. Auch andere Studien stellten eine Assoziation des Wohnens im Regenwald oder ländlicheren Gebieten mit häufigeren Plasmodien-Infektionen (Pichainarong *et al.*, 2004; Mackinnon *et al.*, 2000) und Malariaerkrankungen (Abdulla *et al.*, 2001) her. Eine zunehmende Urbanisierung war mit einer geringeren Malariaübertragung verbunden (Carne *et al.*; 1993).

Fraglich ist wodurch häufigere Infektionen oder Manifestationen bei im Regenwald lebenden Kindern verursacht werden. So könnte die höhere Moskitodichte im feuchten Regenwald zu häufigeren Stichen und somit *P. falciparum*-Infektionen führen. Außerdem müssen Mütter, die im Regenwald wohnen, einen längeren Anfahrtsweg zum Krankenhaus in Kauf nehmen, so dass infizierte Kinder oft erst zur Behandlung gebracht werden, wenn schon höhere Parasitendichten und klinische Symptome, wie Fieber und Anämie, aufgetreten sind. Auch Abdulla *et al.* (2005) stellten fest, dass die Entfernung von der Krankenhausapotheke positiv mit der Prävalenz der Parasitämie und Anämie korrelierte. Weiterhin könnte man vermuten, dass Familien, die im Regenwald wohnen weniger gebildet seien (McCombie *et al.* 2002) oder weniger Schutzmaßnahmen ergriffen. So korrelierte z.B. in Tansania die Entfernung vom Krankenhaus negativ mit der Anwendung behandelter Moskitonetze (Abdulla *et al.*, 2005). In unserer Studie jedoch waren Mütter im Regenwald lebender Kinder weder ungebildeter noch weniger am Schutz ihrer Kinder interessiert. Ganz im Gegenteil wandten sie häufiger einen Moskitoschutz unterschiedlichster Art an (84 % Regenwald vs. 60 % Stadtzentrum,  $p = 0.06$ ) und schützten ihre Kinder signifikant häufiger durch Bettnetze (28 % Regenwald vs. 3 % Stadtzentrum) und Fenster- und Türnetze (32 % vs. 28 %;  $p = 0.002$ ) als Mütter der anderen beiden Wohnorte. So ist die größere Moskitodichte wahrscheinlich als Hauptursache für häufigere Infektionen und Malaria-Episoden im Regenwald anzusehen, die diese Familien zu einem vermehrten Moskitoschutz zwingt. Trotz häufigerer Mosquito-Bettnetz-Anwendung reicht eine Bestückung von nur 30 % der im Regenwald befindlichen Haushalte bei Weitem nicht aus, um Kinder wirkungsvoll gegen Malaria zu schützen. So wäre eine Verteilung von imprägnierten Moskitonetzen vor allem im Regenwald von großer Bedeutung. Weiterhin wurde in anderen Studien das Wohnen im Regenwald als ein Teilfaktor zur Definition von Armut herangezogen (Barat *et al.*, 2004). Es ist deshalb anzunehmen, dass im Regenwald lebende Familien oft nicht

#### 4. DISKUSSION

die finanziellen Mittel besitzen, sich wirkungsvoll gegen Moskitos zu schützen. Demgegenüber benötigen die oft reicheren Familien im Stadtzentrum auf Grund des geringeren Vorkommens an Moskitos seltener Mosquito-Bettnetze.

Der Moskitoschutz, der in einer Anwendung von Bett-, Tür- und Fensternetzen, Moskitosprays/-spiralen oder dem Verbrennen organischer Materialien bestand, verringerte in unserer Studie signifikant die Wahrscheinlichkeit (Tab. 3.6.) und verzögerte den Zeitpunkt des ersten Auftretens einer *P. falciparum*-Infektion (Abb. 11). Auch die Parasitendichte (Tab. 3.8), die klinische Malaria (Kap. 3.5.3) und Malaria-Anämie (Abb. 22) korrelierten, wenn auch nicht in so starkem Maße und meist nur in der multivariaten Analyse, negativ mit der Anwendung protektiver Maßnahmen. Dem Moskitoschutz kam in dieser Studie eine wichtige, aber nicht die Hauptrolle unter den sozioökonomischen Faktoren zu. Dies könnte u.a. durch das Subsummieren besser und schlechter protektiv wirkender Maßnahmen in der Rubrik „Anwendung eines Moskitoschutzes“ verursacht worden sein.

In der Studienpopulation wurden vor allem nicht-imprägnierte Netze (20 % Bettnetze, 42 % Tür- und Fensternetze) angewandt. 22 % der Familien schützten ihre Kinder ausschließlich durch Sprays oder andere unzureichende Maßnahmen. 27 % der Kinder waren völlig ungeschützt. So kann also im Allgemeinen von einem ungenügenden Moskitoschutz der Studienpopulation ausgegangen werden.

Unbehandelte Bettnetze allein stellten in unserer Studie keinen signifikanten Schutz vor einer Infektion oder Manifestation der Erkrankung dar. Die Wirkung unbehandelter Bettnetze wird in der gängigen Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Studien keinen schützenden Einfluss auf die milde klinische Malaria (Genton *et al.*, 1994; Snow *et al.*, 1998), schwere Malaria (Nacher *et al.*, 2001) oder schwere Anämie (Abdulla *et al.*, 2005) nachwiesen, ermittelten andere Studien einen gewissen Einfluss auf die Infektion und Manifestation der Erkrankung (Guyatt & Snow, 2002; Mwangi *et al.*, 2003). Allerdings ist ein Schutz durch unbehandelte Bettnetze nur dann gewährleistet, wenn sie sich in gutem Zustand befinden (Mwangi *et al.*, 2003). Somit ist ein protektiver Einfluss unbehandelter Netze nicht erwiesen. Das Netz stellt zwar eine physische Barriere für Moskitos dar, führt jedoch in unbehandeltem Zustand zu keiner Moskitoabtötung. Demgegenüber reduzieren imprägnierte Bettnetze signifikant die Moskitodichte im Haus (Ansari *et al.*, 2003), so dass die Gefahr eines infektiösen Stiches geringer ist.

Das Schutzvermögen Insektizid-behandelter Netze wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Ansari *et al.*, 2003; Erlanger *et al.*, 2004). Sie reduzieren, vor allem bei Kleinkindern, die Prävalenz der Plasmodien-Infektion (Abdulla *et al.*, 2005), die Malaria-Morbidität und

#### 4. DISKUSSION

-Mortalität (Abdulla *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 2004). Selbst Kinder, die kein Bettnetz in Gebieten mit relativ hoher Anwendung imprägnierter Netze verwendeten, wiesen eine geringere Malaria-Morbidität auf (Abdulla *et al.*, 2005). So ist also die Anwendung imprägnierter Bettnetze durch ihren besseren Schutzcharakter (Marchant *et al.*, 2001) der unbehandelten Netze vorzuziehen.

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für den mangelnden Einfluss unbehandelter Netze in unserer Studie, könnten eine Beschädigung des Netzes (Mwangi *et al.*, 2003) oder eine unregelmäßige Anwendung (Nacher *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2003) sein.

Weiterhin stellten wir fest, dass eine kombinierte Anwendung von Tür-, Fenster- und Bettnetzen, die leider nur bei 11,4 % der Familien bestand, unsere Studienkinder am effektivsten schützte. Kinder mit dieser Netzkombination wiesen eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit für eine *P. falciparum*-Infektion und Malaria-Anämie auf und machten signifikant weniger Malaria-Attacken durch ( $p = 0.03$ ). Außerdem lagen im Trend seltenste Infektionen und Malaria-Anämie-Episoden, und geringste Parasitendichten vor. Bei einem zusätzlichen Gebrauch von Fenster- und Türnetzen wird die Zahl von in das Haus eindringenden Moskitos schon von vornherein reduziert. Durch eine weitere physische Barriere in Form eines Bettnetzes sinkt die Wahrscheinlichkeit eines infektiösen Moskitostiches und einer sekundären Manifestation noch weiter. So sollte den Familien als zusätzliche Schutzmöglichkeit das Anbringen von Tür- und Fensternetzen an ihren Häusern empfohlen werden.

Leider wurden in unserer Studienpopulation keine imprägnierten Moskitonetze verwendet. Die limitierenden Faktoren scheinen einerseits die mangelnde Aufklärung und andererseits der finanzielle Aufwand zu sein. Da die Anwendung eines Moskitoschutzes positiv mit der Einkommenshöhe der Familie assoziiert ist (Fawole *et al.*, 2001), wenden vor allem reichere Familien imprägnierte Netze an (Abdulla *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2003). Die Nachbehandlung des Netzes mit Insektizid wird oft als zu teuer (Alaii *et al.*, 2003), nutzlos oder sogar gesundheitsschädigend eingeschätzt (Minja *et al.*, 2001). Unbehandelte Netze führen demgegenüber zu einem geringeren finanziellen Aufwand (Guyatt & Snow, 2002) und Dorfbewohner können sich ihre Wirkung besser als die des Insektizids vorstellen (Mwangi *et al.*, 2003). Eine hohe Flächendeckung und Netznachbehandlung wurde im Rahmen sozialer Netzverteilungs- und Behandlungsprogramme erzielt (Erlanger *et al.*, 2004; Abdulla *et al.*, 2005) und wäre auch in Ghana wünschenswert.

Da viele Mütter trotz des Besuches einer Schule nicht lesen konnten (84,3 % der Mütter mit Grundschul- und 42 % mit Oberschulabschluss), erwies sich in unserer Studienpopulation das Lesevermögen als „härterer“ Parameter für eine Aussage über ihren Bildungsgrad. Kinder von

#### 4. DISKUSSION

Analphabetinnen infizierten sich mit größerer Wahrscheinlichkeit (Tab. 3.6), früher (Abb. 10) und häufiger als Kinder lesender Mütter (Tab. 3.7). Weiterhin bestand eine positive Korrelation zur Parasitendichte (Tab. 3.8) und Malaria-Anämie (Tab. 3.11, 3.12; Abb. 21). Unsere Ergebnisse werden durch andere Studien bestätigt, in denen Kinder von Analphabetinnen oder Müttern ohne formellen Schulabschluss häufiger an schweren Anämien erkrankten (Abdulla *et al.*, 2005), mehr *P. falciparum*-Infektionen (Mwangi *et al.*, 2003) und eine höhere Mortalität im Alter unter zwei Jahren (Kuate Defo, 1997) aufwiesen.

Verschiedene Faktoren könnten zur häufigeren *P. falciparum*-Infektion und Manifestationen der Erkrankung beitragen: Ungebildete Mütter schienen große Defizite in den Bereichen Prävention und Therapie der Malaria zu haben. So wurde in Mexiko nachgewiesen, dass Mütter mit einem vollendeten Grundschulabschluss besser über die Malaria-Prävention informiert waren, als Mütter ohne Schulabschluss (Rodriguez *et al.*, 2003). Auch in unserer Studie fiel auf, dass Analphabetinnen signifikant häufiger gar keinen Moskitoschutz anwandten (33 % vs. 16 %), ihre Kinder seltener durch Fenster-, Tür- und Bettnetze schützten (6.3 % vs. 22 %) und stattdessen häufiger Moskitosprays, -spiralen und andere Hilfsmittel (26 % vs. 16 %;  $p = 0.009$ ) benutzten. Durch diesen schlechteren Schutz ist natürlich gut erklärbar, warum sich Kinder ungebildeter Mütter häufiger mit *P. falciparum* infizierten.

Über die Ursachen des schlechteren Moskitoschutzes ungebildeter Mütter kann nur spekuliert werden. Gründe hierfür könnten das mangelnde Wissen über Malaria, der häufige traditionelle Naturglaube ungebildeterer Bevölkerungsschichten oder der Kostenfaktor, der einen Netzkauf limitiert, sein. In Agogo fand kein soziales Netzverteilungsprogramm statt.

Auch die häufigere klinische Manifestation der Malaria in Form von Malaria-Anämien und höheren Parasitendichten der Kinder ungebildeter Mütter könnte durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit größer, im Rahmen häufigerer Infektionen sekundär eine manifeste Erkrankung auszubilden. Da die Kinder im Rahmen der Studie regelmäßig das Studienlabor aufsuchten, wurde eine Infektion oder Manifestation der Erkrankung schnell und ordnungsgemäß diagnostiziert und therapiert. Das Verhalten der Mütter zwischen den Besuchsterminen könnte jedoch die Manifestation der Erkrankung befördert haben. So könnten einerseits ungebildete Mütter Symptome des Kindes nicht als Malaria-zugehörig erkannt, und das Kind erst verspätet dem Studienlabor zur Behandlung zugeführt haben. Die Wahrscheinlichkeit der Manifestation klinischer Symptome und hoher Parasitendichten zu den Monatsterminen wäre dann größer. Vor allem bei den ungebildeten Gruppen der afrikanischen Gesellschaft spielen traditionelle Glaubensmodelle und Aberglaube auch heute noch eine wichtige Rolle. Die milde Malaria wird in dieser Vorstellungswelt als normale, nicht

#### 4. DISKUSSION

verhüt-, jedoch behandelbare Erkrankung angesehen (Mwenesi *et al.*, 1995). Demgegenüber werden Konvulsionen, schwere Anämien und Splenomegalie oft nicht als Folge der Malaria, sondern spiritueller Prozesse fehlgedeutet (Mwenesi *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2004; Nkuo Akenji *et al.*, 2005) und vom Naturmediziner therapiert. Selbst bei Akzeptanz der schulmedizinischen Erkenntnisse koexistieren diese mit traditionellen Behandlungsmethoden oder werden von ihnen inkorporiert (Hausmann *et al.*, 1998). Eine vermehrte Neigung ungebildeter Mütter zur Selbstmedikation oder Besuchen beim Naturheiler kann vermutet werden. In Ghana wurde die Selbstmedikation bereits als Phänomen ärmerer Gemeinden mit niedrigem Bildungsgrad erkannt (Biritwum & Welbeck, 2000). Auch in unserer Studie stellte die Selbstmedikation trotz erfolgter Aufklärung ein Problem dar. Diese im Dorfladen erworbene, billige Medikamentenmischung aus Antipyretika, Antibiotika und Malariamitteln (Lubanga *et al.*, 1997; Uzochukwu *et al.*, 2004; Olaogun *et al.*, 2005) führt jedoch durch ungenügende Dosierung, teilweise unwirksamen Malariamittel-Anteil und falsche Handhabung der Patienten (Cheesbrough, 1999) zu Medikamentenresistenzen und mangelnder Parasiteneradikation. Neben der Zeitersparnis und einer höheren Bequemlichkeit ist wohl auch das Verkennen der Schwere der Erkrankung ursächlich für dieses Verhalten (Vuckowic, 1999). Da alle Kosten für Diagnostik und Therapie der Probanden von der Studie übernommen wurden, kann der viel beschriebene ökonomische Einfluss (Uzochukwu *et al.*, 2004; Onwujekwe *et al.*, 2005) nur eine untergeordnete Rolle gespielt haben. Zusammenfassend ist zu bemerken, dass den Probanden für Verhaltensänderungen ein gewisser zeitlicher Spielraum zugestanden werden muss.

Weiterhin bleibt die Frage zu klären, warum der Bildungsgrad der Mütter und nicht der Väter einen starken Einfluss auf die Malaria der Kinder hatte. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist sicherlich die engere Bindung von Kindern an ihre Mütter. Die Rollenverteilung in Ghana ist klassisch. Durch den engeren Kontakt erkennen Mütter im Allgemeinen als Erste eine Erkrankung ihrer Kinder (Sims *et al.*, 1992; Olaogun *et al.*, 2005) und führen sie nun, ihrem Wissensstand entsprechend, einer Therapie zu. Frauen spielen eine zentrale Rolle bei der Krankheitsprävention und -aufklärung innerhalb der Familie oder Gemeinschaft (A/Rahman *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2003). In Mexiko waren vor allem Frauen für die Versorgung der Familie mit einem Moskitoschutz verantwortlich (Rodriguez *et al.*, 2003). Durch diese zentrale Rolle und den nahen Kontakt zu ihren Kindern, sind Malaria-Aufklärungsprogramme für Mütter von großer Bedeutung. Nach erfolgreichen Schulungen der Mütter und der Bereitstellung naher und erschwinglicher Behandlungsmöglichkeiten war in Kamerun ein signifikanter Rückgang der Prävalenz der Plasmodien-Infektion, der Splenomegalie, des Fiebers, der schweren Malaria-Anämie und der Höhe der Parasitendichte der Kinder zu verzeichnen. Mütter erkannten nun eine

Splenomegalie als Malariasymptom und führten bei Anzeichen für eine Malaria ihre Kinder sofort einer regelrechten Behandlung im Krankenhaus zu, ohne vorher die Kinder eigenständig zu medizieren (Nkuo Akenji *et al.*, 2005). Auch in Kenia wussten Mütter nach Aufklärung besser über die Malariagenese und Verwendung imprägnierter Bettnetze Bescheid. Sie verwendeten signifikant weniger Naturmedizin und Moskitosprays (Alaii *et al.*, 2003). Um vor allem Analphabetinnen die Möglichkeit einer ordentlichen Malaria-Aufklärung zu bieten, sind anschauliche oder mündliche Erklärungsmodelle, z.B. in Form von Bildern, von zentraler Bedeutung und einer schriftlichen Darstellung auf Plakaten vorzuziehen. Diese Vorgehensweise führte auch in Kamerun zum Erfolg (Nkuo Akenji *et al.*, 2005). Genau wie in Mexiko nehmen auch in Ghana die Frauen eine geringere soziale Position als ihre Männer ein (Rodriguez *et al.*, 2003). Da Frauen nicht über die finanziellen Mittel der Familie verfügen und so nicht eigenständig über den Kauf von Moskitonetzen entscheiden können (Alaii *et al.*, 2003), ist auch die Malaria-Aufklärung der Väter von großer Bedeutung.

Offene Wasserstellen in der Nähe des Wohnhauses, die Brutstätten von Moskitos darstellen, waren ebenfalls signifikant mit *P. falciparum*-Infektionen (Tab. 3.6 und 3.7; Abb. 10) und Malaria-Anämien (Abb. 21; Tab. 3.12) assoziiert. Aus diesem Grunde ist die Abdeckung oder Austrocknung dieser potentiellen Brutstätten der Moskitos von großer Bedeutung. Diese Strategie führte in Thailand, zusammen mit anderen Vorkehrungsmaßnahmen, zu einer Reduktion der Malaria (Friel *et al.*, 2004).

### **4.2.4. Einfluss genetischer Faktoren auf die Basisparameter**

#### **4.2.4.1. *P. falciparum*-Infektion**

Keiner der beiden Promoterpolymorphismen beeinflusste das Auftreten einer *P. falciparum*-Infektion signifikant (Tab. 3.6 und 3.7; Abb. 9, 12 und 13).

Auch in keiner anderen Studie wurde bis zum heutigen Tage eine Assoziation zwischen einer Plasmodien-Infektion und dem IL-10 –1082G/A-Promoterpolymorphismus (Ohashi *et al.*, 2002) oder niedrigen IL-10-Spiegeln (Day *et al.*, 1999; May *et al.*, 2000) festgestellt. Es ist nicht anzunehmen, dass diese genetische Mutation oder ein durch sie hervorgerufener niedriger IL-10-Plasmaspiegel (Turner *et al.*, 1997), eine Infektion verhindern oder ihr erstes Auftreten verzögern kann. Die funktionelle Bedeutung ist eher im Bereich der Manifestation der Malaria zu suchen.

Genauso wenig wie in unserer Studie (Tab. 3.6; Abb. 9; Tab. 3.7; Abb. 13), bestand bei gabunesischen Schulkindern eine signifikante Assoziation der Prävalenz der *P. falciparum*-Infektion zu den TNF- $\alpha$  –308G/A-Promotertypen (Mombo *et al.*, 2003). Allerdings trat in der

#### 4. DISKUSSION

Fall-Kontroll-Studie von Meyer *et al.* (2002), die Kinder mit zu Beginn schwerer Malaria, Kindern mit milder Malaria gegenüberstellte, ein interessantes Phänomen auf: Kinder mit A-Allel neigten in der Gruppe schwerer Malariafälle zu signifikant mehr symptomatischen Reinfektionen und in der Gruppe mit milder Malaria zu verkürzten Reinfektionsintervallen. Allerdings war durch die geringe Fallzahl die Gruppe der Kinder mit milder Malaria nur sehr klein. Homozygote Merkmalsträger des A-Allels des TNF- $\alpha$  –308G/A-Polymorphismus traten in der Studienpopulation nicht auf. Somit erscheint die exakte statistische Auswertung jener Studie fraglich. Weiterhin konnte keine Aussage über den Einfluss des homozygoten A-Allels auf die Malaria getroffen werden. Meyer *et al.* (2002) gingen außerdem von symptomatischen Reinfektionen, also Plasmodien-Infektionen in Kombination mit z.B. Fieber, aus. So könnte man eher vermuten dass nicht häufigere Reinfektionen, sondern häufigere klinische Manifestationen in der Gruppe mit A-Allel auftraten. Auch in der Studie von Mordmüller *et al.* (1997) wurde bereits eine Assoziation hoher TNF- $\alpha$ -Spiegel und Fieber hergestellt. Wiederum ist die funktionelle Bedeutung des Polymorphismus eher in der Manifestation der Malaria zu suchen.

##### 4.2.4.2. Parasitendichte

Auch in dieser Kategorie war kein signifikanter Effekt der genetischen Faktoren festzustellen.

Allerdings lag ein Trend in Abhängigkeit vom IL-10 –1082G/A-Polymorphismus mit geringsten Dichten bei homozygoten Kindern vor (Tab. 3.8). Die einzige Studie, die den Einfluss der IL-10 –1082G/A-Promotertypen auf die Malaria untersuchte, machte keine Angaben zu Veränderungen der Parasitendichte (Ohashi *et al.*, 2002). Andererseits liegen Studien vor, die ausgesprochen hohe Parasitämien mit einer hohen IL-10/TNF- $\alpha$ -Ratio (May *et al.*, 2000) oder hohen IL-10-Spiegeln (Day *et al.*, 1999; Othoro *et al.*, 1999) assoziieren. Der Mechanismus verstärkter IL-10-Produktion bei hohen Parasitendichten und klinischer Malaria ist noch nicht völlig geklärt. Vermutlich wird IL-10 bei hohen TNF-Spiegeln sekundär im Sinne einer negativen Rückkopplung ausgeschüttet (Fiorentino *et al.*, 1989), um einer schweren Manifestation entgegenzuwirken. Ob und wie allerdings eine verminderte IL-10-Bildung im Zusammenhang mit dem A-Allel (Turner *et al.*, 1997) zu geringeren Parasitendichten führen kann, ist unklar. Vielleicht führen niedrige IL-10-Spiegel über eine mangelnde negative Rückkopplung zu mäßig hohen TNF- $\alpha$ -Spiegeln, die ihrerseits mit einer beschleunigten Parasiteneliminationen assoziiert sind (Kremsner *et al.*, 1995; Mordmüller *et al.*, 1997). Dieser Sachverhalt bedarf weiterer wissenschaftlicher Untersuchung.

Der TNF- $\alpha$  –308G/A-Polymorphismus führte zu keiner signifikanten Veränderung der Parasitendichte (Tab. 3.8; Abb. 16). Im Trend wiesen jedoch Kinder mit A-Allel höhere Dichten

als die der Wildtypgruppe auf. Der gleiche nicht-signifikante Trend (Stirnadel *et al.*, 1999; Parikh *et al.*, 2004) oder eine grenzwertig signifikante Assoziation des A-Allels mit höchsten Parasitendichten (Aidoo *et al.*, 2001) war auch in anderen Studien nachweisbar. Eine eindeutig signifikante Assoziation des A-Allels zur Hyperparasitämie wurde jedoch nie bewiesen. Andererseits wurden hohe TNF- $\alpha$ -Spiegel, die u.a. durch eine erhöhte transkriptionale Aktivität des A-Allels hervorgerufen werden (Wilson *et al.*, 1997), vor allem bei hyperparasitämischen Kindern beobachtet (Grau *et al.*, 1989; Othoro *et al.*, 1999). Eine hohe TNF- $\alpha$ -Produktionskapazität soll aber auch mit einer beschleunigten Parasitenelimination assoziiert sein (Kremsner *et al.*, 1995; Mordmüller *et al.*, 1997; Muniz-Junqueira *et al.*, 2001). Hierbei ist wohl der Zeitpunkt der Bestimmung der Parasitendichte von Bedeutung. Hohe Parasitendichten führen über die Ruptur Parasiten-befallener Erythrozyten zu einer vermehrten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung (Karunweera *et al.*, 1992), die ihrerseits wiederum die Anzahl der Parasiten über eine beschleunigte Parasitenelimination dezimiert.

#### 4.2.4.3. Klinische Malaria

Obwohl das A-Allel des IL-10 -1082G/A-Promoterpolymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit (Tab. 3.9) und den Zeitpunkt (Abb. 17) des ersten Auftretens einer Malaria ausübte, bestand in der univariaten Analyse eine signifikante Assoziation mit weniger Malaria-Attacken im ersten Lebensjahr (Tab. 3.10). Homozygote Kinder erkrankten so, im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen, am seltensten. Dieser Effekt verlor sich jedoch in der multivariaten Analyse, sobald für die Faktoren Wohnort der Familie und Anzahl der Moskitos im Haus adjustiert wurde ( $p = 0.08$ ). Dieses Phänomen könnte einerseits durch den geringeren Einfluss des A-Allels im Vergleich zu den sozioökonomischen Faktoren gewertet werden. Auf der anderen Seite könnte man den Einfluss des IL-10-Polymorphismus auch nur als Scheineffekt werten, der nach Adjustierung entfällt. Da jedoch auch in der multivariaten Analyse noch ein grenzwertig signifikanter Einfluss bestand, spricht dies eher gegen die Theorie des Scheineffekts. Auch die seltenen klinischen Malaria-Episoden (4.8 % aller Besuche), vor allem in der Gruppe homozygoter Kinder, erschwerten eine verlässliche statistische Berechnung. In der einzigen bisher existenten Studie, die den Zusammenhang des -1082G/A-Promoterpolymorphismus und der Schwere der Malaria untersuchte, wurde kein signifikanter Unterschied der Genfrequenzen zwischen Probanden mit milder und schwerer Malaria nachgewiesen. Allerdings wurde kein Vergleich zwischen gesunden Kindern und solchen mit milder Malaria angestellt (Ohashi *et al.*, 2002), so dass auch hier eine vergleichende Aussage zu unserer Studie nicht möglich ist.

#### 4. DISKUSSION

Demgegenüber wurden signifikant erhöhte IL-10-Spiegel oder IL-10/TNF-Plasmaratios bei kamerunischen und kenianischen Kindern mit milder klinischer Malaria gefunden (Othoro *et al.*, 1999; Hermsen *et al.*, 2003). Weiterhin korrelierte die IL-10-Konzentration bei afrikanischen Kindern mit der Schwere der Erkrankung (Hermsen *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse ähneln denen unserer Studie, da das A-Allel, das mit seltenen Malaria-Episoden verbunden war (Tab. 3.10), zu geringeren IL-10-Spiegeln führt (Turner *et al.*, 1997). Da wir in unserer Studienpopulation jedoch nie schwere Erkrankungsfälle diagnostizierten, können auch keine Vergleiche zu Studien, die eine signifikante Assoziation zerebraler Malaria oder anderer schwerer Manifestationen zu erhöhten IL-10-Spiegeln (Kurtzhals *et al.*, 1998; Othoro *et al.*, 1999; Lyke *et al.*, 2004) oder einer erniedrigten IL-10/TNF- $\alpha$ -Ratio (May *et al.*, 2000) feststellten, gezogen werden. Wie nun durch das A-Allel hervorgerufene niedrige Spiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 eine klinische Manifestation verhindern sollen, ist ungewiss. Deutungsversuche unserer Ergebnisse sind auf Grund des komplexen Zusammenspiels verschiedener Zytokine und der Interaktion unterschiedlichster Polymorphismen und deren Auswirkung auf die Malaria sehr schwierig und bedürfen einer weiteren wissenschaftlichen Untersuchung.

Genauso wie Parikh *et al.* (2004) und Bayley *et al.* (2004) konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten klinischer Malaria und den TNF- $\alpha$  -308G/A-Promotertypen feststellen (Tab. 3.9 und 3.10; Abb. 17 und 19). Die sich widersprechenden Ergebnisse der verschiedenen Studien könnten durch Verteilungsungleichgewichte einerseits mit den einzelnen Promoterpolymorphismen, die teilweise nur in Verbindung miteinander auftreten (TNF- $\alpha$  -238A und TNF- $\alpha$  -376A, TNF- $\alpha$  -376A und TNF- $\alpha$  -308A) und andererseits mit HLA-Varianten (Wilson *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 1999; May *et al.*, 2000; de Jong *et al.*, 2002) hervorgerufen werden.

In einer anderen Studie wurden hohe TNF-Plasmaspiegel im Zusammenhang mit Fieber bei *P. falciparum*-Infektionen beobachtet (Mordmüller *et al.*, 1997). Exzessiv hohe TNF-Spiegel scheinen über eine Vasokonstriktion im Gehirn und den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Sibson *et al.*, 2002) eine zerebrale Malaria zu begünstigen. So assoziierten verschiedene Studien eine schwere, meist zerebrale, Malaria mit dem TNF- $\alpha$  -308A-Allel oder erhöhten TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegeln (Grau *et al.*, 1989; Mordmüller *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997; Kurtzhals *et al.*, 1998; McGuire *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000; Aidoo *et al.*, 2001; Aguilon *et al.*, 2002; el-Nashar *et al.*, 2002; Gourley *et al.*, 2002; Manish *et al.*, 2003; Lyke *et al.*, 2004). Eine erhöhte Mortalität war sowohl mit hohen TNF- $\alpha$ -Spiegeln (Grau *et al.*, 1989; Day *et al.*, 1999, Manish *et al.*, 2003), als auch dem -308A-Allel bei Frühgeborenen (Aidoo *et al.*, 2001)

verbunden. Da diese schweren Manifestationen in unserer Studie nicht auftraten, können keine vergleichenden Aussagen gemacht werden.

Es ist schwierig, die Höhe des Plasmaspiegels von Zytokinen in Bezug zu einer Malaria zu setzen, da Zytokine Halbwertszeiten von nur wenigen Minuten aufweisen. So wird der Zytokin-Plasmaspiegel einerseits durch den Zeitpunkt der Blutentnahme und andererseits die Dauer des Synthesestimulus bestimmt (Day *et al.*, 1999). Weiterhin wurde in keiner der gängigen Studien ein Aussage zur biologischen Aktivität dieser Zytokine oder ihrer Konzentration im Gewebe gemacht. Außerdem ist unbekannt ob die veränderten Zytokinspiegel primär oder sekundär hervorgerufen wurden. So bleibt unklar, ob beispielsweise IL-10 direkt im Gefolge einer Malaria vermehrt ausgeschüttet wird oder erst später als Antwort auf gefährlich hohe TNF-Spiegel (Dodoo *et al.*, 2002). Ursache und Wirkung sind somit schwer auseinander zu halten.

#### 4.2.4.4. Malaria-Anämie

Die IL-10 –1082G/A-Promotertypen übten keinen signifikanten Einfluss auf die Malaria-Anämie aus (Tab. 3.11 und 3.12; Abb. 24). Demgegenüber bestand jedoch eine signifikante Assoziation zur Häufigkeit der schweren Malaria-Anämie im ersten Lebensjahr mit seltensten Episoden in der Gruppe homozygoter Kinder, gefolgt von Kindern mit Wildtyp und solchen mit heterozygotem Merkmal (Tab. 3.13). Dieser Einfluss verlor sich allerdings in der multivariaten Analyse bei Adjustierung für das Geschlecht, den Wohnort, das Lesevermögen der Mutter und die Sauberkeit im Haus ( $p = 0.54$ ). Ursächlich für dieses Ergebnis könnte einerseits der schwächere Einfluss der Promotertypen im Vergleich zu sozioökonomischen Faktoren sein. Andererseits könnte es auch als Scheineffekt der IL-10-Mutation gedeutet werden. Außerdem verwundert es, dass Kinder mit heterozygotem Merkmal die größte Zahl schwerer Malaria-Anämie-Attacken aufwiesen, statt eine Mittelstellung zwischen homozygoten Kindern und Kindern mit Wildtyp einzunehmen. Die nur vereinzelt Fälle schwerer Malaria-Anämien in unserer Studie erschwerten eine eindeutige statistische Auswertung und könnten zu diesem Ergebnis beigetragen haben.

In verschiedenen Studien stellten niedrige IL-10-Spiegel (Kurtzhals *et al.*, 1998; Lyke *et al.*, 2004) oder eine niedrige IL-10/TNF- $\alpha$ -Plasmaratio (Othoro *et al.*, 1999; May *et al.*, 2000) einen Risikofaktor für schwere Malaria-Anämien dar. Eine hohe IL-10/TNF- $\alpha$ -Ratio war dagegen positiv mit der Höhe des Hb assoziiert (Nussenblatt *et al.*, 2001). In unserer Studie entwickelten demgegenüber Kinder mit homozygotem Merkmal, welches eigentlich zu niedrigsten IL-10-Spiegeln führt (Turner *et al.*, 1997), die wenigsten schweren Anämie-Episoden. Da wir jedoch keine Messung des IL-10-Plasmaspiegels vornahmen, ist zu dieser Diskrepanz keine eindeutige

#### 4. DISKUSSION

Aussage zu machen. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 stimuliert die Erythropoese (Wang *et al.*, 1996) und sollte zu höheren Hb-Werten und selteneren Anämie-Episoden führen.

Kinder mit TNF- $\alpha$  -308A-Allel wiesen im Vergleich zu denen der Wildtypgruppe einen signifikant geringeren mittlerer Hb im ersten Lebensjahr auf ( $p = 0.027$ , ANOVA Mtw.auc). Der durchschnittliche Hb pro Kind pro Jahr betrug beim Wildtyp 10.0 g/dl und bei Kindern mit Promotermutation 9.6 g/dl ( $p = 0.057$ , ANOVA). Auch im zeitlichen Verlauf bewegte sich die Hb-Kurve der Kinder mit A-Allel immer unter der der Kinder mit Wildtyp mit signifikanten Unterschieden in der 16. und 44. Lebenswoche (Abb. 30). Entzündungsmediatoren, wie TNF- $\alpha$ , sind in der Lage, die Erythropoese zu stören (McGuire *et al.*, 1999). Dieser Zusammenhang wurde bei Nacktmäusen im Gefolge der Implantation TNF- $\alpha$ -sezernierender Zellen nachgewiesen (Johnson *et al.*, 1989). Weiterhin kann TNF- $\alpha$  auch eine Dyserythropoese und Erythrophagozytose befördern (McGuire *et al.*, 1999). Diese eindeutige Hb-Reduktion bei Kindern mit -308A-Allel verlor sich jedoch, sobald nur noch Kinder mit einem positiven PCR-Ergebnis in die Berechnungen einbezogen wurden. Ein signifikanter Unterschied bestand dann nur noch in der 20. Lebenswoche. Einerseits könnte die kleine Gruppengröße von infizierten Kindern mit A-Allel und die damit verbundene erschwerte statistische Berechnung dieses Ergebnis erklären. Außerdem ist zu vermuten, dass durch die viel ausgeprägtere Hb-Reduktion im Rahmen einer *Plasmodien*-Infektion, der geringere Einfluss der TNF-Promotertypen auf die Erythropoese nicht mehr ins Gewicht fällt. Nussenblatt *et al.* (2001) wiesen eine negative Korrelation des Hämoglobingehaltes mit der Höhe des TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegels bei Kindern mit einer Plasmodien-Infektion nach. Da das A-Allel des TNF- $\alpha$  -308G/A-Polymorphismus zu erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegeln führt (Wilson *et al.*, 1997), entsprechen die Ergebnisse von Nussenblatt *et al.* (2001) in der Richtung, jedoch nicht der Signifikanz, den Unsrigen.

Die TNF- $\alpha$  -308G/A-Promotertypen modulierten weder die Malaria-Anämie, noch die schwere Malaria-Anämie signifikant. Im Trend erkrankten jedoch Kinder mit dem Merkmal Mutation mit größerer Wahrscheinlichkeit (Tab. 3.11), und häufiger (Tab. 3.12; Abb. 26) an Malaria-Anämien als auch früher und häufiger an schweren Malaria-Anämien (Tab. 3.13; Abb. 27). Die fehlende Signifikanz dieser Ergebnisse im Gegensatz zur erwiesenen Hb-Reduktion durch das TNF- $\alpha$  -308A-Allel (Abb. 30) kann verschiedene Ursachen haben: Wir betrachteten Malaria-Anämien, also Anämien in Kombination mit einer *P. falciparum*-Infektion. Schon bei der Reduktion des mittleren Hb durch das A-Allel stellten wir fest, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei infizierten Kindern nicht mehr nachweisbar war. Ein weiteres Problem bestand in der Definition der Anämie. Wenn Hb-Schwankungen durch die Promotertypen innerhalb der Grenzen der Definition der Anämie oder schweren Anämie auftraten, konnten diese nicht als

signifikant-unterschiedlich wahrgenommen werden. So bewegten sich die durchschnittlichen Hb-Werte der Gruppen Wildtyp (10.0 g/dl) und Mutation (9.6 g/dl) beide im Bereich der Anämie-Definition (< 11g/dl).

Aidoo *et al.* (2001) stellten eine signifikante Assoziation des TNF –308A-Allels mit schweren Anämien geringgewichtiger Neugeborener fest. Für die schwere Malaria-Anämie ergab sich in jener Studie allerdings nur ein nicht-signifikanter Trend in die gleiche Richtung. Als Ursache für diese Diskrepanz wurde vor allem die geringe Fallzahl schwerer Malaria-Anämien genannt, wie sie auch in unserer Studie vorlag (Aidoo *et al.*, 2001).

#### **4.2.5. Vergleich des Einflusses genetischen und sozioökonomischer Faktoren**

Das Auftreten einer *P. falciparum*-Infektion wurde in erster Linie durch sozioökonomische Faktoren wie den Wohnort der Familie, das Lesevermögen der Mutter, offene Wasserstellen nahe beim Haus und die Anwendung eines Moskitoschutzes beeinflusst. Die untersuchten Promoterpolymorphismen spielten in dieser Kategorie keine Rolle. Auch die Manifestation der Malaria, in Form von höheren Parasitendichten, klinisch-manifester Malaria und Malaria-Anämie, wurde vor allem von sozioökonomischen Faktoren moduliert. Im Vergleich dazu spielte der Einfluss der beiden Promoterpolymorphismen nur eine untergeordnete Rolle: So wiesen Kinder mit homozygotem Merkmal des IL-10 –1082G/A-Promoterpolymorphismus ausschließlich in der univariaten Analyse signifikant weniger Episoden in den Kategorien „klinisch-manifeste Malaria“ (Tab. 3.10) und „schwere Malaria-Anämie“ auf (Tab. 3.13). Bei Kindern mit mutiertem Allel des TNF- $\alpha$  –308G/A-Promoterpolymorphismus bestand eine signifikante Reduktion des mittleren Hb nur dann, wenn Kinder unabhängig von ihrem Infektionsstatus betrachtet wurden.

In einer ähnlichen Studie in Sri Lanka (Mackinnon *et al.*, 2000) wurde die Inzidenz der *P. falciparum*-Infektion zu jeweils 15 % von genetischen Faktoren, der Wohnsituation und anderen nicht-genetischen Merkmalen (Geschlecht, Alter, Beruf, vorangegangene *P. falciparum*-Infektion) moduliert. Der im Vergleich zu unseren Ergebnissen stärkere genetische Einfluss ist vermutlich dadurch erklärlich, dass Mackinnon *et al.* keine definierten Genvarianten betrachteten, wie dies in unserer Studie der Fall war, sondern aus verwandtschaftlichen Verhältnissen (Stammbaum) eines Dorfes Rückschlüsse auf die Gesamtheit genetischer Variationen und deren Einfluss auf eine *P. falciparum*-Infektion zogen. Obwohl die meisten genetischen Faktoren wohl eher die Manifestation der Malaria beeinflussen dürften, wurde bereits von immunologischen Mechanismen, wie einer HLA-assoziierten Hemmung der

Parasitenvermehrung in der Leber (Hill *et al.*, 1991; 1992), berichtet, die eine *P. falciparum*-Infektion beeinflussen könnten.

Die klinische Manifestation der Malaria war in Sri Lanka zu 10 % durch genetische Unterschiede, 10 % durch Faktoren wie Geschlecht, Alter, Beruf, 3 % durch die Wohnsituation und 7 % durch Infektionsparameter wie Parasitendichte und Parasitenspezies, erklärlich (Mackinnon *et al.*, 2000). Auch hier ist davon auszugehen, dass durch die Gesamtheit genetischer Faktoren ein größerer Einfluss auf die Manifestation der Malaria, als in unserer Studie, ermittelt wurde. Im Allgemeinen beeinflussen genetische Faktoren vor allem die Manifestation der Malaria. Es ist schon lange bekannt, dass die Sichelzellanämie (Allison *et al.*, 1964; Hill *et al.*, 1991), der G-6-PDH-Mangel (Ruwede *et al.*, 1995) und andere Genvarianten, die unter den genetischen Faktoren der Mackinnon-Studie subsummiert wurden, einen Schutz vor Malaria bieten.

In einer späteren Studie in Kenia zeigte sich, dass der Einfluss des Sichelzellgens und der  $\alpha$ -Thalassämie auf die manifeste Malaria jeweils nur 2 % ausmachten, obwohl der Einfluss aller Gene auf die milde Malaria auf 23 % und auf die schwere Malaria auf 34 % geschätzt wurde (Mackinnon *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse untermauern unsere Hypothese, dass einzelne Gene, wie z.B. des IL-10 -1082G/A-Promoterpolymorphismus, jeweils nur einen kleinen Teil zur Gesamtheit des genetischen Einflusses auf die Malaria beitragen. Die Gesamtheit genetischer Faktoren übte in Kenia einen größeren Einfluss auf die schweren Manifestation als auf die milde Malaria aus (34 % vs. 23 %) (Mackinnon *et al.*, 2005). Da schwere Fälle in unserer Studie nie auftraten, ist kein Vergleich zur Mackinnon-Studie anzustellen. Allerdings wäre solch eine Konstellation denkbar, da in unserer Studie von der bloßen Infektion zur Manifestation der Einfluss sozioökonomischer Faktoren relativ ab- und der genetischer Faktoren zunahm, obwohl sozioökonomische Faktoren auch bei der Manifestation der Malaria die Hauptrolle spielten.

### 4.3. Schlussfolgerungen

Sozioökonomische Faktoren übten den stärksten Einfluss auf das Auftreten einer *P. falciparum*-Infektion, aber auch die Manifestation der Malaria aus. Demgegenüber bestand kein Einfluss der untersuchten Promoterpolymorphismen auf die *P. falciparum*-Infektion und ein nur sehr geringer auf die Manifestation der Malaria. Einerseits bestätigen diese Ergebnisse unsere Annahme, dass sozioökonomische Faktoren eher eine Plasmodien-Infektion modulieren, und der Einfluss der beiden Genvarianten eher im Bereich der Malaria-Manifestation zu suchen ist. Überraschenderweise waren sozioökonomische Faktoren jedoch auch in stärkerem Maße an der Malaria-

#### 4. DISKUSSION

Manifestation beteiligt. Es ist anzunehmen, dass durch die Modulation der Infektionshäufigkeit sekundär auch die Manifestation der Malaria beeinflusst wurde.

In Anbetracht der zentralen Rolle nicht-genetischer Faktoren ist eine Verbesserung im sozioökonomischen Bereich anzustreben. Hierbei ist vor allem eine Aufklärung und Alphabetisierung der Mütter, die eine zentrale Rolle in der Familie und Gemeinschaft bei der Krankheitsprävention und -aufklärung spielen (A/Rahman *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2003), von immenser Bedeutung. In Afrika wurde im Rahmen einer solchen Aufklärung der Mütter ein signifikanter Rückgang der Malaria-Morbidität der Kinder, ein besseres Erkennen von Malaria-symptomen, eine sofortige und regelrechte Behandlung im Krankenhaus ohne vorherige Selbstmedikation (Nkuo Akenji *et al.*, 2005) und eine vermehrte Anwendung eines wirkungsvollen Moskitoschutzes (Alaii *et al.*, 2003) beobachtet. Um Analphabetinnen erfolgreich über Malaria aufzuklären, sind anschauliche oder mündliche Erklärungsmodelle, z.B. in Form von Bildern, von zentraler Bedeutung und einer schriftlichen Darstellung vorzuziehen.

Unsere Studienpopulation war ungenügend gegen Moskitos geschützt. So wurden die in dieser Studie am besten schützende Kombination aus Fenster-, Tür- und Bettnetzen von nur 11.4 % der Familien angewandt. Imprägnierte Bettnetze, deren Anwendung in anderen Studien in Afrika mit einer signifikanten Reduktion der Infektionsprävalenz (Abdulla *et al.*, 2005), Malaria-Morbidität und -Mortalität bei Kleinkindern verbunden war (Abdulla *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 2004), wurden in Agogo nicht benutzt. Da jedoch eher reichere Familien imprägnierte Netze verwenden (Abdulla *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2003), sollte auch in Agogo ein soziales Netzverteilungs- und Behandlungsprogramm angestrebt werden. Vor allem die im Regenwald lebenden Kinder, die durch die größere Moskitodichte vermehrt an Malaria erkranken, müssen mit imprägnierten Bettnetzen versorgt werden. Weiterhin muss auf die Sauberkeit im Haus und eine Trockenlegung offener Wasserstellen in der Nähe des Wohnhauses geachtet werden, so dass eine starke Vermehrung von Moskitos nahe beim oder im Wohnbereich verhindert werden kann.

Trotz des Erkennens der zentralen Rolle sozioökonomischer Faktoren bei der Malariagenese wurden bisher kaum praktische Konsequenzen gezogen. Daher wäre für die Zukunft eine Zusammenarbeit mit Sozialwissenschaftlern in Malariaprojekten von großer Bedeutung (Mwenesi *et al.*, 2005).

Die Rolle der beiden untersuchten Promoterpolymorphismen bei Malaria bedarf weiterer wissenschaftlicher Untersuchung. Die hohen Genfrequenzen vor allem heterozygoter Varianten sind durch die minimale Modulation der Manifestation der Malaria kaum erklärlich. Ob und in welcher Weise ein Selektionsvorteil der mutierten Allele besteht, ist fraglich.