

## **1 Einleitung**

Die Malaria ist nach wie vor die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit. Jährlich erkranken 300-500 Millionen Menschen. Die Todesfälle werden auf zwei bis drei Millionen pro Jahr geschätzt. Mit mehr als zwei Milliarden Menschen leben über 40 % der Weltbevölkerung in malariagefährdeten Gebieten. Über 90 % der schweren Krankheitsverläufe und Todesfälle treten im tropischen Afrika südlich der Sahara auf und betreffen hauptsächlich Schwangere und Kleinkinder (WHO 2004; Bryce *et al.*, 2005).

Schwangere Frauen, besonders *Primigravidae*, unterliegen einem erhöhten Risiko, sich mit *Plasmodium falciparum* zu infizieren und klinische Malaria zu entwickeln (Alecrim *et al.*, 2000). Aus einer *P. falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft können mütterliche und fetale Anämie, reduziertes Geburtsgewicht, Frühgeburtlichkeit und erhöhte perinatale Mortalitätsraten resultieren (Brabin, 1983; Steketee *et al.*, 2001; Whitty *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2007). Daher empfiehlt die WHO allen schwangeren Frauen in endemischen Gebieten, eine antiparasitäre Chemoprophylaxe bzw. eine Präventivbehandlung (WHO 1986, 2004). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine antiparasitäre Prophylaxe bzw. Präventivbehandlung während der Schwangerschaft zu reduzierten Infektionsraten, milderem Verlauf und zu verminderten peripheren und plazentaren Parasitendichten führt. Daraus folgen wiederum höhere mütterliche Hämoglobinwerte, weniger Frühgeburtlichkeit und ein durchschnittlich höheres Geburtsgewicht der Neugeborenen (Cot *et al.*, 1995, 1998; Verhoeff *et al.*, 1998; Shulman *et al.*, 1999; Salihu *et al.*, 2000; Garner & Gulmezoglu, 2006).

Die Optimierung von Prophylaxe und Präventivtherapie durch den Einsatz wirksamer Medikamente ist entscheidend für die Kontrolle der Schwangerschafts-assoziierten Malaria in den Endemiegebieten. Dies wird erschwert durch die zunehmende Resistenzentwicklung der Parasiten gegen die gängigen Malariamedikamente (WHO, 2001; Miller & Greenwood, 2002).

## **1.1 Malaria**

### **1.1.1 Entwicklungszyklus von Plasmodien**

Die Malariaparasiten sind Protozoen, die zur Gruppe der Sporozoen gehören. Von den über 100 bekannten Plasmodienspezies sind lediglich vier humanpathogen: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*.

Der Entwicklungszyklus der Parasiten unterteilt sich in eine asexuelle Phase im Menschen als Endwirt und eine sexuelle Phase in der weiblichen *Anopheles*-Mücke als Zwischenwirt und Überträger. Durch den Stich einer *Anopheles* gelangen infektiöse Parasitenformen in den

Blutkreislauf des Menschen. Diese sogenannten Sporozoiten befallen kurze Zeit nach Inokkulation Leberparenchymzellen. In den Hepatozyten findet eine erste asexuelle Vermehrung statt: die Gewebsschizogonie. Die in der Leber entstandenen extraerythrozytären Schizonten entwickeln sich je nach Spezies der Plasmodien verschieden. Bei *P. falciparum* reifen alle Schizonten in der Leber zu Merozoiten. Bei einer Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* kann ein Teil der Schizonten in einer latenten Form (Hypnozoiten) in der Leber persistieren. Mit der Ruptur infizierter Hepatozyten, der Freisetzung von Merozoiten und deren Eindringen in zirkulierende Erythrozyten beginnt die erythrozytäre Schizogonie. Nach deren Abschluss kommt es wiederum zur Freisetzung von Merozoiten, die erneut die zirkulierenden Erythrozyten befallen. Ein kleiner Teil der Merozoiten entwickelt sich zu geschlechtlichen Formen, den Gametozyten. Diese werden von *Anopheles*-Mücken bei einer Blutmahlzeit aufgenommen. Im Verdauungstrakt der *Anopheles* vollzieht sich anschließend die sexuelle Vermehrung (Sporogonie). Mit der Ausbildung infektiöser Sporozoiten in den Speicheldrüsen der *Anopheles* schließt sich der Zyklus (Bray & Garnham, 1982).

### **1.1.2 Klinik der Malaria tropica**

Die Malaria tropica wird durch Infektion mit *P. falciparum* hervorgerufen. Im Gegensatz zu den benignen Formen der Malaria, die durch Infektion mit *P. vivax*, *ovale* und *malariae* ausgelöst werden, ist die Malaria tropica potentiell letal. In Afrika südlich der Sahara verursachen Infektionen mit *P. falciparum* ca. zwei Millionen Todesfälle im Jahr. Akute Erkrankungen betreffen vor allem Kinder und schwangere Frauen (WHO, 2004).

Das Erscheinungsbild der akuten Malaria tropica ist zunächst durch grippeähnliche Allgemeinsymptome wie Schwäche, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Durchfall und Erbrechen sowie Fieber gekennzeichnet. Bei semiimmunen Individuen (s. u.) kann diese unspezifische Symptomatik neben einer Anämie die einzige klinische Manifestation der Infektion darstellen. Im weiteren Verlauf entwickeln sich Symptome wie Ikterus, Thrombozytopenie und Hepatosplenomegalie. Wird nicht therapeutisch interveniert, kann durch Sequestrierung der befallenen Erythrozyten im Kapillarbett der inneren Organe eine schwere und komplizierte Malaria mit lebensbedrohlichen Komplikationen entstehen. Eine schwere Komplikation ist die zerebrale Malaria; *per definitionem* ein zumeist letales Koma bei nachgewiesener *P. falciparum*-Infektion unter Ausschluss anderer Ursachen der Bewusstseinsstörung. Folgende weitere Symptome und Komplikationen der schweren Malaria können auftreten: hochgradige Anämie, akutes Lungen- und Kreislaufversagen,

Spontanblutungen, Krampfanfälle, Hyperpyrexie, akutes Nierenversagen, Hämoglobinurie, Azidose, Dehydratation und Hypoglykämie (Gilles *et al.*, 1991; WHO, 2000).

### **1.1.3 Entwicklung einer Immunität**

Die Malaria tropica ist in hochendemischen Gebieten eine chronische Erkrankung (Bottius *et al.*, 1996). Durch die wiederholten Infektionen mit Plasmodien kommt es im Laufe eines Lebens zur Ausbildung einer nicht-sterilen Immunität, die spezies- und stammspezifisch ist (Bull *et al.*, 1998). Bereits 1910 prägte Ross den Begriff der Semiimmunität. Diese schützt vor häufiger und schwerer Erkrankung, nicht aber vor der Infektion *per se*. Die Ausbildung und Aufrechterhaltung dieser klinischen Immunität erfordert sogar eine längerfristige und wiederholte Infektion mit möglichst vielen verschiedenen Plasmodienstämmen (Al-Yaman *et al.*, 1997; Färnert *et al.*, 1999; Henning *et al.*, 2004). Die hohe Variabilität der parasitären Antigene erschwert diesen Prozess, da das Immunsystem nur ganz allmählich seine Kompetenz zur Erkennung und Abwehr der verschiedenen Parasitenstämme erweitert (Mercereau-Puijalon, 1996). Kennzeichnend für die Semiimmunität sind eine chronisch-latente Infektion, geringe Parasitämien und eine schwache bis fehlende klinische Symptomatik (Bottius *et al.*, 1996; Roper *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 1998).

Die Mechanismen des Zusammenspiels von humoraler und zellulärer Immunantwort bei der Kontrolle der Infektion sind noch nicht eindeutig geklärt. Gegen verschiedene parasitäre Oberflächenantigene u. a. gegen das *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) und das *Merozoite Surface Protein 1* und 2 (MSP-1/-2) wurden Antikörper identifiziert (Holder *et al.*, 1999; Ricke *et al.* 2000). Es konnten Zusammenhänge zwischen dem Nachweis dieser Antikörper und dem Vorliegen einer klinischen Immunität gegenüber *P. falciparum* nachgewiesen werden (Giha *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2002).

Kleinkinder zwischen 1 und 5 Jahren sind besonders gefährdet, an Malaria zu erkranken, weil sich noch keine ausreichende Immunität ausbilden konnte (Greenberg *et al.*, 1989; Snow *et al.*, 1999). Während der ersten Lebensmonate erkranken Neugeborene allerdings seltener an Malaria (Brabin, 1990b). Entscheidend für diesen „Nestschutz“ sind wahrscheinlich antiparasitäre mütterliche Antikörper vom Typ IgG, die sich in der Plazenta, der Nabelschnur und in der Muttermilch nachweisen lassen (Chizzolini *et al.*, 1991; Desowitz *et al.*, 1993; Hogh *et al.*, 1996).

## 1.2 Malaria in der Schwangerschaft

Im tropischen Afrika südlich der Sahara sind jährlich etwa 24 Millionen schwangere Frauen der Gefahr ausgesetzt, sich mit *P. falciparum* zu infizieren. In endemischen Gebieten ist das Risiko, an einer Malaria zu erkranken, für Schwangere bis zu viermal höher als für Nichtschwangere (Diagne *et al.*, 1997; Steketee *et al.*, 2001). Entscheidend für das erhöhte Infektionsrisiko von Schwangeren gegenüber Nichtschwangeren sind hochspezialisierte Subpopulationen von *P. falciparum*, die in der Lage sind, sich mittels eines spezifischen Liganden, einer Variante des PfEMP1, an Chondroitinsulfat A (CSA) und Hyaluronsäure der Synzytioblasten in der Plazenta zu binden. Infolgedessen kommt es zur Adhäsion und Sequestrierung der spezialisierten Parasiten im intervillösen Raum (Fried & Duffy, 1996).

*Primigravidae* sind besonders gefährdet, sich mit diesen klonalen Stämmen von *P. falciparum* zu infizieren und zu erkranken (Alecrim *et al.*, 2000), da sie sich zum ersten Mal mit den Plazenta-bindenden Erregern auseinandersetzen müssen. Im Kindesalter ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese sich im Wirt etablieren minimal. Infolgedessen bestehen keine spezifischen Immunmechanismen. Dagegen konnten *Multigravidae* bereits während früherer Schwangerschaften spezifische Antikörper gegen CSA-bindende Parasitenstämme ausbilden (Fried & Duffy, 1996; Beeson & Duffy, 2005; Duffy & Fried, 2005). *In vitro* gelang es mit Seren schwangerer *Multigravidae*, aber nicht mit den Seren von *Primigravidae*, die Adhäsion von *P. falciparum* an CSA zu hemmen (Ricke *et al.*, 2000).

Andere Risikofaktoren für Malaria in der Schwangerschaft sind neben Primigravität, eine cortisolvermittelte generelle Supprimierung der zellulären Immunität (Bouyou-Akotet *et al.*, 2004), HIV-Infektion (Mount *et al.*, 2004), junges mütterliches Alter (< 20 Jahre) und fehlende Antimalariaphylaxe (Steketee *et al.*, 2001; Garner & Gulmezoglu, 2006).

### 1.2.1 Plazentare Malaria

Die plazentare Malaria tritt bei bis zu 50 % der Schwangeren ohne peripher nachweisbare Parasitämie auf (Desowitz & Alpers, 1992; Leke *et al.*, 1999; Mockenhaupt *et al.*, 2002). Die Parasitämien in der Plazenta sind zudem meist höher als im peripheren Blut (Bulmer *et al.*, 1993a, 1993b; Ismail *et al.*, 2000). Makroskopisch zeigen mit *P. falciparum* infizierte Plazenten keine Unterschiede zu nicht-infizierten (Leopardi *et al.*, 1996). Sie haben allerdings häufig ein gegenüber der Norm verringertes Gewicht (Walter *et al.*, 1982). Neben der rein mechanischen Behinderung der Blutzirkulation durch die Sequestrierung der Parasiten im intervillösen Raum haben funktionelle Einschränkungen durch histologische Veränderungen eine entscheidende

Bedeutung für die Pathophysiologie der plazentaren Malaria (Matteelli *et al.*, 1997). Ursache dafür sind inflammatorische Infiltrate im intervillösen Raum infizierter Plazenten (Bulmer *et al.*, 1993a, 1993b; Ismail *et al.*, 2000). In einer Studie von Ordi *et al.* (1998) zeigte sich bei *P. falciparum*-infizierten Plazenten zu 17,6 % eine sogenannte Massive Chronische Intervillositis, bei Primigravidae sogar zu 77 %. Diese chronische Entzündungsreaktion führt zu Gewebsschädigungen wie z. B. zur Hypertrophie der Zytotrophoblasten, zu synzytialen Nekrosen und dem Verlust von Mikrovilli (Bulmer *et al.*, 1993a, 1993b; Ismail *et al.*, 2000). Ein Indikator für die vorliegende und auch für die stattgehabte plazentare Infektion ist das sogenannte Malariapigment oder Hämozoin, das als Nebenprodukt des Hämoglobinabbaus durch die Parasiten entsteht (Sullivan *et al.*, 2000).

### **1.2.2 Anämie in der Schwangerschaft**

Die Prävalenz der Anämie (Hb < 11 g/dl) in der Schwangerschaft ist besonders hoch in den Malariaendemiegebieten und ein Hauptrisikofaktor für die peripartale Mortalität (Menendez *et al.*, 2000a). Die Ätiologie der Schwangerschafts-assoziierten Anämie ist multifaktoriell. Mögliche Ursachen sind neben der physiologischen Hämodilution Mangelernährung (Eisen- und Folatmangel), sowie Hämoglobinopathien (Thalassämie, Sichelzellanämie), Infektionen mit Parasiten (Würmer, Malaria) und Viren (HIV) (Dreyfuss *et al.*, 2000; Menendez *et al.* 2000a). Eine Infektion mit *P. falciparum* ist in den Endemiegebieten eine der wichtigsten Ursachen für die mütterliche Anämie (Fleming *et al.*, 1989; Menendez *et al.*, 2000a).

### **1.2.3 Auswirkungen der mütterlichen Infektion auf das Neugeborene**

Ursächlich für die Beeinträchtigung des Neugeborenen sind hauptsächlich die mütterliche Anämie (Msolla *et al.*, 1997; Tako *et al.*, 2004) und die Funktionseinschränkung der infizierten Plazenta (Bulmer *et al.*, 1993b; Matteelli *et al.*, 1997; Moormann *et al.*, 1999; Rogerson *et al.* 2003). Eine Infektion mit *P. falciparum* während der Schwangerschaft erhöht das Risiko für das Auftreten von niedrigem Geburtsgewicht, intrauteriner Wachstumsretardierung und Frühgeburtslichkeit und damit die perinatale Sterblichkeit (Mc Gregor *et al.*, 1983; Brabin *et al.*, 1990a; Le Hesran *et al.*, 1997; Kulmala *et al.*, 2000; Menendez *et al.*, 2000b; Okoko *et al.*, 2002; Verhoeff *et al.*, 2004).

Bei einer plazentaren Malaria scheint außerdem der Transfer mütterlicher IgG-Antikörper auf das Kind reduziert zu sein, woraus eine erhöhte Infektionsanfälligkeit resultieren kann (Baird *et al.*, 1994; de Moares-Pinto *et al.*, 1998, Okoko *et al.*, 2001). So erkrankten Säuglinge im Alter

von 4-6 Monaten öfter an Malaria, wenn die Mütter in der Schwangerschaft mit *P. falciparum* infiziert waren (Le Hesran *et al.*, 1997). Möglicherweise erhöht das Vorliegen einer plazentaren Malaria sogar das Risiko einer kongenitalen Malaria- und HIV-Infektion (ter Kuile *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2007).

#### **1.2.4 Kongenitale Malaria**

Die Prävalenz kongenitaler Malaria in den Endemiegebieten südlich der Sahara wird sehr unterschiedlich beschrieben und variiert zwischen 0 und 37 %. Folgende Gründe werden für diese Varianz u. a. diskutiert: Es existieren keine eindeutigen Definitionskriterien für die kongenitale Malaria. In einigen Studien wurde Nabelschnurblut untersucht, während in anderen Untersuchungen peripheres Blut der Neugeborenen herangezogen wurde. Die Infektionen wurden in einigen Studien mittels PCR, in anderen mittels Mikroskopie nachgewiesen. Es ist außerdem schwierig zu differenzieren, ob eine Infektion kongenital ist oder kurz nach der Entbindung erworben wurde, wenn die Blutabnahme nicht unmittelbar postpartal erfolgte (Menendez *et al.*, 2007; Uneke, 2007).

Es scheint, dass die kongenitale Malaria in den endemischen Malariagebieten ein unterschätztes Problem ist und dass die transplazentare Übertragung der Parasiten auch bei semiimmunen Schwangeren häufiger ist, als bisher angenommen (Menendez *et al.*, 2007).

#### **1.3 Malariaprophylaxe in der Schwangerschaft**

Die WHO empfahl bereits 1986, dass schwangere Frauen in den Malaria-Endemiegebieten im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge eine antiparasitäre Chemoprophylaxe erhalten sollten (WHO, 1986). Das Experten-Komitee für Malaria der WHO betonte nochmals im Jahre 2000 die Notwendigkeit der Durchführung entweder einer antiparasitären Prophylaxe oder einer Präventivbehandlung während der Schwangerschaft (WHO, 2000). Diese Empfehlung wird durch viele Studien gestützt. So konnte in einer Metaanalyse von 16 Studien aus den Jahren 1964-2005 gezeigt werden, dass eine regelmäßig eingenommene antiparasitäre Chemoprophylaxe (verschiedene Wirkstoffe) oder eine intermittierende Präventivbehandlung bei Erst- und Zweitgebärenden mit einer reduzierten Prävalenz peripherer und plazentarer Parasitämien, niedrigeren Parasitendichten, weniger Fieberepisoden der Mütter, höheren mütterlichen Hämoglobinwerten, weniger Frühgeburtlichkeit, einem durchschnittlich höheren

Geburtsgewicht der Neugeborenen und niedrigeren perinatalen Mortalitätsraten assoziiert ist (Garner & Gulmezoglu, 2006).

In einem großen Teil der berücksichtigten Studien, die in Afrika durchgeführt wurden, wurde Chloroquin als Prophylaxe eingenommen. Neben Chloroquin spielen die Folatantagonisten eine zentrale Rolle in der antiparasitären Prophylaxe und Präventivtherapie. Zur intermittierenden Präventivtherapie wird die Folsäureantagonistenkombination Sulfadoxin-Pyrimethamin verwendet, während andere Folatantagonisten, wie Pyrimethamin und Proguanil einzeln oder in Kombination mit Chloroquin oder Dapson prophylaktisch eingesetzt wurden (Garner & Gulmezoglu, 2006).

Aufgrund der schnellen Resistenzentwicklung der Parasiten gegen die eingesetzten Malariamedikamente (WHO, 2001; Miller & Greenwood, 2002) wurde ihre lokale Wirksamkeit immer wieder geprüft. Ein Großteil der Studien, die die Effektivität der eingenommenen Prophylaxe bzw. Präventivtherapie untersuchten, wurden allerdings bis zum Ende der neunziger Jahre in Ostafrika durchgeführt (Newman *et al.*, 2006).

### **1.3.1 Folsäureantagonisten**

Während des zweiten Weltkrieges wurde zum ersten Mal sowohl die prophylaktische als auch die therapeutische Wirksamkeit eines Folsäureantagonisten (Proguanil) gegen Malariaparasiten entdeckt (Curd *et al.*, 1945). Auch über fünfzig Jahre später spielen die Folatantagonisten noch eine wichtige Rolle in der Prophylaxe, Präventivtherapie und Therapie von Malaria. Es werden zwei Klassen unterschieden. Die Folatantagonisten der Klasse I hemmen die Dihydropteroin-Synthetase, während die Folatantagonisten der Klasse II die Dihydrofolatreduktase hemmen. In Kombination wirken sie synergistisch (Nzila, 2006).

#### **1.3.1.1 Pyrimethamin**

Pyrimethamin, 2-4 Diaminopyrimidin, ist ein erstmals 1950 synthetisierter Folatantagonist (Falco *et al.*, 1951). Pyrimethamin hemmt kompetitiv die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und verhindert dadurch reversibel die Bildung von metabolisch aktiver Tetrahydrofolsäure, die wiederum essentiell für die DNA-Synthese der Parasiten ist. Es besitzt eine besonders hohe Affinität zur DHFR von Protozoen und wirkt insbesondere auf extraerythrozytäre Schizonten und Gametozyten, aber auch auf die erythrozytären Formen. Pyrimethamin wird gastrointestinal vollständig resorbiert und verteilt sich gut in allen Geweben. Ungefähr 80 % werden an

Plasmaeiweiß gebunden. Die durchschnittliche Halbwertszeit liegt bei ca. 4 Tagen. Die empfohlene prophylaktische Dosis in der Schwangerschaft beträgt 25 mg pro Woche (Forth, 1996). Die Angaben zur minimalen Hemmkonzentration von Pyrimethamin variieren zwischen 4-6 ng/ml (Edstein *et al.*, 1990) und 9,9 ng/ml (Smalley & Brown, 1982) für sensitive Erreger. Über die Effektivität von Pyrimethamin als alleinige Malaria-Prophylaxe in der Schwangerschaft existieren nur wenige Studien. Eine Studie von 1953 mit 14 nicht-schwangeren Probanden in Nigeria attestierte einer wöchentlichen prophylaktischen Dosis von 25 mg Pyrimethamin einen umfassenden antiparasitären Schutz (Sir Covell *et al.*, 1953). Morley untersuchte 1964 in Nigeria als erster die Effektivität von Pyrimethamin als Malaria-Prophylaxe in der Schwangerschaft. Die Frauen der Prophylaxegruppe, die 50 mg Pyrimethamin monatlich einnahmen, wiesen gegenüber der Kontrollgruppe weniger mikroskopisch feststellbare Parasitämien sowohl im peripheren Blut als auch in der Plazenta auf. Außerdem nahmen die Schwangeren mit Prophylaxe während der Schwangerschaft mehr an Gewicht zu und brachten durchschnittlich schwerere Kinder zur Welt als die Frauen ohne Prophylaxe. Allerdings berichtete Dodge bereits 1966 von Resistenzen gegen Pyrimethamin in Nigeria. Eine weitere Studie wurde von Nahlen *et al.* 1989 ebenfalls in Nigeria durchgeführt. Dort war Pyrimethamin wahrscheinlich aufgrund parasitärerer Resistenzen als alleinige antiparasitäre Prophylaxe in der Schwangerschaft, im Jahre 1988 nicht mehr effektiv. Mockenhaupt *et al.* fanden 1998 im Rahmen einer Vorstudie in der gleichen Studienregion in Ghana bereits gegen Pyrimethamin resistente Plasmodienstämme. Dennoch profitierten zumindestens die *Primigravidae* von der antiparasitären Prophylaxe mit Pyrimethamin und zeigten weniger periphere Parasitämien und geringere Parasitendichten (Mockenhaupt *et al.*, 2001).

#### **1.3.1.1.1 Pyrimethaminresistenz**

Die molekulare Grundlage der Pyrimethaminresistenz sind Punktmutationen im DHFR-Gen von *P. falciparum*. Die verminderte Wirkung von Pyrimethamin ist vor allen Dingen auf die Hauptmutation am Codon 108 zurückzuführen (Curtis *et al.*, 1996). Zusätzliche Mutationen am Codon 51, 59 und 164 verstärken diese Resistenz (Khan *et al.*, 1997). Über den Basenaustausch im DHFR-codierenden Gen wird ein Aminosäurewechsel verursacht der das aktive Zentrum der DHFR so verändert, dass die Affinität und Bindungsfähigkeit von Pyrimethamin an die parasitäre DHFR verloren geht (Delfino *et al.*, 2002). Die im Studiengebiet nachgewiesene Prävalenz der Hauptmutation am Codon 108 lag im Jahre 1998 bei 81 %. Eine Dreifachmutation (Codon 108, 51 und 59) des DHFR-Gens lag in 36 % der Fälle vor (Mockenhaupt *et al.*, 2001).



Zum Studienzeitpunkt im Jahre 2000 wurde von der ghanaischen Gesundheitsbehörde die wöchentliche Einnahme von 25 mg Pyrimethamin als antiparasitäre Prophylaxe in der Schwangerschaft weiterhin empfohlen, obwohl die Ergebnisse der zeitgleich festgestellten hochgradigen Pyrimethamin-Resistenz bereits vorlagen.

### **1.3.1.2 Sulfadoxin-Pyrimethamin**

Die Kombination aus den Folatantagonisten Sulfadoxin und Pyrimethamin (SP) nutzt deren synergistische Wirkung und hemmt sowohl die Dihydropteroin-Synthetase als auch die Dihydrofolatreduktase. Sulfadoxin hat wie Pyrimethamin eine Halbwertszeit von ca. 90 h. Wegen der teratogenen Nebenwirkungen des Sulfonamids wird SP bei Schwangeren nicht als kontinuierliche Prophylaxe verwendet, sondern nur ab dem 2. Trimester als intermittierende Präventivtherapie (IPT). Als IPT angewendet wird SP eine gute Verträglichkeit in der Schwangerschaft attestiert (Peters *et al.*, 2007). Die intermittierende Präventivtherapie beinhaltet mindestens zwei Gaben einer therapeutischen Dosis Sulfadoxin und Pyrimethamin im zweiten und dritten Schwangerschaftstrimester (WHO, 2004). In Gebieten mit hoher HIV-Inzidenz sollte eine monatliche Dosierung angestrebt werden (Parisie *et al.*, 1998; Filler *et al.*, 2006).

In Malawi wurde 1993 erstmals die Gabe von SP als intermittierende Präventivbehandlung in der Schwangerschaft durchgeführt und zeigte dort gute Erfolge (Schultz *et al.*, 1994). Trotz zunehmender Resistenzen gegen SP profitieren schwangere Frauen und ihre Neugeborenen in den Endemiegebieten nach wie vor von der Präventivbehandlung (Newman *et al.*, 2003; Garner & Gulmezoglu, 2006; ter Kuile *et al.*, 2007). Durch die Präventivbehandlung von asymptomatischen Individuen wird allerdings möglicherweise die Ausbreitung von Resistenzen gegen SP zusätzlich beschleunigt (O'Meara *et al.*, 2006).

### **1.3.1.3 Dapson, Proguanil und Chlorproguanil**

Proguanil und Chlorproguanil werden zu Chlorcycloguanil metabolisiert, das die Dihydrofolatreduktase von Plasmodien hemmt. Proguanil wurde als erster Folatantagonist zur antiparasitären Prophylaxe und Therapie eingesetzt (Curd *et al.*, 1945; Carrington *et al.*, 1951) und wurde seitdem einzeln oder in Kombination mit Chloroquin zur antiparasitären Prophylaxe auch in der Schwangerschaft angewendet (Mutabingwa *et al.*, 1993).

Dapson wurde 1908 als erster Folatantagonist im Rahmen der Entwicklung von Azofarbstoffen entdeckt (Fromm & Wittmann, 1908). Die Substanz ist ein Sulfon, das vergleichbar mit den Sulfonamiden die Folsäuresynthese auf der Stufe der Dihydropteroin-Synthetase hemmt (Nzila,

2006). In Kombination mit Pyrimethamin wurde es auch in der Schwangerschaft als antiparasitäre Prophylaxe verwendet.

### **1.3.2 Chloroquin**

Chloroquin ist ein 4-Aminochinolinderivat. Es wirkt über die Störung der obligaten Hämoglobininutilisation der mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten, indem es durch Komplexbildung mit dem anfallenden toxischen Ferriprotoporphyrin IX dessen Entgiftung hemmt. Die Akkumulation von Ferriprotoporphyrin IX führt dann schließlich zum Zelltod des infizierten Erythrozyten und damit auch des Parasiten (Ginsburg *et al.*, 1999). Es wird aus dem Gastrointestinaltrakt gut resorbiert. Die Plasmaeiweißbindung liegt bei 60 % und es reichert sich verstärkt in Erythrozyten, Leber, Niere, Milz, Iris und Choroidea an. Daher ist die Halbwertszeit von Chloroquin sehr lang und liegt bei etwa drei Wochen.

Chloroquin wurde über Jahrzehnte in den endemischen Malariagebieten besonders in Westafrika auch während der Schwangerschaft als Prophylaxe und Therapeutikum erster Wahl verwendet (Orton & Garner, 2005; Garner & Gulmezoglu, 2006; Newman *et al.*, 2006). Zusätzlich ist die unkontrollierte Selbstmedikation mit Chloroquin häufig (Foster, 1991; Akanbi *et al.*, 2005). Deswegen gibt es bereits seit zwanzig Jahren Chloroquin-resistente Parasitenstämme in jedem endemischen Malariagebiet südlich der Sahara (WHO, 1987). Dennoch zeigte Chloroquin prophylaktisch angewandt in mehreren Studien weiterhin positive Effekte. Das Risiko für mütterliche und fetale Anämie war reduziert, außerdem zeigten sich geringere periphere Parasitämien und ein durchschnittlich höheres Geburtsgewicht der Neugeborenen (Nyirjesy *et al.*, 1993; Cot, 1995 und 1998, Ndyomugenyi *et al.*, 2000). Eine neuere Studie von Sirima *et al.* (2003) aus Burkina Faso zeigte dagegen das Versagen von Chloroquin als Prophylaxe in der Schwangerschaft. Im Vergleich mit dem IPT mit SP war die Chemoprophylaxe mit Chloroquin deutlich unterlegen (Schultz *et al.*, 1994; Kayentao *et al.*, 2005).

### **1.3.3 Mefloquin**

Der genaue Wirkmechanismus von Mefloquin konnte noch nicht aufgedeckt werden. Das Center of Disease Control erklärte es 1990 für kontraindiziert als Prophylaxe in der Schwangerschaft aufgrund des teratogenen Risikos besonders im ersten Trimester (CDC, 1990). Dennoch testete Fleming Mefloquin als Malariaprophylaxe in der Schwangerschaft bei hoher Chloroquinresistenzrate in Nigeria (Fleming, 1990). Seitdem wurde Mefloquin als Prophylaxe ab

dem 2. Trimester in der Schwangerschaft hauptsächlich in Asien angewendet (Nosten *et al.*, 1994, 2000; Newman *et al.*, 2003).

#### **1.4 Maternofetaler Transfer von Chloroquin und Pyrimethamin**

Es existieren nur wenige Studien, die untersuchen, ob Chloroquin und Pyrimethamin diaplazentar von der Mutter auf den Fetus übertragen werden. In einer Studie zum Transfer von Chloroquin über die Plazenta bei Schafen wurden sehr niedrige Konzentrationen von Chloroquin bei den Feten gemessen und ein dementsprechend geringer Transfer konstatiert (Augustijns *et al.*, 1991). Im Rahmen einer semiquantitativen Analyse zur plazentaren Chloroquinübertragung beim Menschen ergaben sich fetale ChloroquinKonzentrationen (Urin und Blut) von ca. 50 % der mütterlichen Konzentrationen (Essien *et al.*, 1982). Wohingegen eine weitere Studie anhand von mütterlicher Blutkonzentration und den Spiegeln im venösen und arteriellen Nabelschnurblut eine annähernd hundertprozentige Chloroquinübertragung feststellte (Akintonwa *et al.*, 1988).

In einem *ex vivo* Plazentamodell zur Feststellung der diaplazentaren Pyrimethaminübertragung lag der Transfer auf den Fetus bei 38-80 %. Die maternofetale Transferrate war unabhängig von der Konzentration des Pyrimethamins im mütterlichen Blut (Peytavin *et al.*, 2000). Zwei Studien zum diaplazentaren Transfer von Pyrimethamin-Sulfadoxin fanden bei den Neugeborenen Konzentrationen zwischen 50 und 100 % der mütterlichen Konzentrationen (Dorangeon *et al.*, 1990; Trenque *et al.*, 1994). Beide Studien bezogen sich auf Dosierungen zur Toxoplasmaebehandlung.

Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, wie der Transfer der Antimalariamedikamente in der Plazenta stattfindet und in welchem quantitativen Verhältnis mütterliche und neonatale Spiegel stehen. Ob die Plazentagängigkeit antiparasitärer Prophylaxe einen Einfluss auf plazentare Parasitämien hat und ob die neonatalen Spiegel einen Effekt auf das Neugeborene haben, z. B. auf das Risiko einer kongenitalen *P. falciparum*-Infektionen, konnte ebenfalls bisher nicht geklärt werden.

## 1.5 Zielsetzung

Den protektiven Effekt einer antiparasitären Prophylaxe bzw. Präventivtherapie während der Schwangerschaft auf die Prävalenz und die klinische Manifestation einer Infektion mit *P. falciparum* haben verschiedene Untersuchungen belegt. Aufgrund der raschen Resistenzentwicklung gegen die gängigen Antimalaria-Medikamente ist es nötig, besonders auch ihre lokale Wirksamkeit in den verschiedenen Endemiegebieten regelmäßig zu überprüfen. Die vorliegende Studie hat das Ziel, die Effekte der Pyrimethaminprophylaxe im Kontext der zeitgleich festgestellten hohen Pyrimethaminresistenz zu untersuchen.

Dafür sollen zuerst die Prävalenz und die Manifestation der plazentaren Infektion mit *P. falciparum* bei Schwangeren in einem holoendemischen Malariagebiet in Ghana dargestellt werden. In einem nächsten Schritt soll der Zusammenhang verschiedener Faktoren wie Alter, Herkunft, Bildungsniveau, Teilnahme an der Schwangerenvorsorge und die Anzahl bisheriger Schwangerschaften mit dem Nachweis von Pyrimethamin im Blut der Probandinnen erfasst werden. Anschließend wird überprüft werden, inwieweit vorhandene Medikamentenspiegel bei den schwangeren Probandinnen einen Effekt auf die Prävalenz der plazentaren Infektion mit *P. falciparum*, die plazentaren Parasitendichten und die Anämie haben und welchen Einfluss die mütterlichen Medikamentenspiegel auf die Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht, Frühgeburtlichkeit und kongenitaler Malaria nehmen.

Außerdem soll analysiert werden, in welchem quantitativen Verhältnis die maternofetale Übertragung von Pyrimethamin und Chloroquin stattfindet. Weiterhin soll geklärt werden, inwieweit plazentare Malaria das Übertragungsverhältnis verändert und ob ein Zusammenhang mit dem Auftreten kongenitalen *P. falciparum*-Infektionen existiert. Es gibt bisher nur wenige Untersuchungen zur quantitativen und zur qualitativen Einordnung der maternofetalen Übertragung antiparasitärer Chemoprophylaktika.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Kontrollmaßnahmen gegen Malaria in der Schwangerschaft sowohl in der untersuchten Region als auch in vergleichbaren Endemiegebieten zu optimieren. Eine effektive resistenzgerechte antiparasitäre Chemoprophylaxe bzw. Präventivtherapie kann die Prävalenz und die Manifestation der Malaria in der Schwangerschaft vermindern und damit auch die perinatale Sterblichkeit reduzieren.

## 2 Probanden, Material und Methoden

### 2.1 Studiengebiet

Ghana liegt in Westafrika am Golf von Guinea etwa 7° nördlich des Äquators. Begrenzt von seinen Nachbarstaaten Elfenbeinküste, Burkina Faso und Togo erstreckt es sich auf eine Fläche von ca. 230.000 km<sup>2</sup>. Die 18 bis 20 Millionen Einwohner Ghanas setzen sich aus verschiedenen Völkern und ethnischen Gruppen zusammen. Den größten Bevölkerungsanteil stellt der Stamm der Akan. Ghanas Klima ist tropisch mit zwei Regenzeiten im Süden (Mai/Juni und Oktober/November) und einer im Norden (Juli-September).

Abbildung 2.1.1 Karte von Ghana



Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden am Presbyterian Mission Hospital in Agogo, Ashanti Akim North District durchgeführt (Gebiet markiert mit einem Stern in der Abbildung 2.1.1). Das 1931 von der Baseler Mission gegründete Krankenhaus stellt für die 132.000 Einwohner der Region das wichtigste Zentrum medizinischer Versorgung dar. Malaria wird im District Health Report von 1998 als häufigster Grund für eine klinische Einweisung genannt. Eine Vorstudie im Herbst 1998 zeigte, dass 64 % der Schwangeren, die die Schwangerschaftsvorsorge besuchten, mit *P. falciparum* infiziert waren (Mockenhaupt *et al.*, 2000a). Die Ashanti-Region ist hyper- bis holoendemisch für Malaria (Browne *et al.*, 2000).

## **2.2 Studiengruppe**

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes zu „Malaria in der Schwangerschaft und im ersten Lebensjahr“ des Instituts für Tropenmedizin in Berlin, der University of Science and Technology in Kumasi und dem Presbyterian Mission Hospital in Agogo wurden vom 24. Januar 2000 bis zum 24. Januar 2001 Proben von 893 Müttern, deren Plazenten und Neugeborenen gesammelt. Jede Frau, die zur Entbindung ins Agogo Hospital kam, wurde von einer Hebamme in der lokalen Stammsprache über Ziele und Bedingungen der Studie aufgeklärt und um ihre Teilnahme gebeten. Das Einverständnis zur Teilnahme an der Studie wurde durch Unterschrift oder Daumenabdruck dokumentiert. Mutter, Plazenta und Kind erhielten eine gemeinsame Studiennummer. Daten von Probandinnen und Neugeborenen, die um den Geburtstermin herum verstarben, sowie Zwillingsgeburten wurden nicht in die Studie aufgenommen. Probandinnen, die eine Körpertemperatur von mehr als 37,5 °C oder einen Hb < 11 g/dl hatten, wurden einem Arzt vorgestellt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der School of Medical Sciences, University of Science & Technology, Kumasi, Ghana genehmigt.

## **2.3 Datenerhebung, Blutentnahme und Materialgewinnung**

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Untersuchungen in Agogo von April bis August 2000 durch die Verfasserin und eine weitere Doktorandin vorgenommen. Außerdem erfolgte die Auszählung von ca. 600 „Dicken Tropfen“ durch die Verfasserin anschließend in Berlin. Die mikroskopische Untersuchung der plazentaren Präparate erfolgte durch Herrn PD Dr. F. P. Mockenhaupt. Die Konzentration von Chloroquin und Pyrimethamin im Blut wurde mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) von Dr. T. A. Eggelte unter Beteiligung der Verfasserin am Department of Clinical Pharmacology, Academic Medical Center, University of Amsterdam bestimmt. Alle anderen Daten und Befunde wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. F. P. Mockenhaupt zur Verfügung gestellt.

### **2.3.1 Mutter**

Die Hebammen des Agogo Hospital dokumentierten für jede Schwangere auf einem Fragebogen Größe und Gewicht, Alter, Bildungsstand und Beruf sowie Gestationswoche und Parität. Außerdem wurden die Einnahme von Medikamenten und die Anzahl der wahrgenommenen Vorsorgeuntersuchungen während der Schwangerschaft festgehalten. Der Geburtsverlauf wurde in die Kategorien spontan versus *Sectio caesaria* und kompliziert versus unkompliziert eingeteilt

und dokumentiert. Die axilläre Temperatur wurde gemessen und klinische Daten wie Ikterus und Ödeme wurden erfasst. Innerhalb von sechs Stunden prä- oder postpartal wurden von den Hebammen 8 ml venöses Blut aus der *Vena cubitalis* entnommen. Zumeist erfolgte die Weiterverarbeitung der Proben sofort, ansonsten wurden sie für maximal 24 Stunden bei + 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### **2.3.2 Plazenta**

Die Plazenten wurden entweder sofort nach Expulsion oder nach maximal sechs Stunden Lagerung im Kühlschrank bei + 4 °C untersucht. Folgende Daten und Materialien wurden gewonnen:

1. Ermittlung des Plazentarohgewichts inklusive Nabelschnur und Amnionhülle
2. Inspektion der Plazenta- und Nabelschnurmorphologie, wobei vor allem auf Kalkherde, Mekoniumablagerungen, Ödeme und Formanomalien geachtet wurde
3. Messung der Breite, Höhe und Länge der Plazenta und der Länge der Nabelschnur
4. Plazentablutgewinnung: Dieser Schritt wurde vor der Abtrennung von Nabelschnur und Amnionhülle durchgeführt, um die Vermengung von plazentarem und Nabelschnurblut zu vermeiden. Zur Blutgewinnung wurden oberflächliche Koagel entfernt und mit einem Plazentamesser eine parazentrale Inzision von 2 cm Tiefe und 4 cm Länge gesetzt, das Blut in den Schnitt ausgestrichen, mit einer Injektionsspritze aufgesogen und in eine EDTA-Röhrchen (mindestens 2,5 ml) gegeben.
5. Ermittlung des Plazentanettogewichtes nach Entfernen von Nabelschnur und Amnionhülle
6. Plazentamaterialgewinnung: Für spätere histologische Beurteilungen des Plazentagewebes wurden parazentral zwei Gewebeblöcke (2 cm x 2 cm x Höhe der Plazenta), zwei Proben der Amnionhülle sowie zwei Nabelschnurstücke (plazentanah/plazentafern) mit einer Schere herausgeschnitten. Alle Proben wurden zusammen in einer 4 % Formalinlösung konserviert und bei Raumtemperatur bis zum Transport nach Deutschland gelagert. Außerdem wurde für molekularbiologische Untersuchungen an fünf verschiedenen Stellen Plazentagewebe (ca. 0,5 cm<sup>3</sup>) entnommen und in einem Citrat-Röhrchen bei -20 °C aufbewahrt.

Alle ermittelten Daten wurden auf einem Plazentabegleitbogen des Pathologischen Instituts der Charité Universitätsklinik zu Berlin dokumentiert.

### 2.3.3 Neugeborenes

Unmittelbar nach der Geburt wurden von den Hebammen bei jedem Neugeborenen nach 1, 5 und 10 Minuten die APGAR-Werte (Apgar *et al.*, 1958) dokumentiert, sowie das Geburtsgewicht mit einer Handwaage ermittelt. Zwischen 12 und 24 Stunden *post partum* wurden die Neugeborenen klinisch untersucht, initial unter Anleitung der Kinderärztin C. v. Gärtner. Der erhobene Status beinhaltete die Messung der axillären Temperatur, der Körperlänge und des Kopfumfanges mit einem Maßband. Die Bestimmung des Gestationsalters erfolgte anhand von sieben verschiedenen Reifekriterien nach Finnström *et al.* (1977): Für die einzelnen Kriterien werden Punkte vergeben. Beurteilt werden die Transparenz der Haut, die Festigkeit des Ohrmuschelknorpels, das Ausmaß plantarer Hautfalten, die Größe des Brustdrüsengewebes, die Brustwarzenbildung, das Wachstum der Daumenfingernägel und die Beschaffenheit des Kopfhaares. Aus dem Gesamtpunktwert wurde dann das Gestationsalter abgeleitet. Anschließend wurde bei jedem Neugeborenen 2 ml venöses Blut aus dem *Rete venosum dorsalis manus* abgenommen und in ein EDTA-Röhrchen gefüllt.

### 2.4 Bestimmung der Parasitämien mittels Mikroskopie

Zur Bestimmung der Parasitendichten wurden von jeder Blutprobe (Mutter, Plazenta und Neugeborenes) zwei „Dicke Tropfen“ angefertigt. Eine Menge von 5 µl EDTA-Blut wurde dafür mit einer Eppendorf-Pipette auf einen Objektträger appliziert und mit der Pipettenspitze auf einer ca. 1,5 cm<sup>2</sup> großen Fläche verteilt. Die Präparate wurden luftgetrocknet und eines anschließend sofort gefärbt, während das zweite bis zum Transport nach Berlin bei Raumtemperatur gelagert und erst dort gefärbt wurde. Zum Färben wurden die unfixierten Präparate für 20-30 Minuten in eine 4 % (v/v) Giemsa in Titrisol-Pufferlösung mit einem pH von 7,2 (Merck) gelegt, anschließend abgespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Die mikroskopische Beurteilung der gefärbten „Dicken Tropfen“ erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Wilozyt, Will, Wetzlar) bei eintausendfacher Vergrößerung unter einem Ölimmersionsobjektiv. Wenn klinische Symptome bestanden, die auf eine Infektion mit *P. falciparum* hindeuteten, wurden die Präparate sofort mikroskopisch untersucht. 10 % der Präparate wurden zufällig ausgewählt, um von einem zweiten Untersucher beurteilt zu werden. Kam es zu abweichenden Ergebnissen, wurden diese korrigiert. Zur Beurteilung der Parasitämien von Mutter und Kind wurde die Zahl asexueller Parasiten pro 500 gezählter Leukozyten festgestellt. Die Parasitendichten wurden als Parasiten pro µl Blut aus der Zahl der Leukozyten pro µl Blut errechnet. Die plazentaren Parasitendichten wurden aus der Anzahl der asexuellen Parasiten pro 100 Blickfelder ermittelt. Außerdem wurde



die Anwesenheit von Malaria-Pigment in den Leukozyten der Plazentapräparate dokumentiert. Eine anschließende Kategorisierung der mikroskopischen Befunde der Plazentapräparate erfolgte nach Fried *et al.* (1998) in vier Gruppen. Diese Einteilung basiert auf einer histologischen Klassifikation für plazentare Malaria nach Bulmer *et al.* (1993a). Folgende Kategorien werden danach unterschieden:

I: keine Infektion: keine Parasiten und kein Pigment nachweisbar

II: chronische/abgelaufene Infektion: keine Parasiten aber Pigment nachweisbar

III: akut-chronische Infektion: Parasiten und Pigment vorhanden

IV: akute Infektion: kein Pigment, nur Parasiten nachweisbar

Diese Kategorien wurden im Folgenden in modifizierter Form verwendet, indem die Kategorie III sowohl der Gruppe II als auch der Gruppe IV zugeordnet wurde, so dass Schwangere ohne nachweisbare plazentare Infektion zum einen den Schwangeren mit akuter Infektion und zum anderen denjenigen mit chronischer Infektion gegenübergestellt werden konnten.

## **2.5 Bestimmung der hämatologischen Parameter**

Die Bestimmung des Hämoglobinwertes von Mutter und Kind erfolgte direkt nach der Blutentnahme mittels eines Schnelltests. Für diesen Test wurden 15 µl Blut in eine Küvette aufgesogen, und diese dann in ein HemoCue® Photometer eingelegt (von Schenk *et al.*, 1986). Die tägliche Überprüfung des Gerätes wurde mit einer vom Hersteller mitgelieferten Eichküvette vorgenommen.

Die Messung von Hämatokrit, Erythrozyten- und Leukozytenzahl sowie des mittleren korpuskulären Volumens (MCV) und der mittleren korpuskulären Hb-Konzentration (MCH) erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Abnahme mittels eines halbautomatischen Zellzählgerätes (HC555, Clinicon, Mannheim). Die Bestimmung dieser Werte funktioniert nach folgendem physikalischen Prinzip: Ein nach Protokoll gefertigter Ansatz einer Blutsuspension wird durch eine Kapillare definierten Durchmessers gepumpt. Das Gerät misst die Änderung des Strömungswiderstandes, die abhängig von den passierenden Partikeln (Erythrozyten und Leukozyten) ist. Die Größe der Widerstandsänderung ist proportional zum Volumen der passierenden Partikel und ermöglicht die Bestimmung von Erythrozyten- und Leukozytenzahl. Der Mittelwert der ermittelten Einzelvolumina entspricht dem MCV. Die Summe der Einzelvolumina bezogen auf das Gesamtvolumen ergibt das Gesamtpartikelvolumen, den

Hämatokrit. Die Messung der Erythrozytenzahl schließt die Leukozytenzahl als zu vernachlässigende Quantität mit ein. Um die Leukozytenzahl zu bestimmen, werden die Erythrozyten durch Zugabe eines cyanidhaltigen Reagenz lysiert, so dass nur noch die Leukozytenkerne in der Suspension verbleiben. Diese hämolysierte Suspension wird auch für die photometrische Messung des Hämoglobinwertes verwendet. Aufgrund von klimabedingter Kondenswasserbildung in der photometrischen Messapparatur wurden die mit dem Zellzählgerät ermittelten Hb-Werte nicht verwendet. Das Gerät wurde täglich nach den Vorgaben des Herstellers kalibriert und gereinigt. Für die Messansätze wurden 10 ml isotonischer Verdünnungslösung mit 40 µl EDTA-Blut versetzt und gut durchmischt. Wiederum 40 µl dieser Stammsuspension wurden in 10 ml isotonischer Lösung verdünnt. Dieser Ansatz diente der Bestimmung von Erythrozytenzahl, Hämatokrit, MCV und MCH. Zur Messung der Leukozytenzahl wurden diesem Ansatz 6 Tropfen Hämoglobin Lysing Reagenz (Clinicon) beigelegt.

## 2.6 Extraktion von DNA

Von jeder EDTA-Blutprobe wurde ein stabilisiertes Aliquot angefertigt. Dafür wurden 90 µl Erythrozytensediment zu 270 µl eines 2:1-Gemisches aus einem Guanidiniumhydrochlorid enthaltenden Puffer (AS 1, Quiagen) und einem PBS-Puffer (phosphate buffered saline) in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Dadurch können die Proben auch ohne Kühlung problemlos bis zu 3 Monate gelagert werden.

Für die nachfolgend beschriebene Polymerase-Ketten-Reaktion ist es nötig, genomische DNA aus den stabilisierten Blutproben zu extrahieren. Zuerst werden die Zellen durch Proteinkinase-K lysiert. Dann macht man sich die Eigenschaft der Nukleinsäuren zunutze, sich in Anwesenheit der chaotropen Substanz Guanidiniumhydrochlorid an Silikatmoleküle zu binden. Nach mehreren Waschschritten mit alkoholischen Lösungsmitteln erfolgt die Elution der DNA in wässrige Lösung (Gillepsie & Hardman, 1979). Für das Verfahren das QIAmp Blood wurde Kit (Quiagen, Hilden) angewendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers. Es lagen keine Konzentrationsangaben der verwendeten Substanzen vor.

Lyse-Puffer (AL): wässrige Lösung von Guanidiniimhydrochlorid

Proteinkinase-K: aus *Titrachium album* (1,1 g/ml)

Waschpuffer (AW): ethanolische Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCL

Elutionspuffer (AE): wässrige Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCL

Zuerst wurden die Proben bei 56 °C für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde absolutes Ethanol hinzugemischt. Diese Mischung wurde in mit Silikatfiltern versehene Zentrifugationssäulen mit Auffanghülsen (Microspin columns, Quiagen, Hilden) gegeben und mit 8000 Umdrehungen pro Minute (UpM) eine Minute lang zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Anschließend folgten zwei Waschgänge durch Zugabe von jeweils 500 µl Waschpuffer, eine weitere Zentrifugation bei 8000 UpM für eine Minute und wiederum das Verwerfen des Filtrates. Die Elution der an den Silikatfilter gebundenen Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer oder 10 nM Tris-HCL (pH 9,0), anschließender fünfminütiger Inkubation bei 70 °C und Zentrifugation bei 8000 UpM für eine Minute erreicht. So konnten aus jeder Probe etwa 6 bis 10 µl genomische DNA gewonnen werden.

## **2.7 Nachweis einer *P. falciparum*-Infektion mittels PCR**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, engl.: Polymerase Chain Reaction) ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis kleinster Mengen genetischen Materials (Saiki *et al.*, 1985). Ein Stück doppelsträngige DNA, das die nachzuweisende Gensequenz enthält, fungiert als Matrize. In repetitiven Reaktionsschritten wird die gesuchte Sequenz exponentiell vervielfältigt (amplifiziert). Initial erfolgt eine Denaturierung des DNA-Doppelstranges zu einzelsträngiger DNA bei 95-99 °C. Anschließend binden synthetische Oligonukleotide (Primer) nach Temperaturabsenkung an die komplementären Abschnitte der DNA. Die Primer flankieren damit die nachzuweisende Gensequenz. Von den doppelsträngigen DNA-Sequenzen (Primer + gesuchte Sequenz) ausgehend synthetisiert eine beigefügte DNA-Polymerase unter Verbrauch von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) einen zu der gesuchten Sequenz komplementären Strang. Dafür ist es nötig, die Temperatur auf das Syntheseoptimum der thermostabilen Polymerase anzuheben. Die Polymerase ist zumeist aus *Thermophilus aquaticus* gewonnen: Taq-Polymerase. Die Reaktionsschritte werden zwischen 25 und 50 Mal wiederholt, wobei das jeweils entstandene Produkt als Substrat für die nachfolgende Amplifikation dient, so dass die Menge der nachzuweisenden DNA-Sequenz exponentiell anwächst. Abschließend wird ein letzter Reaktionsschritt mit der Polymerase durchlaufen, in dem kein neuer DNA-Abschnitt entsteht, sondern die Komplementierung unvollständig synthetisierter DNA-Stränge erfolgt. Die vorliegende PCR-Diagnostik wurde auf den Grundlagen des Protokolls der Erstbeschreiber der

PCR Saiki *et al.* (1985) und nach den speziellen Ausführungen von Snounou *et al.* (1993) zur PCR-Diagnostik von *P. falciparum*-Infektionen durchgeführt. Die Primer wurden nach Vorlage der Nukleotidsequenz von dem Anbieter MWG biotech gefertigt. Die Taq-Polymerase (5000 U/ml), das dNTP-Gemisch (Ultrapure dNTP Set) und der Reaktionspuffer (50 mM KCL + 1,5 mM MgCl<sup>2</sup> + 10 mM Tris-HCL: pH 9,0) wurden von der Firma Pharmacia bezogen.

Der Nachweis einer *Plasmodium*-Infektion erfolgte in zwei hintereinander geschalteten PCR-Durchgängen. Im ersten Durchgang, der sogenannten „outer“ PCR, wird ein für die Gattung *Plasmodium* spezifisches Gen amplifiziert, das für die Ribonukleinsäure der kleinen Untereinheit der parasitären Ribosomen codiert (ssrRNA-Gen). Im zweiten Durchgang, der „nested“ PCR, wird das entstandene Amplikon als Matrize für die Amplifizierung von *P. falciparum*-spezifischen Bereichen des ssrRNA-Gens verwendet. Die beiden PCR-Ansätze unterscheiden sich nur in der Primersequenz. Zur Amplifikation des *Plasmodium* spezifischen Gens dienten die Primer: rPUL5 (5'- CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC – 3') und rPUL6 (5'- TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG – 3'). In einem Volumen von 50 µl Reaktionspuffer (500 mM dNTP + rPUL5 und 6 + 1,5 U Taq-Polymerase) erfolgte die Amplifikation. Als Matrize wurde 0,5 µl DNA verwendet, das entspricht 50 ng bei einer Konzentration von 100 ng/µl. Als Reaktionsbehältnis kam ein PCR-Röhrchen mit Stempel-Deckel (Safecup, Sarstedt) zur Anwendung. Die zyklische Amplifikation erfolgte in einem automatischen PCR-Gerät (Triothermoblock, Biometra) in folgenden Schritten:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten
2. 25 Zyklen von:
  - Denaturierung bei 94 °C für 1 Minute
  - Primeranlagerung bei 58 °C für 2 Minuten
  - Extension bei 72 °C für 2 Minuten
3. Abschließende Extension bei 72 °C für 5 Minuten

Der Reaktionsansatz, die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien und die Temperatureinstellungen entsprachen bei der „nested“ PCR den Bedingungen der „outer“ PCR. Ein Volumen von 0,5 µl des Reaktionsproduktes der „outer“ PCR wurde für die „nested“ PCR als Matrize für die Amplifikation der speziesspezifischen Abschnitte des ssrRNA-Gens benutzt. Für *P. falciparum* kamen die Primer: rFAL1 (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3') und rFAL2 (5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3') zur Anwendung. Die hergestellten DNA-Fragmente von 205 bp Länge wurden anschließend in der Agarose-Gel-Elektrophorese dargestellt.

## 2.8 Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Moleküle

DNA-Fragmente sind durch ihre Aminogruppen negativ geladen, deshalb wandern sie in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Diese Eigenschaft macht man sich in der Agarose-Gel-Elektrophorese zunutze. Die DNA-Fragmente wandern bei anliegender Spannung durch die Poren eines Agarose-Gels hindurch, wobei größere Fragmente stärker in ihrer Mobilität behindert werden als kleinere. Auf diese Weise kommt es zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe, die anhand von mitlaufenden DNA-Standards bekannter Basenpaarlänge abgeschätzt werden kann. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird dem Agarose-Gel Ethidiumbromid beigelegt, das mit der DNA interkaliert und unter ultraviolettem Licht fluoresziert. Der Anteil von Agarose an der Gelmatrix, die anliegende Spannung und der Zeitraum, in dem das elektrische Feld besteht, beeinflussen die Trennschärfe dieser Untersuchungsmethode. Die Durchführung der Gel-Elektrophorese erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Sharp *et al.* (1973).

Verwendete Substanzen:

- 1x TBE-Laufpuffer: 90 mM Tris-Base (pH 9,0), 90 mM Borsäure, 2mM Na<sup>2</sup>-EDTA, autoklaviert
- Ethidiumbromid-Lösung (Boehringer Mannheim): Ethidiumbromid 10 mg/ml
- Blaumarker: 0,25 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylen Cyanol FF, 40 % Glycerol
- standardisierte DNA-Molekulargewichtsmarker (Boehringer Mannheim): V:*Bgl*I-geschnittenes Plasmid pBR322 und *Hin*fl-geschnittenes Plasmid pBR322

Zur Herstellung eines 1,5 % Agarose-Gels wurden 0,7 g Agarose in 40 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt. In die Taschen des erkalteten Gels wurden 7 µl des PCR-Produkts zusammen mit 0,8 µl Blaumarker pipettiert. Parallel dazu wurden die standardisierten DNA-Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Minigelkammer (Biorad) mit einer Spannung von 8 V/cm 20 Minuten lang durchgeführt. Anschließend konnten im durchscheinenden UV-Licht fluoreszierende Banden dargestellt werden. Diese wurden auf Polaroidfotos dokumentiert.

## **2.9 Bestimmung von Chloroquin und Pyrimethamin**

Die Bestimmung der Pyrimethamin- und Chloroquinkonzentrationen erfolgte mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) aus Plasmaproben (Eggelte, 1990). Diese waren in Ghana durch Zentrifugation gewonnen und bei -20 °C gelagert worden. Der Transport nach Berlin und weiter nach Amsterdam erfolgte auf Trockeneis. Für den ELISA werden spezifische, gegen das zu bestimmende Antigen gerichtete Antikörper an ein Trägermaterial (z. B. Polyesterol) gebunden. Nach Inkubation mit der Probe bilden sich Immunkomplexe, an die sich anschließend zugefügte Enzym-markierte Anti-Antikörper anlagern. Durch das Zufügen eines Substrates, das mit dem Enzym reagiert, entsteht eine Farbreaktion, die eine sehr genaue photometrische Messung ermöglicht.

Die Konzentrationsbestimmung von Pyrimethamin richtete sich nach folgendem Protokoll: Verwendet wurden monoklonale F130-3 Pyrimethamin-Antikörper. Mikrotiterplatten (96-Loch) wurden mit 100 µl einer F130-3-Verdünnung (1:10.000) beschichtet. Anschließend wurden jeweils zweimal 50 µl einer 1:10-Verdünnung jeder gesammelten Plasmaprobe auf die Mikrotiterplatten aufgebracht. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 1:100.000-Verdünnung des Pyrimethamin-Antikörpers. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur und einem anschließenden Waschschrift wurde Tetramethylbenzidin-Peroxidase hinzugegeben. Nach neuerlicher Inkubation für 15-30 Minuten im Dunkeln wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) unterbrochen und anschließend konnte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Titertek, Flow Laboratories) die optische Dichte bei 450 nm ermittelt werden. Für jede Mikrotiterplatte wurde parallel eine Kalibrierungskurve mit Pyrimethamin-Standardlösungen in serieller Verdünnung erstellt. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Hemmung der optischen Dichte im Vergleich zum Standard dargestellt und anhand der Kalibrierungskurven konnte so die jeweilige Pyrimethaminkonzentration der Proben abgeleitet werden.

Analog wurde die Konzentrationsbestimmung von Chloroquin durchgeführt: Mikrotiterplatten (96-Loch) wurden mit 100 µl einer 1:10.000-Verdünnung des monoklonalen Chloroquin-Antikörpers F 149-12 beschichtet. Anschließend wurden jeweils zweimal 50 µl einer 1:10-Verdünnung jeder gesammelten Plasmaprobe auf die Mikrotiterplatten aufgebracht. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 1:75.000-Verdünnung des Chloroquin-Antikörpers. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur und einem anschließenden Waschschrift wurde Tetramethylbenzidin-Peroxidase hinzugegeben. Nach neuerlicher Inkubation für 15-30 Minuten im Dunkeln wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) unterbrochen und anschließend konnte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Titertek, Flow Laboratories) die optische Dichte bei 450 nm ermittelt werden. Für jede Mikrotiterplatte wurde parallel eine Kalibrierungskurve mit Chloroquin-Standardlösungen in serieller Verdünnung erstellt. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Hemmung der optischen Dichte im Vergleich zum Standard dargestellt und anhand der Kalibrierungskurven konnte so die jeweilige ChloroquinKonzentration der Proben abgeleitet werden.

## 2.10 Statistische Berechnungen

Alle durchgeführten statistischen Analysen basieren auf den theoretischen Grundlagen nach Clauß *et al.* (1999) und Guggenmoos-Holzmann & Wernecke (1995). Die Berechnungen wurden mit den Programmen Statview (SAS), EpiInfo (CDC) und Excel (Microsoft) durchgeführt.

Assoziationen zwischen nominalen Variablen wurden mittels Mehrfelder-Kontingenztests auf ihre Heterogenität geprüft. Zunächst wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  formuliert. Bei Zutreffen der Nullhypothese waren die Merkmale voneinander unabhängig. Traf die Nullhypothese nicht zu, so bestand ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen. Die Häufigkeit der Merkmalsassoziationen wurde anhand des  $\chi^2$ -Tests in Vier- oder Mehrfeldertafeln analysiert. Wenn im  $\chi^2$ -Test signifikante Abweichungen der beobachteten Häufigkeiten von den zu erwartenden Werten gefunden wurden, wurde als Maß für die Stärke der Assoziation der Merkmale die *Odds Ratio* bestimmt. Die *Odds Ratio* beschreibt die Wahrscheinlichkeit innerhalb eines Konfidenzintervalls von 95 %, mit der eine Merkmalsausprägung in einer Stichprobe auftritt bzw. nicht auftritt. Bei Merkmalen, deren Ausprägungen in logischer Reihenfolge standen (z. B. Parität), wurde zur Überprüfung eventueller signifikanter Unterschiede der  $\chi^2$ -Test für *Trend* herangezogen.

Assoziationen zwischen normalverteilten stetigen Variablen wurden mit dem *t-Test nach Student* analysiert. Bei nichtparametrischen stetigen Variablen kam der *U-Test nach Mann-Whitney* zur Anwendung. Dieser verteilungsunabhängige Rangtest basiert auf dem *Wilcoxon-Test* für unabhängige Stichproben. Wurden mehrere unabhängige Stichproben miteinander verglichen, so wurde der *Kruskall-Wallis-Test (KWT)* angewandt, der eine Verallgemeinerung des *U-Tests* darstellt. Für alle Testverfahren wurde wiederum die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  formuliert.

Für die multivariate Analyse wurde ein logistisches Regressionsmodell benutzt. Es wurden dabei nur unabhängige Variablen berücksichtigt, die in der univariaten Analyse signifikant mit dem abhängigen Merkmal assoziiert waren. Die so ermittelte *Odds Ratio* beschreibt die

Wahrscheinlichkeit, mit der eine unabhängige Variabel mit dem abhängigen Merkmal assoziiert ist unter Berücksichtigung anderer unabhängig assoziierter Variablen (z. B. Risikofaktoren für mütterliche Anämie).

Der Grad des linearen Zusammenhanges zwischen den mütterlichen und neonatalen Medikamentenspiegeln wurde als *Spearman'scher Korrelationskoeffizient*  $r$  für metrisch skalierte Variablen ohne Normalverteilung angegeben. Der Wertebereich von  $r$  erstreckt sich über  $-1 \leq r \leq 1$ , wobei für  $r$ -Werte  $> 0$  eine positive Korrelation bzw. eine direkte Proportionalität und für  $r$ -Werte  $< 0$  eine indirekte Proportionalität bzw. negative Korrelation besteht. Aus dem Korrelationskoeffizienten  $r$  wurde dann mittels Fisher Transformation ein  $p$ -Wert abgeleitet. Die Nullhypothese wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  formuliert.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Studiengruppe

Vom 24. Januar 2000 bis zum 24. Januar 2001 wurden insgesamt 893 schwangere Frauen, ihre Plazenten und Neugeborenen untersucht, wovon 770 in die vorliegende Studie aufgenommen wurden. Die Frauen wurden im Rahmen der Schwangerenvorsorge und der Entbindung im Agogo Presbyterian Mission Hospital betreut. Die in diesem Zeitraum aufgetretenen Zwillingsgeburten ( $n = 28$ ) und peripartalen Todesfälle ( $n = 22$ ) wurden nicht in die Studie einbezogen, da ihre Werte bezüglich des Auftretens von Anämie, Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht deutlich von den Einlingsgeburten abwichen bzw. nicht erhoben wurden. Weitere 73 Frauen konnten aufgrund von fehlendem oder nicht-verwertbarem Probenmaterial zur Messung der Medikamentenspiegel nicht eingeschlossen werden. Für alle anderen untersuchten Parameter liegen nahezu vollständige Datensätze vor. Fehlende Werte sind in den folgenden Berechnungen durch die Angabe der jeweiligen Gesamtheiten gekennzeichnet. Die Probandinnen wurden nach Anzahl ihrer Schwangerschaften in drei Gruppen unterteilt: *Primigravidae* (P1,  $n = 280$ ), *Gravidae* mit zwei und drei Schwangerschaften (P2&3,  $n = 289$ ) und *Gravidae* mit vier und mehr Schwangerschaften ( $P \geq 4$ ,  $n = 201$ ). Die Kenndaten der Schwangeren sind in Tabelle 3.1.1 zusammengefasst. Die Gebärenden waren durchschnittlich 26 Jahre alt, wobei die älteste 47 Jahre und die jüngste 15 Jahre alt war. Das Alter stieg mit zunehmender Schwangerschaftszahl an [ $p_{t-Test} < 0,0001$ ]. Mit 70,8 % (539/761) hatte der größte Anteil der Frauen die Grundschule besucht. Weitere 12,2 % (93/761) hatten die Mittelschule absolviert und 1,6 % (12/761) die Hochschulreife erreicht. Keine Schulausbildung hatten 15,4 % (117/761) der Frauen. Das Bildungsniveau fiel mit zunehmender Schwangerschaftszahl [ $p_{KWT} < 0,0001$ ]. Die durchschnittliche Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge lag bei vier Terminen, die häufigste bei zwölf und die geringste bei einem Termin. Nur 3,9 % (29/752) der Schwangeren nahmen das Angebot der Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchung nicht wahr. Nur zwanzig Frauen hatten bei Aufnahme Fieber (Temperatur  $\geq 37,5^\circ\text{C}$ ). Bei rund einem Drittel der Frauen (264/768) wurde eine Anämie ( $\text{Hb} < 11 \text{ g/dl}$ ) beobachtet, davon waren 5,3 % (14/264) hochgradig anämisch ( $\text{Hb} < 7 \text{ g/dl}$ ). Der mittlere Hämoglobinwert lag bei 11,4 g/dl, die ermittelten Werte bewegten sich zwischen 4,6 g/dl und 16,4 g/dl. Etwa ein Fünftel der Kinder kam per Kaiserschnitt zur Welt. Das mittlere Plazentagewicht lag bei 459 g. Die leichteste Plazenta wog nur 213 g und die schwerste 602 g. Das Plazentagewicht stieg signifikant mit zunehmender Schwangerschaftszahl [ $p_{t-Test} = 0,03$ ].

**Tabelle 3.1.1** Kenndaten der Probandinnen

Parität	P1	P2&3	P≥4	Gesamt
N	280	289	201	770
Alter <sup>a</sup> (Jahre)	21,4 ± 3,6	26,1 ± 4,4	33,1 ± 5,1 <sup>†</sup>	26,2 ± 6,3
[n]	[278]	[286]	[197]	[759]
Anteil Wohnort in Agogo <sup>b</sup>	50,0	54,0	41,8	49,4
[n]	[140/280]	[156/289]	[84/201]	[380/770]
Bildungsniveau <sup>a</sup> (0-3)*	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,6	0,8 ± 0,6 <sup>+</sup>	1,0 ± 0,6
[n]	[278]	[286]	[197]	[761]
Anzahl Schwangerschaftsvorsorge- untersuchungen <sup>a</sup> ; [n]	3,8 ± 2,2	4,2 ± 2,4	3,7 ± 2,0	3,9 ± 2,0
[n]	[279]	[284]	[196]	[752]
Hämoglobin <sup>a</sup> (g/dl)	11,2 ± 1,8	11,5 ± 1,6	11,4 ± 1,8	11,4 ± 1,7
Anteil mit Anämie <sup>b</sup>	38,0	31,3	33,8	34,4
[n]	[106/279]	[90/288]	[68/201]	[264/768]
Anteil mit Fieber <sup>b</sup>	3,6	1,8	2,5	2,6
[n]	[10/277]	[5/286]	[5/197]	[20/760]
Anteil Kaiserschnittentbindungen <sup>b</sup>	21,4	20,1	25,6	22,0
[n]	[60/280]	[58/288]	[51/199]	[169/767]
Plazentagewicht <sup>a</sup> (netto, g)	439 ± 101	462 ± 100	483 ± 110 <sup>†</sup>	459 ± 105
[n]	[276]	[287]	[198]	[761]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende, a: Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; b: Angabe in Prozent; \*: definiert als: 0 = keine Schulbildung, 1 = Grundschule, 2 = Mittelschule, 3 = Hochschulreife; †: Werte steigen signifikant mit zunehmender Schwangerschaftszahl; +: Werte fallen signifikant mit zunehmender Schwangerschaftszahl

Die Kenndaten der Neugeborenen sind in Tabelle 3.1.2 zusammengefasst. Frühgeburtlichkeit (Gestationsalter < 37 SSW) trat bei einem knappen Fünftel der Entbindungen auf. Das mittlere Gestationsalter betrug 38,5 SSW, wobei das niedrigste 27,0 SSW betrug und das höchste 43,1 SSW. Der Anteil zu früh geborener Kinder fiel signifikant mit zunehmender Parität [ $p\chi^2_{\text{trend}} < 0,0001$ ]. Das mittlere Gestationsalter stieg entsprechend mit zunehmender Schwangerschaftszahl an. Allerdings unterschieden sich nur die *Primiparae* deutlich von den anderen beiden Paritätsgruppen [ $p_{t\text{-Test}} = 0,001$ ].

**Tabelle 3.1.2** Kenndaten der Neugeborenen

Parität	P1	P2&3	P≥4	Gesamt
N	280	289	201	770
Gestationsalter <sup>a</sup> (SSW)	38,0 ± 2,4*	38,7 ± 2,3	38,8 ± 2,3	38,5 ± 2,3
[n]	[280]	[288]	[201]	[769]
Anteil mit Frühgeburtlichkeit <sup>b</sup>	26,8	15,6	12,4 <sup>†</sup>	18,9
[n]	[75/280]	[45/288]	[25/201]	[145/769]
Geburtsgewicht <sup>a</sup> (g)	2751 ± 479	3006 ± 436	3104 ± 508 <sup>†</sup>	2939 ± 493
Anteil Geburtsgewicht <sup>b</sup> < 2500 g	25,8	10,8	10,5 <sup>+</sup>	16,2
[n]	[72/279]	[31/288]	[21/201]	[124/768]
Anteil intrauterine Wachstumsverzögerung <sup>b</sup> ; [n]	14,6	5,8	5,1 <sup>+</sup>	8,5
	[30/205]	[14/243]	[9/176]	[53/624]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende a: Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; b: Angabe in Prozent; SSW: Schwangerschaftswochen; †: Werte steigen signifikant mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl; +: Werte fallen signifikant mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl; \*: Wert unterscheidet sich signifikant von den anderen beiden Paritätsgruppen

Von den Neugeborenen hatten 16 % ein Geburtsgewicht unter 2500 g. Der Anteil der Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht fiel mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl [ $p\chi^2_{\text{trend}} < 0,0001$ ]. Dementsprechend stieg das mittlere Geburtsgewicht mit zunehmender Parität [ $p_{t\text{-Test}} = 0,03$ ]. Eine intrauterine Wachstumsverzögerung, d. h. ein erniedrigtes Geburtsgewicht bei reifen Neugeborenen fand sich bei 8,5 % (53/624) der Kinder. Ihr Anteil verringerte sich mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl [ $p\chi^2_{\text{trend}} = 0,01$ ].

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

In 98 % der mittels PCR aus peripherem Blut ermittelten Infektionen (400/408) fand sich ausschließlich *P. falciparum*. Mischinfektionen lagen bei drei Schwangeren mit *P. falciparum* und *P. malariae*, bei weiteren drei Probandinnen mit *P. falciparum* und *P. ovale* und bei einer Probandin mit allen drei Spezies vor. Eine Schwangere war ausschließlich mit *P. malariae* infiziert.

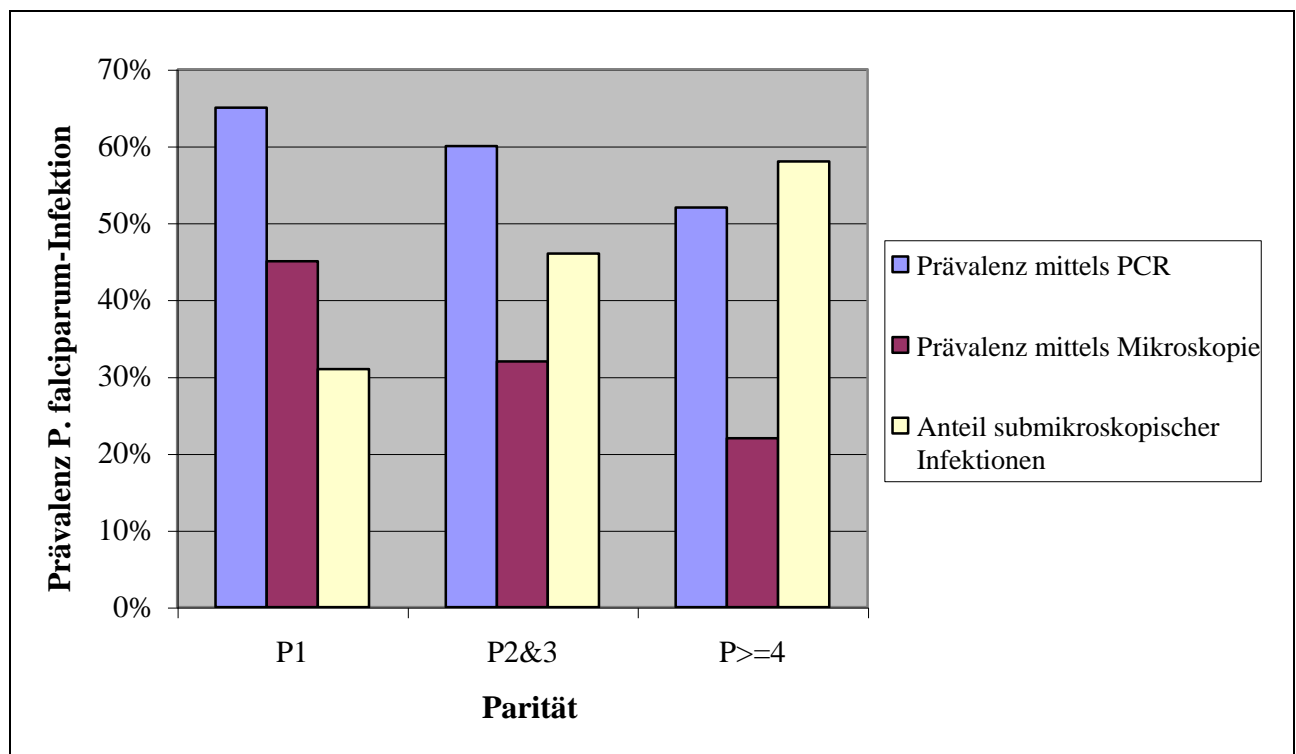
Bei 52,9 % (407/770) der Schwangeren ließ sich mittels PCR eine Infektion mit *P. falciparum* im peripheren Blut nachweisen, während sich mittels Mikroskopie nur bei 19,2 % (148/770) eine Infektion zeigte [ $p\chi^2 < 0,0001$ ]. Sowohl die durch PCR als auch die durch Mikroskopie ermittelte Prävalenz einer peripheren *P. falciparum*-Infektion fiel mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl [ $p\chi^2_{\text{trend}} < 0,0001$ ].

Bei keinem der Neugeborenen konnte mittels PCR aus einer peripheren Blutprobe eine kongenitale Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen werden

### 3.2.1 Prävalenz plazentarer Parasitämien

Die Prävalenz der durch PCR erhobenen Parasitämien im plazentaren Blut lag mit 59,6 % (459/770) deutlich über der durch Mikroskopie ermittelten von 34,3 % (264/770) [ $p\chi^2 < 0,0001$ ]. Der Anteil der submikroskopischen Infektionen betrug somit 42,9 % (197/459). Sowohl die durch PCR [ $p\chi^2_{\text{trend}} = 0,006$ ] als auch die durch Mikroskopie [ $p\chi^2_{\text{trend}} < 0,0001$ ] ermittelte Prävalenz einer plazentaren Infektion fiel mit zunehmender Schwangerschaftszahl. Entsprechend stieg der Anteil submikroskopischer Infektionen mit zunehmender Anzahl an Schwangerschaften [ $p\chi^2_{\text{trend}} < 0,0001$ ]. Zwei der mikroskopisch sichtbaren Infektionen konnten mittels PCR nicht bestätigt werden (Abb. 3.2.1.1).

**Abbildung 3.2.1.1** Prävalenz der Infektion mit *P. falciparum* im plazentaren Blut



P1: Primiparae, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende

Die plazentaren Parasitendichten aller mikroskopisch nachweisbaren Infektionen reichten von einem bis 180.000 Parasiten pro 100 Blickfelder (P/100BF). Das geometrische Mittel lag bei 85 Parasiten pro 100 Blickfelder (95%-Konfidenzintervall: 54 bis 99). Die Parasitendichten sanken

in Abhängigkeit von der Parität statistisch signifikant ab: P1: 129 P/100BF (95 bis 175), P2&3: 66 P/100BF (42 bis 105) und P $\geq$ 4: 45 P/100BF (21 bis 96) [ $p_{KWT} < 0,0001$ ].

### **3.2.2 Prävalenz von Malariapigment**

Der in der Literatur geprägte Begriff der „plazentaren Malaria“ steht für den Nachweis von Parasiten und/oder Malariapigment in plazentarem Gewebe oder Blut. Davon abzugrenzen ist die „plazentare Parasitämie“, die eine Parasitämie im plazentaren Gefäßbett beschreibt, ohne den Nachweis von Pigment zu berücksichtigen (Kapitel 3.2.1.). Es konnte bei 30,4 % (234/769) der Probandinnen mittels Mikroskopie Malariapigment in den Leukozyten der Plazenta als Korrelat für eine chronische plazentare Infektion nachgewiesen werden. Die Prävalenz von Pigment nahm deutlich mit zunehmender Schwangerschaftszahl ab: P1: 41,8 % (117/280); P2&3: 28,8 % (83/288) und P $\geq$ 4: 16,9 % (34/201) [ $p\chi^2_{\text{trend}} < 0,0001$ ].

### **3.3 Einflussfaktoren auf die Prävalenz plazentarer Infektionen**

Neben der Parität wurden als mögliche Einflussfaktoren der Wohnort, das Alter, die Schulbildung und die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge untersucht. Der Wohnort (Stadt versus Land) und die Schulbildung hatten weder auf die Prävalenz von plazentaren Parasitämien noch auf die Anwesenheit von Pigment einen statistisch signifikanten Einfluss. Das Alter erwies sich dagegen als starke Einflussgröße. Bei Infektionsnachweis mittels PCR nahm das Risiko einer Infektion pro zusätzlichem Lebensjahr um 5 % ab [ $p < 0,0001$ ; Odds Ratio (OR): 0,95 (0,92-0,97)] und bei Nachweis mittels Mikroskopie um 7 % [ $p < 0,0001$ ; OR: 0,93 (0,90-0,95)]. Das Risiko einer chronischen plazentaren Infektion fiel sogar um 8 % pro Lebensjahr [ $p < 0,0001$ ; OR: 0,92 (0,90-0,95)]. Einen ähnlich starken Einfluss hatte die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge. Hier verringerte sich die Wahrscheinlichkeit eines positiven PCR-Befundes mit jedem zusätzlichen Besuch der Schwangerschaftsvorsorge um 8 % [ $p = 0,01$ ; OR: 0,92 (0,86-0,98)] und für einen positiven Mikroskopiebefund um 7 % [ $p = 0,02$ ; OR: 0,93 (0,86-0,99)]. Das Risiko für eine chronische plazentare Infektion verringerte sich nicht signifikant durch häufige Teilnahme an der Vorsorge [ $p = 0,1$ ; OR: 0,94 (0,88-1,01)].

### 3.4 Klinische Manifestation der plazentaren Infektion mit *P. falciparum*

#### 3.4.1 Fieber

Fieber war in der Studienpopulation eine seltene Manifestation der Infektion mit *P. falciparum*. Nur 3,5 % (16/453) der durch PCR als solche identifizierten Infizierten und 1,3 % (4/307) der nicht infizierten Mütter hatten Fieber [ $p\chi^2 = 0,06$ ]. Mikroskopisch nachweisbar infizierte Mütter hatten mit 4,6 % (12/261) statistisch signifikant häufiger Fieber als die nicht infizierten Schwangeren mit 1,6 % (8/498) [ $p\chi^2 = 0,02$ ]. Aufgrund der geringen Prävalenz von Fieber in der Studiengruppe wurde es in den folgenden Analysen als Einflussfaktor mit einbezogen, nicht aber als klinisch relevante Manifestation einer Infektion untersucht.

#### 3.4.2 Anämie

Eine Infektion mit *P. falciparum* war unabhängig von der Nachweismethode mit einer erhöhten Prävalenz von Anämie assoziiert [ $p\chi^2 < 0,0001$ ] (Tabelle 3.4.2.1 und 3.4.2.2). Die Probandinnen mit Pigmentnachweis zeigten gegenüber den Probandinnen ohne Pigmentbefund mit 1 g/dl die größte Differenz der mittleren Hämoglobinspiegel [ $p_{t-Test} < 0,0001$ ]. Die durch Mikroskopie und PCR ermittelten infizierten Schwangeren hatten jeweils um 0,7 g/dl erniedrigte mittlere Hämoglobinwerte im Vergleich mit ihrer nicht-infizierten Vergleichsgruppe [ $p_{t-Test} < 0,0001$ ].

**Tabelle 3.4.2.1** Prävalenz der Anämie in Abhängigkeit von einer Infektion mit *P. falciparum*

Parität	P1	P2&3	P≥4	Gesamt
<u>Mikroskopie</u>				
Negativ	27,6 [42/152]	28,2 [55/195]	31,2 [49/157]	29,0 [146/504]
Positiv	50,4* [64/127]	38,0 [35/92]	43,2 [19/44]	44,9* [118/263]
<u>PCR</u>				
Negativ	21,4 [21/98]	19,7 [23/117]	32,3 [31/96]	24,1 [75/311]
Positiv	47,0* [85/181]	39,2* [67/171]	35,2 [37/105]	41,4* [189/457]
<u>Pigment</u>				
Negativ	25,3 [41/162]	25,0 [51/204]	31,7 [53/167]	27,2 [145/533]
Positiv	55,6* [65/117]	47,0* [39/83]	44,1 [15/34]	50,9* [119/234]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende Angabe in Prozent; \*: Die Anämie-Prävalenz ist signifikant höher als in der nicht infizierten Vergleichsgruppe.

Auch nach Stratifizierung in die drei Paritätsgruppen waren die infizierten Schwangeren häufiger von Anämie betroffen als die nicht-infizierten und hatten niedrigere mittlere Hämoglobinwerte. Nur in der Gruppe der Viert- und Mehrgebärenden war der Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Schwangeren deutlich geringer und statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 3.4.2.2** Mittlere Hämoglobinwerte in Abhängigkeit von einer Infektion mit *P. falciparum*

Parität	P1	P2&3	P≥4	Gesamt
<u>Mikroskopie</u>				
Negativ	11,7 ± 1,9	11,7 ± 1,5	11,5 ± 1,8	11,6 ± 1,7
Positiv	10,7 ± 1,6*	11,1 ± 1,6*	11,2 ± 1,6	10,9 ± 1,6*
<u>PCR</u>				
Negativ	12,1 ± 1,7	11,9 ± 1,4	11,5 ± 2,0	11,8 ± 1,7
Positiv	10,8 ± 1,8*	11,2 ± 1,6*	11,3 ± 1,6	11,1 ± 1,7*
<u>Pigment</u>				
Negativ	11,8 ± 1,6	11,7 ± 1,4	11,4 ± 1,8	11,7 ± 1,6
Positiv	10,4 ± 1,8*	11,0 ± 1,7*	11,2 ± 1,6	10,7 ± 1,8*

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; Hämoglobinwert in g/dl, Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; \*: Der mittlere Hämoglobinwert ist signifikant niedriger als in der nicht infizierten Vergleichsgruppe.

### 3.4.3 Frühgeburtlichkeit

Eine Infektion mit *P. falciparum* war tendenziell mit niedrigem Gestationsalter und somit einer erhöhten Prävalenz von Frühgeburtlichkeit assoziiert (Tabelle 3.4.3.1 und 3.4.3.2). Statistisch signifikant war der Unterschied bei den chronisch infizierten Müttern, die doppelt so häufig wie ihre Vergleichsgruppe mit negativem Pigmentnachweis ihr Kind zu früh auf die Welt brachten [ $p\chi^2 < 0,0001$ ]. Entsprechend war das mittlere Gestationsalter bei den Probandinnen mit Pigmentnachweis um eine Woche niedriger als bei den Schwangeren ohne Pigmentnachweis [ $p_{t-Test} = 0,009$ ].

Nach Stratifizierung in die Paritätsgruppen zeigte sich, dass nur die chronisch infizierten *Primiparae* ein deutlich niedrigeres Gestationsalter [ $p_{t-Test} < 0,0001$ ] und damit eine erhöhte Prävalenz von Frühgeburtlichkeit hatten als die *Primiparae* ohne Pigmentnachweis [ $p\chi^2 < 0,0001$ ].

**Tabelle 3.4.3.1** Prävalenz von Frühgeburtlichkeit in Abhängigkeit von einer Infektion mit *P. falciparum*

<b>Parität</b>	<b>P1</b>	<b>P2&amp;3</b>	<b>P≥4</b>	<b>Gesamt</b>
<u>Mikroskopie</u>				
Negativ	24,8 [38/153]	15,0 [29/194]	13,4 [21/157]	17,7 [89/504]
Positiv	28,4 [36/127]	17,2 [16/93]	9,1 [4/44]	21,2 [56/264]
<u>PCR</u>				
Negativ	25,5 [25/98]	12,1 [14/116]	15,6 [15/96]	17,4 [54/310]
Positiv	27,5 [50/182]	18,0 [31/172]	9,5 [10/105]	19,8 [91/459]
<u>Pigment</u>				
Negativ	17,2 [28/163]	15,2 [31/204]	12,6 [21/167]	15,0 [80/534]
Positiv	40,2* [47/117]	16,9 [14/83]	11,8 [4/34]	27,8* [65/234]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; Angabe in Prozent; \*: Die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit ist signifikant höher als in der nicht-infizierten Vergleichsgruppe.

**Tabelle 3.4.3.2** Mittleres Gestationsalter in Abhängigkeit von einer Infektion mit *P. falciparum*

<b>Parität</b>	<b>P1</b>	<b>P2&amp;3</b>	<b>P≥4</b>	<b>Gesamt</b>
<u>Mikroskopie</u>				
Negativ	38,1 ± 2,3	38,7 ± 2,1	38,6 ± 2,5	38,5 ± 2,3
Positiv	38,0 ± 2,4	38,6 ± 2,0	38,8 ± 1,6	38,4 ± 2,3
<u>PCR</u>				
Negativ	38,2 ± 2,0	38,8 ± 2,0	38,9 ± 2,7	38,6 ± 2,3
Positiv	38,0 ± 2,6	38,5 ± 2,1	39,0 ± 1,9	38,5 ± 2,1
<u>Pigment</u>				
Negativ	38,4 ± 2,3	38,8 ± 2,1	39,0 ± 2,4	38,8 ± 2,3
Positiv	37,2 ± 2,4*	38,5 ± 2,0	38,6 ± 1,7	38,1 ± 2,2*

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; Gestationsalter in Schwangerschaftswochen, Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; \*: Das mittlere Gestationsalter ist signifikant niedriger als in der nicht infizierten Vergleichsgruppe.



### 3.4.4 Niedriges Geburtsgewicht und intrauterine Wachstumsverzögerung

Eine Infektion mit *P. falciparum* war mit einer Erniedrigung des mittleren Geburtsgewichts assoziiert (Tabelle 3.4.4.1 und 3.4.4.2). Die durch Mikroskopie als solche ermittelten infizierten Probandinnen brachten im Mittel ein 93 g leichteres Kind zur Welt als die nicht infizierten Mütter [ $p_{t-Test} = 0,01$ ]. Bei den durch PCR ermittelten infizierten Schwangeren betrug die Differenz 71 g [ $p_{t-Test} = 0,04$ ] und bei den chronisch infizierten Müttern 167 g [ $p_{t-Test} < 0,0001$ ]. Eine chronische plazentare Infektion erhöhte signifikant das Risiko für das Auftreten von niedrigem Geburtsgewicht [ $p\chi^2 = 0,02$ ].

**Tabelle 3.4.4.1** Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht in Abhängigkeit von einer Infektion mit *P. falciparum*

Parität	P1	P2&3	P≥4	Gesamt
<u>Mikroskopie</u>				
Negativ	24,3 [37/152]	11,3 [22/195]	9,6 [15/157]	14,7 [74/504]
Positiv	27,6 [35/127]	9,8 [9/92]	13,6 [6/44]	19,0 [50/263]
<u>PCR</u>				
Negativ	20,4 [20/98]	11,1 [13/117]	12,5 [12/96]	14,5 [45/311]
Positiv	28,8 [52/181]	10,5 [18/171]	8,6 [9/105]	17,3 [79/457]
<u>Pigment</u>				
Negativ	19,1 [31/162]	11,2 [23/205]	10,8 [18/167]	13,5 [72/534]
Positiv	35,0* [41/117]	9,8 [8/82]	8,8 [3/34]	22,3* [52/233]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; Angabe in Prozent; \*: Die Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht ist signifikant höher als in der nicht infizierten Vergleichsgruppe.

Nach Stratifizierung in die einzelnen Paritätsgruppen zeigten nur die infizierten *Primiparae* gegenüber der negativen Vergleichsgruppe deutliche Unterschiede: Ein positiver PCR-Befund und eine chronische plazentare Infektion waren signifikant mit einer Senkung des mittleren Geburtsgewichts assoziiert [ $p_{t-Test} = 0,009$ ]. Die Neugeborenen der chronisch infizierten *Primiparae* hatten fast doppelt so häufig ein zu niedriges Geburtsgewicht wie die Kinder der *Primiparae* ohne Pigmentnachweis [ $p\chi^2 = 0,002$ ].

Das Auftreten von intrauteriner Wachstumsverzögerung erwies sich als unabhängig von der Infektion mit *P. falciparum*.

**Tabelle 3.4.4.2** Mittleres Geburtsgewicht in Abhängigkeit von einer Infektion mit *P. falciparum*

<b>Parität</b>	<b>P1</b>	<b>P2&amp;3</b>	<b>P≥4</b>	<b>Gesamt</b>
<u>Mikroskopie</u>				
Negativ	2790 ± 469	3004 ± 437	3106 ± 518	2971 ± 489
Positiv	2705 ± 89	3015 ± 438	3095 ± 476	2875 ± 498*
<u>PCR</u>				
Negativ	2834 ± 422	3036 ± 439	3067 ± 528	2982 ± 473
Positiv	2706 ± 503*	2986 ± 434	3138 ± 489	2910 ± 505*
<u>Pigment</u>				
Negativ	2826 ± 476	3027 ± 456	3104 ± 507	2990 ± 491
Positiv	2648 ± 466*	2957 ± 382	3106 ± 519	2823 ± 481*

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; Geburtsgewicht in Gramm, Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; \*: Das mittlere Geburtsgewicht ist signifikant niedriger als in der nicht-infizierten Vergleichsgruppe.

### 3.5 Einflussfaktoren auf die klinischen Befunde

Neben der Parität und der plazentaren Infektion wurden das Alter, der Wohnort, das Bildungsniveau, die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge und Fieber als mögliche Einflussfaktoren auf die Prävalenz von Anämie, Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht untersucht. Als Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit wurde zusätzlich Anämie und als Risikofaktoren für ein niedriges Geburtsgewicht Anämie und Frühgeburtlichkeit in die Analysen miteinbezogen.

#### 3.5.1 Anämie

Das Alter, die Schulbildung und der Wohnort der Probandin hatten keinen Einfluss auf die Prävalenz der Anämie. Mütter mit Fieber waren signifikant häufiger anämisch als Mütter ohne Fieber: 60 % (12/20) versus 33,5 % (247/738) [ $p\chi^2 = 0,01$ ]. Die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge war ebenfalls signifikant mit Anämie assoziiert. Mit jedem zusätzlichen Besuch der Vorsorge reduzierte sich das Risiko einer Anämie um 15 % [ $p < 0,0001$ ; OR: 0,85 (0,79-0,91)].

### **3.5.2 Frühgeburtlichkeit**

Anämie zeigte sich als Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit. Es kamen 23,1 % (61/264) der Kinder anämischer Mütter zu früh auf die Welt und 16,7 % (84/503) der Kinder von Müttern ohne Anämie [ $p\chi^2 = 0,03$ ]. Die Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge reduzierte das Risiko von Frühgeburtlichkeit deutlich um 9 % pro Besuch [ $p = 0,02$ ; OR: 0,91 (0,83-0,99)]. Weder das Alter der Mütter noch Wohnort, Schulbildung und Fieber beeinflussten die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit.

### **3.5.3 Niedriges Geburtsgewicht**

Einen deutlichen Einfluss auf das Geburtsgewicht zeigte die mütterliche Anämie. 22 % (58/264) der anämischen Mütter brachten ein Kind mit einem Geburtsgewicht unter 2500 g zur Welt. Bei den Müttern ohne Anämie waren es nur 13,1 % (66/504) [ $p\chi^2 = 0,001$ ]. Erwartungsgemäß war das Risiko für ein niedriges Geburtsgewicht bei Frühgeburtlichkeit am größten. 49 % (71/145) der zu früh geborenen Kinder waren untergewichtig, dagegen nur 8,5 % (53/624) der termingerechten Neugeborenen [ $p\chi^2 < 0,0001$ ]. Das Alter der Mütter reduzierte das Risiko für niedriges Geburtsgewicht um 5 % pro Lebensjahr [ $p = 0,002$ ; OR: 0,95 (0,92-0,98)]. Ebenso sank mit jedem Besuch der Schwangerschaftsvorsorge die Wahrscheinlichkeit von niedrigem Geburtsgewicht um 12 % [ $p = 0,005$ ; OR: 0,88 (0,80-0,96)]. Fieber, der Wohnort und die Schulbildung der Mütter wirkten sich nicht auf das Geburtsgewicht der Neugeborenen aus.

## **3.6 Prävalenz antiparasitärer Medikamentenspiegel**

### **3.6.1 Pyrimethamin**

Eine Pyrimethaminkonzentration von  $\geq 10$  ng/ml zum Zeitpunkt der Entbindung wurde als prophylaktischer Spiegel und ein Wert von 1-9 ng/ml als grenzwertiger Spiegel definiert (Eggelte, 1990: Eggelte TA, persönliche Mitteilung). Von den 770 Schwangeren wiesen 35,7 % ( $n = 275$ ) einen prophylaktischen Pyrimethaminspiegel auf, bei 42,5 % ( $n = 327$ ) lagen grenzwertige Spiegel vor und 21,8 % ( $n = 168$ ) hatten kein Pyrimethamin im Blut. Für die grenzwertigen Befunde lag das geometrische Mittel der Spiegel bei 2 ng/ml (95%-Konfidenzintervall: 2-3 ng/ml) und für die prophylaktischen Spiegel bei 43 ng/ml (95%-Konfidenzintervall: 39-47 ng/ml).

### 3.6.1.1 Einflussfaktoren auf die Prävalenz von Pyrimethamin

Neben der Parität wurde der Einfluss des Alters, des Wohnortes, der Schulbildung und der Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge auf das Vorliegen von Pyrimethamin untersucht. Das Alter und die Parität der Frauen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Prävalenz von Pyrimethamin. Sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse zeigten der Wohnort, das Bildungsniveau und die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge Assoziationen mit dem Vorliegen von prophylaktischen und grenzwertigen Pyrimethaminspiegeln (Tabelle 3.6.2.1).

Frauen aus Agogo hatten häufiger Pyrimethamin im Blut als die Schwangeren aus den umliegenden Dörfern. Ein höheres Bildungsniveau war deutlich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von grenzwertigen und prophylaktischen Spiegeln assoziiert. Schwangere, die die Vorsorge oft wahrnahmen, hatten deutlich häufiger prophylaktische Spiegel. Bezüglich der grenzwertigen Befunde war dieser Zusammenhang nicht signifikant.

**Tabelle 3.6.2.1** Einflussfaktoren auf die Prävalenz von grenzwertigen und prophylaktischen Pyrimethaminspiegeln

	Pyrimethamin-Konzentration			
	grenzwertig		prophylaktisch	
	Odds Ratio [KI]	p-Wert	Odds Ratio [KI]	p-Wert
<u>Univariat</u>				
Agogo <sup>+</sup>	2,07 [1,39-3,09]	0,0002	1,75 [1,16-2,64]	0,005
Bildungsniveau*	1,54 [1,01-2,14]	0,01	1,53 [1,08-2,16]	0,01
ANC	1,07 [0,98-1,18]	0,1	1,28 [1,17-1,41]	< 0,0001
<u>Multivariat</u>				
Agogo <sup>+</sup>	1,93 [1,3-2,84]	0,001	1,61 [1,07-2,42]	0,02
Bildungsniveau*	1,54 [1,08-2,2]	0,01	1,56 [1,1-2,18]	0,01
ANC	1,05 [0,95-1,15]	0,4	1,25 [1,14-1,38]	< 0,0001

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; KI: Konfidenzintervall; ANC: engl.: *Antenatal Care* = Schwangerschaftsvorsorge; \*: definiert als: 0 = keine Schulbildung, 1 = Grundschule, 2 = Mittelschule, 3 = Hochschulreife; +: Wohnort in der Stadt

### 3.6.2 Chloroquin

Es ließ sich bei 17,8 % der Schwangeren (137/770) Chloroquin von  $\geq 10$  ng/ml im peripheren Blut nachweisen. Weder das Alter noch die Parität, der Wohnort, die Schulbildung oder die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge waren signifikant mit der Prävalenz von Chloroquin im Blut assoziiert. Bei 10 % (77/770) aller Schwangeren fand sich weder Pyrimethamin noch Chloroquin. Von den 168 Frauen ohne Pyrimethaminnachweis hatten 18,5 % (31/168) und von den 602 Frauen mit prophylaktischem oder grenzwertigem Pyrimethaminbefund hatten 17,6 % (106/602) Chloroquin im Blut.

Chloroquin hatte weder auf die Prävalenz einer akuten noch einer chronischen plazentaren Infektion mit *P. falciparum* signifikanten Einfluss. Auch auf die klinischen Manifestationen der plazentaren Malaria: Fieber, Anämie, niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit zeigte die Anwesenheit von Chloroquin keinen wesentlichen Effekt. Deswegen wurde die Prävalenz von Chloroquin nur noch bezüglich des maternofetalen Transfers (Kapitel 3.11.2) berücksichtigt.

### 3.7 Effekte von Pyrimethamin auf die Prävalenz plazentarer Infektionen

Schwangere, bei denen sich kein Pyrimethamin im peripheren Blut nachweisen ließ, waren häufiger mit *P. falciparum* infiziert als Frauen mit prophylaktischen bzw. grenzwertigen Pyrimethaminspiegeln [ $p\chi^2 = 0,01$ ]. Es zeigte sich außerdem ein signifikant abnehmender Trend der Infektionprävalenz mit steigendem Pyrimethaminspiegel [ $p\chi^2_{\text{trend}} = 0,01$ ] (Tabelle 3.7.1).

Nach Stratifizierung in die drei Paritätsgruppen waren die *Primiparae* mit negativem Pyrimethaminbefund unabhängig von der Nachweismethode der Infektion signifikant häufiger infiziert als die *Primiparae* mit grenzwertigen bzw. prophylaktischen Pyrimethaminspiegeln [jeweils  $P\chi^2 = 0,04$ ]. Es zeigte sich ebenfalls ein deutlich abnehmender Trend der Infektionshäufigkeit bei *Primiparae* mit grenzwertigen Pyrimethaminspiegeln gegenüber den *Primiparae* mit negativem Pyrimethaminbefund. Die *Primiparae* mit prophylaktischen Spiegeln waren wiederum noch seltener infiziert als die *Primiparae* mit grenzwertigen Spiegeln [jeweils  $P\chi^2_{\text{trend}} = 0,004$ ]. Bei den *Multiparae* war der positive Einfluss vorhandener Pyrimethaminspiegel auf die Prävalenz einer Infektion nicht signifikant.

**Tabelle 3.7.1** Effekte von Pyrimethamin auf die Prävalenz einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum*

Prävalenz (% , n/n) von <i>P. falciparum</i> getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>Mikroskopie</u>				
<i>Negativ</i>	63,2 [36/57]	33,9 [20/59]	23,1 [12/52]	40,5 [68/168]
<i>Grenzwertig</i>	46,3 [56/121]*	32,3 [42/130]	22,4 [17/76]	35,2 [115/327]
<i>Prophylaktisch</i>	34,3 [35/102]* <sup>†</sup>	31,0 [31/100]	20,6 [15/73]	29,5 [81/275]* <sup>†</sup>
<u>PCR</u>				
<i>Negativ</i>	80,7 [46/57]	66,1 [39/59]	59,6 [31/52]	69,1 [116/168]
<i>Grenzwertig</i>	66,1 [80/121]*	59,2 [77/130]	51,3 [39/76]	59,6 [195/327]*
<i>Prophylaktisch</i>	54,9 [56/102]* <sup>†</sup>	56,0 [56/100]	48,0 [35/73]	53,8 [148/275]* <sup>†</sup>
<u>Pigment</u>				
<i>Negativ</i>	52,6 [30/57]	32,2 [19/59]	19,2 [10/52]	35,1 [59/168]
<i>Grenzwertig</i>	45,5 [55/121]	30,8 [40/130]	19,7 [15/76]	33,6 [110/327]
<i>Prophylaktisch</i>	31,4 [32/102]* <sup>†</sup>	24,0 [24/100]	12,3 [9/73]	23,6 [65/275]* <sup>†</sup>

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; \*: Die Infektionsprävalenz ist signifikant niedriger als in der Pyrimethamin-negativen Vergleichsgruppe. †: Werte zeigen signifikant abnehmenden Trend mit zunehmendem Pyrimethaminspiegel.

Die plazentaren Parasitendichten wurden durch die prophylaktische Einnahme von Pyrimethamin nicht signifikant beeinflusst [ $p_{KWT} = 0,2$ ]. Nach Stratifizierung in die Paritätsgruppen zeigte sich, dass *Primiparae* mit prophylaktischen und grenzwertigen Pyrimethaminspiegeln mit 68 P/100BF (95%-Konfidenzintervall: 42 bis 105) deutlich niedrigere plazentare Parasitendichten hatten als Schwangere ohne Pyrimethamin im Blut: 121 P/100BF (95 bis 175)[ $p_{KWT} = 0,004$ ]. Bei den *Multiparae* war dieser Zusammenhang wiederum nur tendenziell sichtbar.

### 3.8 Effekte von Pyrimethamin auf die klinischen Befunde

#### 3.8.1 Anämie

Schwangere mit Pyrimethamin im Blut hatten seltener eine Anämie und höhere mittlere Hämoglobinwerte als Mütter ohne Pyrimethaminspiegel [ $p\chi^2 = 0,0009$  und  $P_{t-Test} = 0,02$ ] (Tabelle 3.8.1.1 und Tabelle 3.8.1.2).

**Tabelle 3.8.1.1** Prävalenz der Anämie in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration

Prävalenz (% , n/n) von Anämie getrennt nach <i>Pyrimethamin-</i> <i>spiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<i>Negativ</i>	56,1 [32/57]	47,5 [28/59]	36,5 [19/52]	47,0 [79/168]
<i>Grenzwertig</i>	35,5* [43/121]	27,7* [36/130]	32,9 [25/76]	31,8* [104/327]
<i>Prophylaktisch</i>	30,4*† [31/102]	26,0*† [26/100]	32,9 [24/73]	29,5*† [81/275]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; \*: Die Anämieprävalenz ist signifikant niedriger als in der Pyrimethamin-negativen Vergleichsgruppe. †: Werte zeigen signifikant abnehmenden Trend mit zunehmendem Pyrimethaminspiegel.

Noch deutlicher zeigte sich dieser Unterschied nach Stratifizierung in die drei Paritätsgruppen bei den *Primiparae* [ $p\chi^2 = 0,007$  und  $p_{t-Test} = 0,02$ ]. Auch bei den Zweit- und Drittgebärenden waren die Mütter mit grenzwertigen und prophylaktischen Pyrimethaminspiegeln seltener von Anämie betroffen und hatten höhere mittlere Hämoglobinwerte [ $p\chi^2 = 0,04$  und  $p_{t-Test} = 0,04$ ]. Für die Gesamtgruppe, die *Primiparae* und die Zweit- und Drittgebärenden ließ sich außerdem Trends abnehmender Anämieprävalenz mit zunehmenden Pyrimethaminspiegeln beobachten [ $p\chi^2_{trend} = 0,01$ ]. Bei den Viert- und Mehrgebärenden zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

**Tabelle 3.8.1.2** Hämoglobinwerte in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration

Hämoglobinwert <sup>a</sup> (g/dl) getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<i>Negativ</i>	10,6 ± 2,1	11,3 ± 1,8	11,5 ± 1,7	11,1 ± 2,0
<i>Grenzwertig</i>	11,3 ± 1,7*	11,7 ± 1,4*	11,4 ± 1,7	11,5 ± 1,6*
<i>Prophylaktisch</i>	11,6 ± 1,7*	11,7 ± 1,7*	11,3 ± 1,8	11,5 ± 1,7*

Pyrimethamin-negativen Vergleichsgruppe. P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; a: Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; \*: Der mittlere Hämoglobinwert ist signifikant höher als in der Pyrimethamin-negativen Vergleichsgruppe.

### 3.8.2. Frühgeburtlichkeit

Vorhandene Pyrimethaminspiegel hatten auch nach Stratifizierung in die Paritätsgruppen keinen relevanten Einfluss auf die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit. (Tabelle 3.8.2.1 und Tabelle 3.8.2.2).

**Tabelle 3.8.2.1** Prävalenz von Frühgeburtlichkeit in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration

Prävalenz (% , n/n) von Frühgeburtlichkeit getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<i>Negativ</i>	24,6 [14/57]	22,0 [13/59]	13,5 [7/52]	20,2 [34/168]
<i>Grenzwertig</i>	20,7 [25/121]	21,5 [28/130]	13,2 [10/76]	19,2 [63/327]
<i>Prophylaktisch</i>	21,6 [22/102]	17,0 [17/100]	13,6 [10/73]	17,8 [49/275]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende

**Tabelle 3.8.2.2** Gestationsalter in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration

Gestationsalter <sup>a</sup> (SSW) getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<i>Negativ</i>	38,2 ± 2,3	38,4 ± 2,0	38,7 ± 2,2	38,4 ± 2,2
<i>Grenzwertig</i>	38,0 ± 2,6	38,5 ± 2,1	38,7 ± 2,2	38,5 ± 2,4
<i>Prophylaktisch</i>	38,0 ± 2,1	38,7 ± 2,0	38,6 ± 2,5	38,5 ± 2,2

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; a: Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; SSW: Schwangerschaftswochen

### 3.8.3 Niedriges Geburtsgewicht

Auch auf die Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht zeigten vorhandene Pyrimethaminspiegel keinen relevanten Einfluss (Tabelle 3.8.3.1 und Tabelle 3.8.3.2). Auch nach Stratifizierung in die Paritätsgruppen ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.



### 3.8.3.1 Tabelle Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration

Prävalenz (% , n/n) von niedrigem Geburtsgewicht getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<i>Negativ</i>	26,3 [15/57]	15,3 [9/59]	11,5 [6/52]	17,9 [30/168]
<i>Grenzwertig</i>	25,6 [31/121]	11,5 [15/130]	9,2 [7/76]	16,2 [53/327]
<i>Prophylaktisch</i>	25,5 [26/102]	7,0 [7/100]	10,9 [8/73]	14,9 [41/275]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende

### 3.8.3.2 Tabelle Geburtsgewicht in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration

Geburtsgewicht <sup>a</sup> getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<i>Negativ</i>	2865 ± 543	2901 ± 464	3070 ± 568	2969 ± 539
<i>Grenzwertig</i>	2793 ± 435	3009 ± 428	3140 ± 491	2924 ± 481
<i>Prophylaktisch</i>	2756 ± 483	3073 ± 419	3119 ± 475	2939 ± 480

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende, a: Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung in Gramm

## 3.9 Effekte von Pyrimethamin bei vorliegender plazentarer Infektion

In den folgenden Berechnungen wurden die durch PCR ermittelten infektiologischen Daten als Nachweis einer akuten Infektion und die Pigmentbefunde als Korrelat für eine chronische Infektion verwendet. Die mittels Mikroskopie erhobenen Daten wurden nicht mehr gesondert berücksichtigt.

### 3.9.1 Anämie

Vorhandene prophylaktische oder grenzwertige Pyrimethaminspiegel senkten die Anämieprävalenz bei den infizierten Probandinnen (Tabelle 3.9.1.1). Signifikant war dieser Zusammenhang nur bei den *Primiparae* [ $p\chi^2 = 0,04$ ]. Bei diesen zeigte sich außerdem ein deutlich abnehmender Trend der Anämieprävalenz in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration [ $p\chi^2_{\text{trend}} = 0,03$ ].

**Tabelle 3.9.1.1** Einfluss von Pyrimethamin auf die Prävalenz von Anämie bei infizierten Schwangeren

Prävalenz (% , n/n) von Anämie getrennt nach <i>Pyrimethamin-</i> <i>spiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>PCR positiv</u>				
<i>Negativ</i>	63,0 [29/46]	46,2 [18/39]	29,0 [9/31]	47,4 [55/116]
<i>Grenzwertig</i>	43,8* [35/80]	43,3 [29/67]	30,8 [12/39]	41,8 [76/185]
<i>Prophylaktisch</i>	39,3*† [22/56]	45,5 [30/66]	31,4 [11/35]	39,8 [63/158]
<u>Pigment positiv</u>				
<i>Negativ</i>	73,3 [22/30]	42,1 [8/19]	60,0 [6/10]	61,0 [36/59]
<i>Grenzwertig</i>	52,7 [29/55]	40,0 [12/30]	33,3 [5/15]	46,0 [46/100]
<i>Prophylaktisch</i>	43,8*† [14/32]	44,1 [15/34]	44,4 [4/9]	44,0 [33/75]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; \*: Die Anämieprävalenz ist signifikant niedriger als in der Pyrimethamin-negativen Vergleichsgruppe. †: Werte fallen signifikant mit zunehmendem Pyrimethaminspiegel.

Die mittleren Hämoglobinwerte waren tendenziell höher bei den infizierten Müttern mit Pyrimethaminspiegeln als bei den infizierten Probandinnen ohne Pyrimethaminnachweis. Signifikant war dieser Unterschied nur bei den *Primiparae* mit prophylaktischen Pyrimethaminspiegeln [ $p_{t\text{-Test}} = 0,04$ ] (Tabelle 3.9.1.2).

**Tabelle 3.9.1.2** Einfluss von Pyrimethamin auf die mittleren Hämoglobinwerte bei infizierten Schwangeren

Hämoglobinwerte <sup>a</sup> (g/dl) getrennt nach Pyrimethaminspiegel	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>PCR positiv</u>				
<i>Negativ</i>	10,3 ± 2,0	11,1 ± 1,9	11,4 ± 1,8	10,9 ± 2,0
<i>Grenzwertig</i>	10,8 ± 1,6	11,3 ± 1,3	11,3 ± 1,4	11,3 ± 1,5
<i>Prophylaktisch</i>	11,2 ± 1,7*	11,0 ± 1,7	11,3 ± 1,6	11,1 ± 1,7
<u>Pigment positiv</u>				
<i>Negativ</i>	9,8 ± 2,0	11,2 ± 1,8	10,5 ± 1,8	10,0 ± 2,0
<i>Grenzwertig</i>	10,5 ± 1,6	11,4 ± 1,8	11,2 ± 1,5	11,0 ± 1,7
<i>Prophylaktisch</i>	10,8 ± 1,8*	11,0 ± 1,6	10,8 ± 0,9	10,9 ± 1,6

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; a: Angabe als Mittelwert mit Standardabweichung; \*: Wert ist signifikant höher als in der Pyrimethamin-negativen Vergleichsgruppe.

### 3.9.2 Frühgeburtlichkeit

Bei vorliegender Infektion hatten die vorhandenen Pyrimethaminspiegel nur einen tendenziell positiven Einfluss auf die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit.

Entsprechend unterschieden sich die Werte für das mittlere Gestationsalter nicht signifikant in Abhängigkeit von der Pyrimethaminkonzentration. Auch die Stratifizierung in die Paritätsgruppen ergab keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 3.9.2.1 und Tabelle 3.9.2.2).

**Tabelle 3.9.2.1** Einfluss von Pyrimethamin auf die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit bei infizierten Schwangeren

Prävalenz (% , n/n) von Frühgeburtlichkeit getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>PCR positiv</u>				
<i>Negativ</i>	28,3 [13/46]	28,2 [11/39]	9,7 [3/31]	23,3 [27/116]
<i>Grenzwertig</i>	25,0 [20/80]	22,3 [15/67]	10,3 [4/39]	21,1 [39/185]
<i>Prophylaktisch</i>	21,4 [12/56]	21,2 [14/66]	8,6 [3/35]	17,7 [28/158]
<u>Pigment positiv</u>				
<i>Negativ</i>	30,0 [9/30]	31,6 [6/19]	20,0 [2/10]	28,8 [17/59]
<i>Grenzwertig</i>	32,7 [18/55]	13,3 [4/30]	13,3 [2/15]	24,0 [24/100]
<i>Prophylaktisch</i>	31,3 [10/32]	11,8 [4/34]	0 [0/9]	18,7 [14/75]

P1: Primiparae, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende

**Tabelle 3.9.2.2** Einfluss von Pyrimethamin auf das mittlere Gestationsalter bei infizierten Schwangeren

Gestationsalter <sup>a</sup> (SSW) getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>PCR</u>				
<i>Negativ</i>	38,4 ± 2,4	38,3 ± 2,1	38,9 ± 1,8	38,5 ± 2,2
<i>Grenzwertig</i>	38,2 ± 2,8	38,6 ± 2,1	38,8 ± 1,8	38,6 ± 2,4
<i>Prophylaktisch</i>	38,6 ± 2,3	38,7 ± 2,0	38,7 ± 2,0	38,7 ± 2,1
<u>Pigment</u>				
<i>Negativ</i>	38,2 ± 2,2	38,6 ± 2,3	38,4 ± 1,9	38,5 ± 2,2
<i>Grenzwertig</i>	37,9 ± 2,6	38,8 ± 2,0	38,5 ± 1,8	38,3 ± 2,4
<i>Prophylaktisch</i>	38,2 ± 2,2	38,9 ± 2,0	38,8 ± 1,1	38,6 ± 2,0

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; a: Angabe als Mittelwert und Standardabweichung; SSW: Schwangerschaftswochen

### 3.9.3 Niedriges Geburtsgewicht

Das Auftreten von niedrigem Geburtsgewicht bei infizierten Schwangeren war auch nach Stratifizierung in die drei Paritätsgruppen nicht mit der Pyrimethaminkonzentration assoziiert (Tabelle 3.9.3.1 und Tabelle 3.9.3.2).

**Tabelle 3.9.3.1** Einfluss von Pyrimethamin auf die Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht bei infizierten Schwangeren

Prävalenz (% , n/n) von niedrigem Geburtsgewicht getrennt nach <i>Pyrimethaminspiegel</i>	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>PCR positiv</u>				
<i>Negativ</i>	28,3 [13/46]	15,4 [6/39]	9,6 [3/31]	19,0 [22/116]
<i>Grenzwertig</i>	30,0 [24/80]	13,4 [9/67]	7,7 [3/39]	19,5 [36/185]
<i>Prophylaktisch</i>	26,8 [15/56]	4,5 [3/66]	8,5 [3/35]	13,2 [21/158]
<u>Pigment positiv</u>				
<i>Negativ</i>	36,7 [11/30]	15,8 [3/19]	10,0 [1/10]	25,4 [15/59]
<i>Grenzwertig</i>	32,7 [18/55]	10,0 [3/30]	13,3 [2/15]	23,0 [23/100]
<i>Prophylaktisch</i>	25,0 [8/32]	5,9 [2/34]	0 [0/9]	13,3 [10/75]

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende

**Tabelle 3.9.3.1** Einfluss von Pyrimethamin auf das mittlere Geburtsgewicht bei infizierten Schwangeren

Geburtsgewicht <sup>a</sup> (g) getrennt nach Pyrimethaminspiegel	Parität			Gesamt
	1	2&3	≥4	
<u>PCR positiv</u>				
<i>Negativ</i>	2735 ± 537	2847 ± 423	3060 ± 552	2853 ± 535
<i>Grenzwertig</i>	2634 ± 447	2965 ± 445	3079 ± 451	2859 ± 488
<i>Prophylaktisch</i>	2731 ± 530	3006 ± 465	3098 ± 463	2993 ± 496
<u>Pigment positiv</u>				
<i>Negativ</i>	2697 ± 521	2851 ± 339	3189 ± 439	2881 ± 471
<i>Grenzwertig</i>	2611 ± 390	2994 ± 444	3119 ± 693	2897 ± 528
<i>Prophylaktisch</i>	2743 ± 480	2985 ± 342	3290 ± 169	2981 ± 409

P1: *Primiparae*, P2&3: Zweit- und Drittgebärende, P≥4: Viert- und Mehrgebärende; a: Angabe als Mittelwert und Standardabweichung; SSW: Schwangerschaftswochen

### 3.10 Multivariate Analysen

#### 3.10.1 Pyrimethaminnachweis und plazentare Infektion mit *P. falciparum*

In den folgenden multivariaten Analysen soll der Einfluss vorhandener Pyrimethaminspiegel im Blut auf die Infektion mit *P. falciparum* untersucht werden. Berücksichtigt wurden außerdem alle anderen Faktoren, die in den univariaten Analysen sowohl mit einer akuten (PCR) als auch mit einer chronischen (Pigment-positiven) Infektion signifikant assoziiert waren.

Sowohl grenzwertige als auch prophylaktische Pyrimethaminspiegel reduzierten das Risiko einer akuten Infektion mit *P. falciparum* in multivariater Analyse (Tabelle 3.10.1.1). Außerdem hatten Viert- und Mehrgebärende deutlich seltener eine akute plazentare Infektion als *Primiparae*. Für die Zweit- und Drittgebärenden war das Risiko einer akuten Infektion gegenüber den *Primiparae* wiederum nicht signifikant reduziert. Zusätzlich hatten das Alter und die Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge einen deutlichen Einfluss auf das Vorliegen einer akuten Infektion der Plazenta mit *P. falciparum*. Pro Lebensjahr sank das Risiko einer akuten plazentaren Infektion um 6 % und um 8 % pro Besuch der Schwangerschaftsvorsorge.

**Tabelle 3.10.1.1** Assoziation von Pyrimethamin und anderen Faktoren mit der Prävalenz von akuten plazentaren Infektionen durch *P. falciparum*

	Prävalenz % [n]	Univariat		Multivariat	
		Odds Ratio [KI]	p-Wert	Odds Ratio [KI]	p-Wert
<u>Pyrimethamin</u>					
Negativ	69,1 [168]	1		1	
Grenzwertig	59,6 [327]	0,61 [0,40-0,91]	0,01	0,66 [0,43-1,00]	0,04
Prophylaktisch	53,8 [275]	0,58 [0,39-0,87]	0,005	0,56 [0,37-0,84]	0,005
<u>Parität</u>					
P1	65,0 [280]	1		1	
P2&3	59,5 [289]	0,79 [0,56-1,11]	0,2	0,81 [0,57-1,15]	0,3
P≥4	52,2 [201]	0,58 [0,39-0,84]	0,004	0,59 [0,41-0,85]	0,005
<u>ANC</u> <sup>+</sup>	n.a.	0,92 [0,86-0,98]	0,01	0,92 [0,86-0,99]	0,01
<u>Alter</u> <sup>*</sup>	n.a.	0,95 [0,92-0,97]	< 0,0001	0,95 [0,92-0,97]	< 0,0001

ANC: engl.: *Antenatal Care* = Schwangerschaftsvorsorge; +: Risikominderung pro Vorsorgebesuch; \*: Risikominderung pro Lebensjahr; KI = 95% -iges Konfidenzintervall; n.a. = nicht anwendbar

Das Risiko einer Pigment-positiven Infektion der Plazenta mit *P. falciparum* wurde durch vorhandenen Pyrimethaminspiegel im Blut reduziert (Tabelle 3.10.1.2). Signifikant war dieser Zusammenhang nur bezüglich prophylaktischer Spiegel in der univariaten Analyse. Außerdem hatte die Anzahl der Schwangerschaften einen großen Einfluss auf das Vorliegen einer chronischen Infektion. So war das Risiko für eine chronische Infektion bereits bei den Zweit- und Drittgebärenden gegenüber den *Primiparae* um die Hälfte reduziert. Noch deutlicher war der Unterschied zwischen den Viert- und Mehrgebärenden und den *Primiparae*.

Einen positiven Effekt zeigte das Alter. Das Risiko einer chronischen Infektion sank um 5 % pro zusätzliches Lebensjahr.

**Tabelle 3.10.1.2** Assoziation von Pyrimethamin und anderen Faktoren mit der Prävalenz von Malariapigment

	Univariat			Multivariat	
	Prävalenz % [n]	Odds Ratio [KI]	p-Wert	Odds Ratio [KI]	p-Wert
<u>Pyrimethamin</u>					
Negativ	35,1 [168]	1		1	
Grenzwertig	33,6 [327]	0,76 [0,50-1,14]	0,2	0,82 [0,55-1,21]	0,4
Prophylaktisch	23,6 [275]	0,65 [0,42-0,99]	0,04	0,69 [0,46-1,05]	0,08
<u>Parität</u>					
P1	41,8 [280]	1		1	
P2&3	28,8 [288]	0,55 [0,41-0,78]	0,001	0,56 [0,40-0,80]	0,001
P≥4	16,9 [201]	0,27 [0,17-0,43]	< 0,0001	0,28 [0,18-0,44]	< 0,0001
<u>Alter</u> *	n.a.	0,92 [0,90-0,95]	< 0,0001	0,94 [0,92-0,96]	< 0,0001

\*: Risikominderung pro Lebensjahr; KI = 95%-iges Konfidenzintervall; n.a. = nicht anwendbar

### 3.10.2 Pyrimethaminnachweis und klinische Befunde

#### 3.10.2.1 Anämie

In der multivariaten Analyse wurden alle Faktoren berücksichtigt, die univariat signifikant mit einer Anämie assoziiert waren. Prophylaktische Pyrimethaminspiegel reduzierten signifikant das Risiko einer Anämie (Tabelle 3.10.2.1). Der Effekt grenzwertiger Spiegel zeigte sich dagegen in der multivariaten Analyse als nicht ausreichend für eine Minderung des Anämierisikos. Einen besonders positiven Einfluss hatte die Schwangerschaftsvorsorge. Durch jeden zusätzlichen Besuch der Vorsorge reduzierte sich das Risiko für eine Anämie um 14 %.

Der größte Risikofaktor für das Auftreten einer Anämie war eine chronische Infektion der Plazenta. Auch das Vorliegen einer akuten plazentaren Infektion und das Vorhandensein von Fieber erhöhten das Risiko einer Anämie, allerdings waren diese Zusammenhänge in der multivariaten Analyse statistisch nicht signifikant.



**Tabelle 3.10.2.1** Assoziation von Pyrimethamin und anderen Faktoren mit der Prävalenz von Anämie

	Prävalenz % [n]	Univariat		Multivariat	
		Odds Ratio [KI]	p-Wert	Odds Ratio [KI]	p-Wert
<u>Pyrimethamin</u>					
negativ	47,0 [168]	1		1	
grenzwertig	31,8 [327]	0,65 [0,44-0,96]	0,03	0,78 [0,51-1,19]	0,1
prophylaktisch	29,5 [275]	0,63 [0,43-0,93]	0,02	0,65 [0,43-0,97]	0,03
<u>ANC<sup>+</sup></u>	n.a.	0,85 [0,80-0,91]	< 0,0001	0,86 [0,80-0,93]	< 0,0001
<u>Pigment</u>					
Negativ	27,2 [533]	1		1	
Positiv	50,9 [234]	2,77 [2,01-3,81]	< 0,0001	2,70 [1,92-3,70]	< 0,0001
<u>PCR</u>					
Negativ	24,1 [311]	1		1	
Positiv	41,4 [457]	2,22 [1,61-3,06]	< 0,0001	1,38 [0,95-2,0]	0,09
<u>Fieber</u>					
Nicht vorhanden	33,5 [738]	1		1	
Vorhanden	60,0 [20]	2,98 [1,20-7,39]	0,01	2,42 [0,94-6,27]	0,07

ANC: engl.: *Antenatal Care* = Schwangerschaftsvorsorge; +: Risikominderung pro Vorsorgebesuch; KI = 95% -iges Konfidenzintervall; n.a. = nicht anwendbar

### 3.10.2.2 Frühgeburtslichkeit

Während in den univariaten Analysen das Vorliegen einer chronischen Infektion der Plazenta das Risiko von Frühgeburtslichkeit noch signifikant erhöhte, ließ sich dieser Einfluss multivariat nicht bestätigen. Ebenso war Anämie univariat noch deutlich mit einem erhöhten Risiko von Frühgeburtslichkeit assoziiert, in der multivariaten Analyse ließ sich diese Assoziation nicht nachweisen.

**Tabelle 3.10.2.2** Assoziation von Pyrimethamin und anderen Faktoren mit der Prävalenz von Frühgeburtlichkeit

	Univariat			Multivariat	
	Prävalenz % [n]	Odds Ratio [KI]	p-Wert	Odds Ratio [KI]	p-Wert
<u>Pyrimethamin</u>					
negativ	20,2 [168]	1		1	
grenzwertig	20,2 [237]	0,97 [0,62-1,57]	0,9	0,98 [0,62-1,61]	0,9
prophylaktisch	16,4 [275]	0,77 [0,47-1,25]	0,3	0,79 [0,47-1,32]	0,4
<u>Parität</u>					
P1	26,8 [280]	1		1	
P2&3.	15,6 [288]	0,51 [0,34-0,77]	0,001	0,49 [0,32-0,74]	0,0008
P $\geq$ 4	12,4 [201]	0,39 [0,24-0,64]	0,0002	0,36 [0,22-0,60]	< 0,0001
<u>ANC<sup>+</sup></u>	n.a.	0,91 [0,83-0,99]	0,02	0,91 [0,83-0,99]	0,03
<u>Pigment</u>					
negativ	15,0 [534]	1		1	
positiv	27,8 [234]	1,52 [1,04-2,21]	0,03	1,25 [0,84-1,86]	0,3
<u>Anämie</u>					
nicht vorhanden	16,7 [503]	1		1	
vorhanden	23,1 [264]	1,50 [1,04-2,17]	0,03	1,35 [0,92-1,98]	0,1

ANC: engl.: *Antenatal Care* = Schwangerschaftsvorsorge; +: Risikominderung pro Vorsorgebesuch; KI = 95% -iges Konfidenzintervall; n.a. = nicht anwendbar

Ein deutlich gemindertem Risiko für eine Frühgeburt zeigte sich sowohl in den univariaten als auch in den multivariaten Analysen mit zunehmender Anzahl an Schwangerschaften. Außerdem reduzierte die häufige Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge das Risiko einer Frühgeburt um 9 % pro Besuch (Tabelle 3.10.2.2).

Vorhandene Pyrimethaminspiegel zeigten weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse einen Einfluss auf die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit.

### 3.10.2.3 Niedriges Geburtsgewicht

Alle Faktoren, die in den univariaten Analysen eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten von niedrigem Geburtsgewicht zeigten, sowie zusätzlich die Anwesenheit von Pyrimethamin wurden in die folgende multivariate Analyse miteinbezogen (Tabelle 3.10.2.3).

**Tabelle 3.10.2.3** Assoziation von Pyrimethamin und anderen Faktoren mit der Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht

	Prävalenz % [n]	Univariat		Multivariat	
		Odds Ratio [KI]	p-Wert	Odds Ratio [KI]	p-Wert
<u>Pyrimethamin</u>					
Negativ	16,2 [327]	0,91 [0,55-1,50]	0,7	0,94 [0,53-1,67]	0,8
Grenzwertig	14,9 [275]	0,89 [0,53-1,50]	0,6	0,91 [0,52-1,62]	0,7
Prophylaktisch	16,4 [275]	0,77 [0,47-1,25]	0,3	0,79 [0,47-1,32]	0,4
<u>Parität</u>					
P1	25,8 [279]	1		1	
P2&3.	10,8 [288]	0,35 [0,22-0,55]	< 0,0001	0,34 [0,21-0,55]	< 0,0001
P≥4	10,5 [201]	0,34 [0,20-0,57]	< 0,0001	0,34 [0,20-0,57]	< 0,0001
<u>Alter</u> *	n.a.	0,95 [0,92-0,98]	0,002	0,96 [0,92-0,99]	0,01
<u>ANC</u> <sup>+</sup>	n.a.	0,88 [0,80-0,96]	0,005	0,90 [0,81-0,99]	0,03
<u>Frühgeburtlichkeit</u>					
Vorhanden	8,3 [624]	1		1	
Nicht vorhanden	49,0 [145]	10,30 [6,70-15,84]	< 0,0001	9,17 [5,90-14,26]	< 0,0001
<u>Pigment</u>					
Negativ	13,5 [534]	1		1	
Positiv	22,3 [233]	1,56 [1,05-2,33]	0,02	1,14 [0,74-1,77]	0,5
<u>Anämie</u>					
Nicht vorhanden	13,1 [504]	1		1	
Vorhanden	22,0 [264]	1,87 [1,27-2,77]	0,001	1,68 [1,08-2,61]	0,02

\*: Risikominderung pro Lebensjahr; ANC: engl.: *Antenatal Care* = Schwangerschaftsvorsorge; +: Risikominderung pro Vorsorgebesuch; KI = 95%-iges Konfidenzintervall; n.a. = nicht anwendbar

Erwartungsgemäß erhöhte sich das Risiko von niedrigem Geburtsgewicht bei Frühgeburtlichkeit stark. Während in der univariaten Analyse eine chronische plazentare Infektion mit einem

gesteigerten Risiko von niedrigem Geburtsgewicht einherging, war dieser Zusammenhang in der multivariaten Analyse nicht signifikant. Ein erhöhtes Risiko, ein untergewichtiges Neugeborenes zur Welt zu bringen, hatten zudem Mütter mit einer Anämie.

Faktoren, die das Risiko von niedrigem Geburtsgewicht minderten, waren eine zunehmende Schwangerschaftszahl, höheres Alter (4 % pro Lebensjahr) und die Häufigkeit der Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge (10 % pro Besuch).

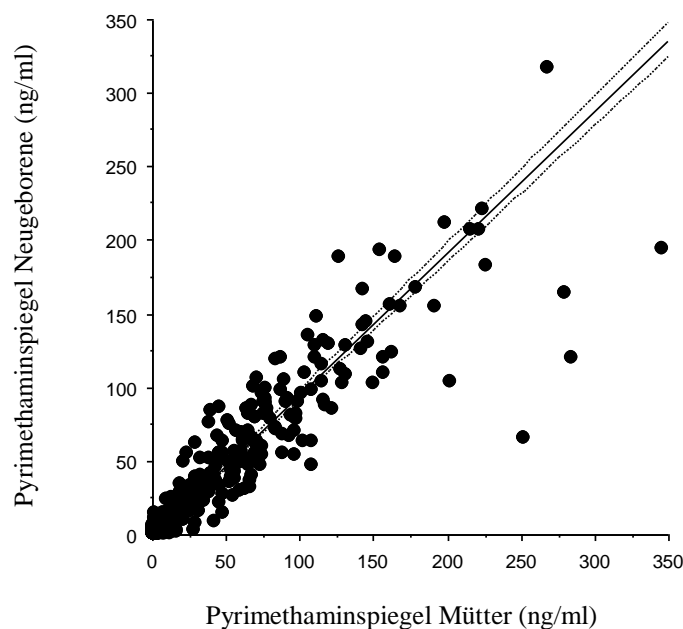
Vorhandene Pyrimethaminspiegel zeigten keinen Einfluss auf die Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht.

### 3.11 Maternofetaler Transfer von Pyrimethamin und Chloroquin

#### 3.11.1 Pyrimethamin

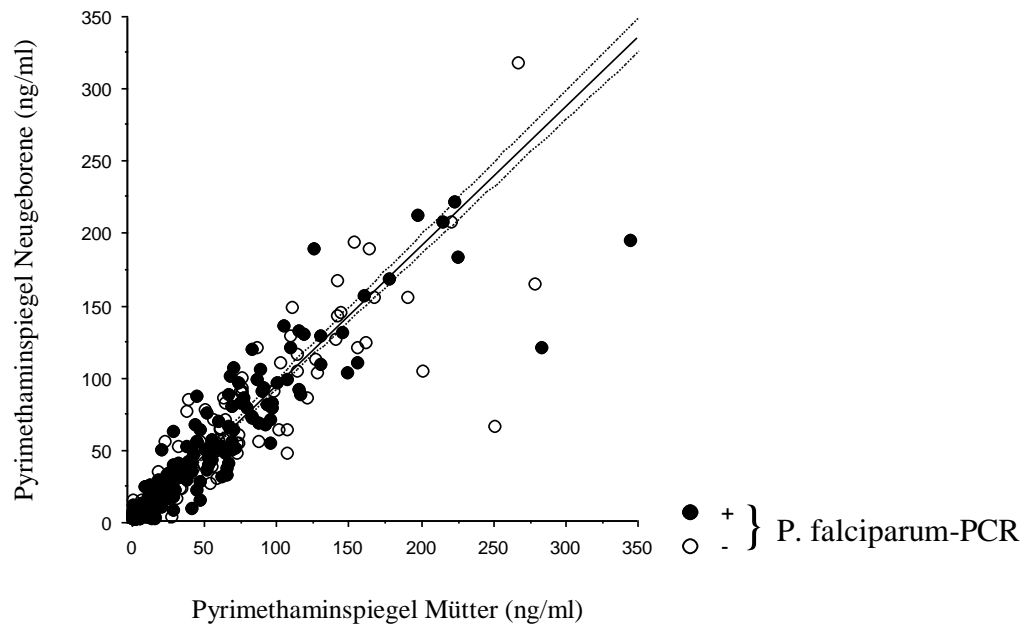
Die Pyrimethaminspiegel der Mütter gingen in einem direkt proportionalen Verhältnis auf die Neugeborenen über [ $r = 0,886$ ;  $p < 0,0001$ ] (Abbildung 3.11.1.1).

Abbildung 3.11.1.1 Maternofetaler Transfer von Pyrimethamin

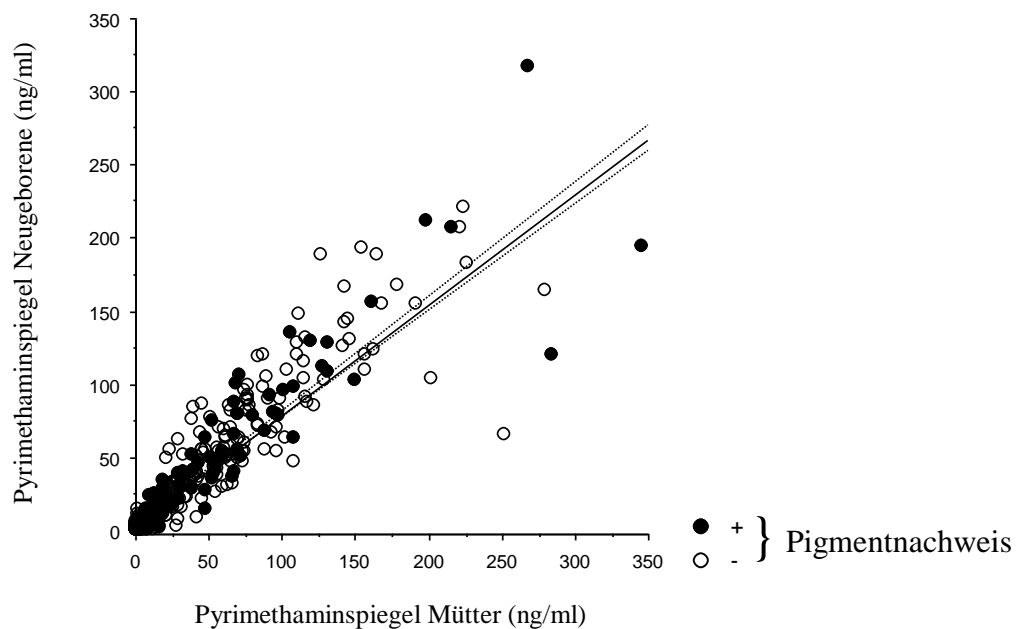


Auch bei vorliegender akuter Infektion (PCR) war das maternofetale Übertragungsverhältnis von Pyrimethamin linear. Der plazentare Transfer von Pyrimethamin unterschied sich nicht signifikant in Abhängigkeit von einer plazentaren Infektion [ $r_{\text{infiziert}} = 0,781$ ;  $p < 0,0001$  vs.  $r_{\text{nicht-infiziert}} = 0,970$ ;  $p < 0,0001$ ](Abbildung 3.11.1.2).

**Abbildung 3.11.1.2** Maternofetaler Transfer von Pyrimethamin in Abhängigkeit von einer plazentaren *P. falciparum*-Infektion (PCR)



**Abbildung 3.11.1.3** Maternofetaler Transfer von Pyrimethamin in Abhängigkeit vom Nachweis plazentaren Malariapigments

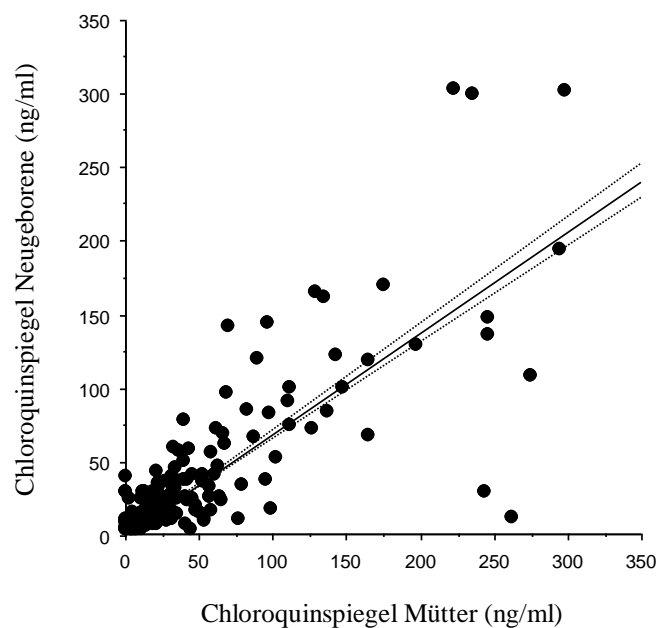


Bei einem Pigmentnachweis in der Plazenta war das Übertragungsverhältnis von Pyrimethamin von Mutter auf Kind ebenso positiv korreliert wie bei den Gebärenden ohne Pigmentnachweis [ $r_{\text{Pigment}} = 0,930$ ;  $p < 0,0001$  vs.  $r_{\text{Pigment-negativ}} = 0,876$ ;  $p < 0,0001$ ] (Abbildung 3.11.1.3).

### 3.11.2 Chloroquin

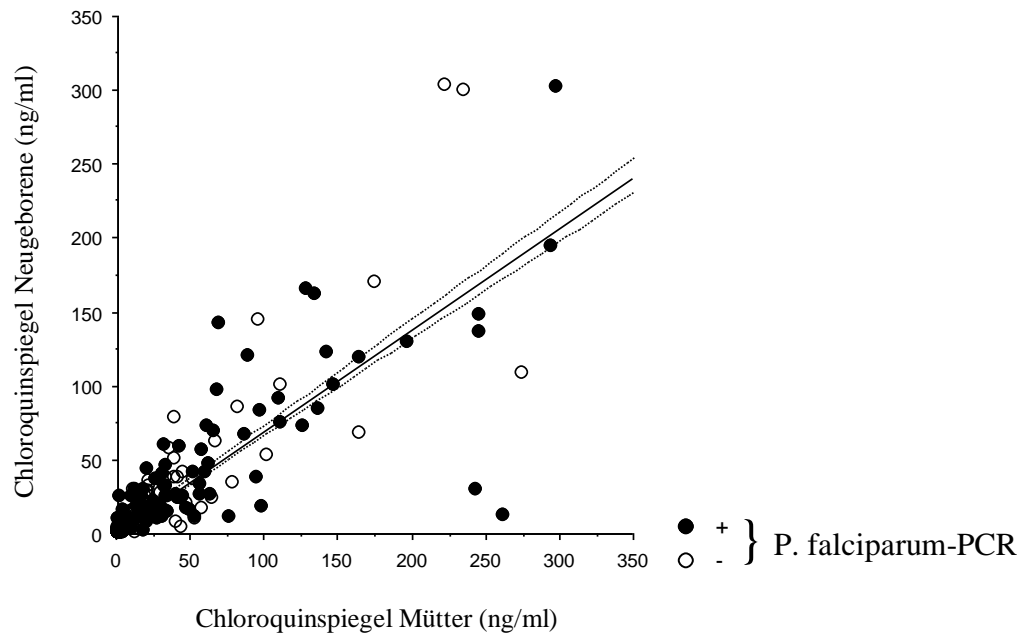
Die Chloroquinspiegel der Mütter gingen ebenfalls in einem direkt proportionalen Verhältnis auf die Neugeborenen über [ $r = 0,818$ ;  $p < 0,0001$ ] (Abbildung 3.11.2.1).

Abbildung 3.11.2.1 Maternofetaler Transfer von Chloroquin

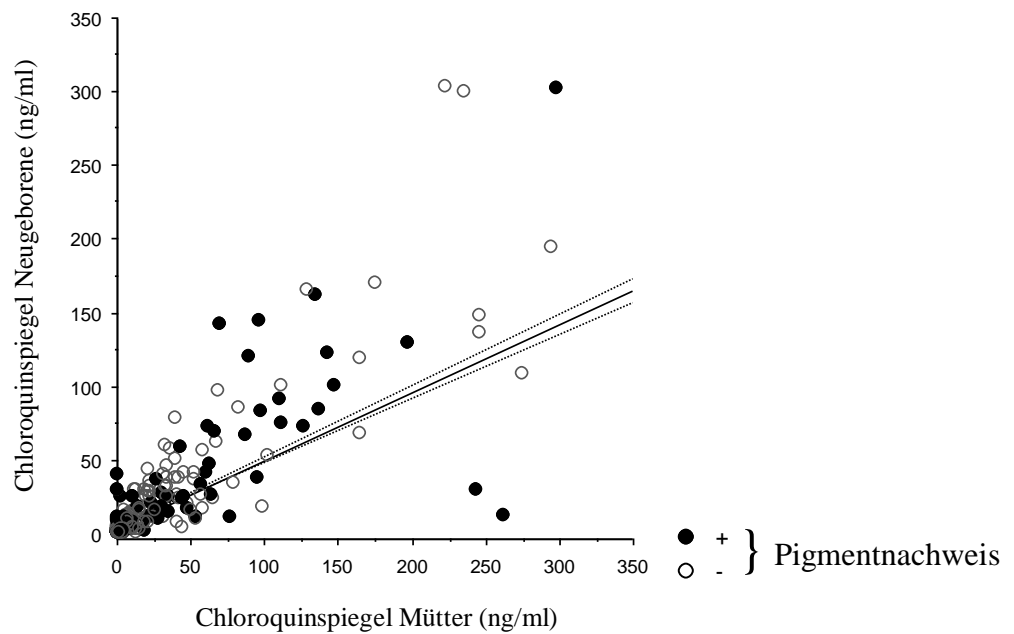


Weder eine akute Infektion (PCR) noch ein Pigmentnachweis veränderten den maternofetale Transfer von Chloroquin signifikant [ $r_{\text{infiziert}} = 0,829$ ;  $p < 0,0001$  vs.  $r_{\text{nicht-infiziert}} = 0,919$ ;  $p < 0,0001$  und  $r_{\text{Pigment}} = 0,776$ ;  $p < 0,0001$  vs.  $r_{\text{Pigment-negativ}} = 0,888$ ;  $p < 0,0001$ ] (Abbildung 3.11.2.2 und 3.11.2.3).

**Abbildung 3.11.2.2** Maternofetaler Transfer von Chloroquin in Abhängigkeit von einer plazentaren *P. falciparum*-Infektion (PCR)



**Abbildung 3.11.2.3** Maternofetaler Transfer von Chloroquin in Abhängigkeit vom Nachweis plazentaren Malariapigments



## **4 Diskussion**

Im Folgenden werden Aufbau, Methodik und Ergebnisse der Studie kritisch beurteilt. Nach der Bewertung der verwendeten Methoden erfolgt die Einordnung der Ergebnisse zur Epidemiologie der plazentaren Malaria in der Schwangerschaft im Studiengebiet im Hinblick auf vorliegende Erkenntnisse. Anschließend soll der Effekt von Pyrimethamin als antiparasitäre Chemoprophylaxe auf die Prävalenz plazentarer Infektionen mit *P. falciparum* und auf die klinische Manifestation der plazentaren Infektion in der Studiengruppe diskutiert werden. Abschließend werden die vorliegenden Ergebnisse zum maternofetalen Transfer von Pyrimethamin und Chloroquin bewertet.

### **4.1 Beurteilung der angewandten Methoden**

#### **4.1.1 Aufbau der Studie**

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer Querschnittstudie erhoben. Dies bot den Vorteil, eine relativ große Anzahl von Probandinnen (770) über den repräsentativen Zeitraum eines Jahres rekrutieren zu können. Die Größe der Studiengruppe ermöglichte eine epidemiologisch sinnvolle Einteilung der Schwangeren in drei annähernd gleich große Gruppen nach Anzahl ihrer Schwangerschaften. So konnte u. a. die besondere Gefährdung von *Primiparae* durch Malaria in der Schwangerschaft verdeutlicht werden.

Prinzipiell sind Querschnittstudien nicht geeignet, Aussagen über Verläufe zu machen (z. B. über die Effekte einer Chemoprophylaxe auf die Infektionsprävalenz während der Schwangerschaft), sondern erlauben eher Aussagen über Punktprävalenzen verschiedener Faktoren. Grundlage der infektiologischen Untersuchungen dieser Arbeit waren die aus Plazentablut gewonnenen Daten, die ohne Risiko für Mutter und Kind jedoch nur zum Zeitpunkt der Geburt erhoben werden können. Da Malaria im hochendemischen Studiengebiet als eine vorwiegend chronische Infektion auftritt (Bottius *et al.*, 1996; Roper *et al.*, 1996), ist es dennoch möglich, Assoziationen zwischen verschiedenen Prävalenzen einzeln untersuchter Faktoren zu zeigen (Kreienbrock & Schach, 1997). Als Anhalt für die Chronizität der plazentaren Infektion bzw. als Nachweis einer abgelaufenen Infektion diente Leukozyten-assoziiertes Pigment.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden, bei der Geburt aus peripherem Blut erhobenen Medikamentenspiegel, lassen ebenfalls nur bedingt Rückschlüsse auf den Rest der Schwangerschaft zu. Die Wahrscheinlichkeit ist jedoch relativ hoch, dass die kontinuierliche Compliance der Probandinnen während der Schwangerschaft derjenigen am Ende der



Schwangerschaft durchschnittlich entsprach (Clauß *et al.*, 1999). Für die Beurteilung des maternofetalen Transfers der Medikamente war außerdem die zeitnahe Abnahme (< 24 h) der mütterlichen und der kindlichen Blutprobe Voraussetzung für die Reliabilität der Daten.

#### **4.1.2 Blutgewinnung aus der Plazenta**

Um eine Kontamination der Plazenta mit parasitärer DNA zu vermeiden, wurden sowohl die Transportbehälter als auch alle Arbeitsgeräte mit NaOH dekontaminiert. Ein falsch-positiver Nachweis mit *P. falciparum*-DNA kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

Die Vermischung von Nabelschnurblut und Plazentablut wurde durch unmittelbares postpartales Abbinden der Nabelschnur auf der plazentanahen Seite vermieden. Die Abnahme der plazentaren Blutprobe wurde außerdem über eine tiefe parazentrale Inzision vorgenommen, wodurch die Beimischung fetalen Blutes reduziert wird.

#### **4.1.3 Infektionsnachweis mittels Mikroskopie und PCR**

Für den Infektionsnachweis mittels Mikroskopie wurde der „Dicke Tropfen“ als Goldstandard gesetzt. Die Auszählung der Parasiten wurde auf 100 Blickfelder vorgenommen und nicht wie bei anderen Untersuchern auf 200 Leukozyten, um dann mithilfe eines Dreisatzes die Parasitendichten pro  $\mu\text{l}$  zu berechnen (Tjitra *et al.*, 1999). Da keine Normwerte für Leukozytenzahlen in plazentarem Blut vorliegen, ist letzteres Verfahren aber anfällig für Fehlermöglichkeiten durch falsche Leukozytenzahlen z. B. bei lokaler Leukozytose im Rahmen einer chronischen Intervillositis bei Schwangeren mit Malaria (Ordi *et al.*, 1998).

Da die Sensitivität der Mikroskopie derjenigen der PCR unterlegen ist (Clendennen *et al.*, 1996; Snounou *et al.*, 1993, Mockenhaupt *et al.*, 2002) und um dem häufigen Auftreten von submikroskopischen Infektionen gerecht zu werden, wurde jede plazentare Probe zusätzlich einem PCR-Verfahren zum Nachweis parasitärer DNA unterzogen. Frühere Studien haben gezeigt, dass bei submikroskopischen Infektionen die im Gewebe sequestrierten Parasiten mikroskopisch nicht nachzuweisen waren (Mockenhaupt *et al.*, 2002).

Der Nachweis des Leukozyten-assoziierten Malariapigments erfolgte mikroskopisch auf 100 Blickfelder. Der Pigmentnachweis mittels histologischer Untersuchung der Plazenten, der es ermöglicht, nicht nur Leukozyten-assoziiertes Pigment, sondern auch Pigment in Fibrinablagerungen und der Basalmembran der Plazenta nachzuweisen (Walter, 1982; Bulmer *et al.*, 1993a; Ismail *et al.*, 2000), ist genauer, aber weniger praktikabel.

#### **4.1.4 Erhebung der klinischen Daten**

##### **4.1.4.1 Fieber**

Fieber wird nach wie vor als ein Leitsymptom für die Diagnose einer akuten Malaria herangezogen und wurde deswegen erhoben. Allerdings ist die einmalige axilläre Temperaturmessung mit einem handelsüblichen digitalen Thermometer bei Aufnahme der Frauen vor der Geburt natürlich nicht als repräsentativ für den Rest der Schwangerschaft anzusehen, sondern stellt als akutes Symptom anders als eher chronische Entwicklungen, wie z. B. eine Anämie, nur eine Punktprävalenz zum Zeitpunkt der Geburt dar. Weiterhin wurden andere mögliche Ursachen für das Allgemeinsymptom Fieber wie z. B. ein in der Schwangerschaft häufiger Harnwegsinfekt nicht ausgeschlossen.

##### **4.1.4.2 Anämie**

Die hämatologischen Daten wie Erythrozyten-, Leukozytenzahlen und der Hämatokrit wurden mit einem halbautomatischen Zellzähler (HC555) bestimmt. Die Hämoglobinmessung wurde separat mit einem Hemocue® Photometer durchgeführt, da die Messung des Zellzählers aufgrund einer Kondenswasserbildung in der Photozelle zu ungenau war. Die korpuskulären Messwerte wurden dadurch nicht beeinträchtigt. Die Korrelation der Messwerte von Hemocue® Photometern und halbautomatischen Zellzählern wird als gut beschrieben (Stoltzfuß, 1997).

Zur Klassifizierung der erhobenen Daten wurden die von der WHO festgelegten Normwerte für Schwangere herangezogen (WHO, 1972). Ebenso wie fast in der gesamten vorliegenden Literatur (Menendez *et al.*, 2000a) wird eine Anämie in der Schwangerschaft durch einen Hämoglobinwert von weniger als 11 g/dl definiert.

##### **4.1.4.3 Gestationsalter und Geburtsgewicht**

Da kein Standardtest zur Reifebestimmung afrikanischer Neugeborener existiert, wurde ein Verfahren von Finnström *et al.* (1977) verwendet, das auf Standardwerten für europäische Neugeborene basiert. Subjektive Einschätzungsunterschiede durch verschiedene Untersucher wurden durch die Einfachheit des gewählten Verfahrens minimiert. Bei der Punktvergabe für die Reifegrade waren die folgenden Kriterien mögliche Fehlerquellen: die Entwicklung des Kopfhaares und die Durchsichtigkeit der Haut. Es ist also denkbar, dass aufgrund der dunklen Hautfarbe und des ausgeprägten Haarwuchses die Neugeborenen tendenziell als reifer beurteilt wurden, als sie es tatsächlich waren.

Die Erhebung des Geburtsgewichts erfolgte mit einer üblichen Handwaage und wurde anhand von international anerkannten Kategorien und Normwerttabellen klassifiziert.

#### **4.1.5 Nachweis von Pyrimethamin und Chloroquin**

Die Pyrimethamin- und Chloroquinspiegel wurden mittels Immunoassay (ELISA) unter Laborbedingungen direkt aus Plasmaproben der Mütter und der Neugeborenen bestimmt. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus, sogar wenn es unter Feldbedingungen mittels Urineststreifen angewendet wird. Pyrimethamin kann bis 10 ng/ml sicher nachgewiesen werden und Chloroquin bis 5 ng/ml. Auch die Spiegel unterhalb dieser sicheren Nachweisgrenzen sind aus unverdünnten Plasmaproben mit hoher Wahrscheinlichkeit noch zuverlässig detektierbar (Witte *et al.*, 1990; Egelte *et al.*, 1992; Schwick *et al.*, 1998). Die hohe Korrelation der mütterlichen und neonatalen Spiegel auch in den nur grenzwertig detektierbaren Bereichen spricht für diese hohe Sensitivität. Die hohe Spezifität wird durch die Anwendung hochspezifischer monoklonaler Antikörper erreicht (Witte *et al.*, 1990; Egelte, 1990). Das angewandte Verfahren entspricht in seiner Sensitivität der Chromatographie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC). Die Angaben zur Sensitivität der HPLC variieren zwischen 1-10 ng/ml sowohl für Pyrimethamin als auch für Chloroquin bei ebenfalls hoher Spezifität (White, 1985; Astier *et al.*, 1997).

#### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Schwangere Frauen – besonders *Primiparae* – unterliegen einem besonderen Risiko, sich mit *P. falciparum* zu infizieren (Alecrim *et al.*, 2000). Die Folgen sind vor allem mütterliche Anämie, Frühgeburtslichkeit und niedriges Geburtsgewicht (Brabin, 1983; Steketee *et al.*, 2001; Whitty *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2007). Plazentare Infektionen mit spezialisierten *P. falciparum*-Klonen stellen eine besondere Gefährdung für Mutter und Kind dar (Fried and Duffy 1996; Diagne *et al.*, 1997; Steketee *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz von plazentaren *P. falciparum*-Infektionen in einem holoendemischen Malariagebiet in Abhängigkeit von der Parität untersucht und die Zusammenhänge zwischen plazentarer Infektion und dem Auftreten von Fieber, Anämie, Frühgeburtslichkeit und niedrigem Geburtsgewicht ebenfalls in Abhängigkeit von der Parität betrachtet. Verschieden Studien konnten bereits zeigen, dass eine antiparasitäre Chemoprophylaxe während der Schwangerschaft zu geringeren Infektionsraten, weniger schweren Verläufen und zu niedrigeren peripheren und plazentaren Parasitendichten führt. Daraus folgten wiederum höhere mütterliche Hämoglobinwerte, weniger Frühgeburtslichkeit und

ein durchschnittlich höheres Geburtsgewicht der Neugeborenen (Cot *et al.*, 1995, 1998; Verhoeff *et al.*, 1998; Shulman *et al.*, 1999; Salihu *et al.*, 2000; Garner & Gulmezoglu, 2006). Als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in einem Gebiet mit zeitgleich festgestellter, ausgeprägter Pyrimethaminresistenz die prophylaktische Einnahme von Pyrimethamin einen Einfluss auf die Prävalenz plazentarer Infektionen mit *P. falciparum* und auf die klinische Manifestation der Infektion in der Studienpopulation hatte. Desweiteren wurde der maternofetale Transfer von Pyrimethamin und Chloroquin bestimmt. Es gibt bisher wenige Untersuchungen zur quantitativen und qualitativen Einordnung der maternofetalen Übertragung antiparasitärer Chemoprophylaktika und ob bzw. inwieweit ein Zusammenhang mit einer vorliegenden plazentaren *P. falciparum*-Infektion und einer neonatalen *P. falciparum*-Infektionen existiert. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

*Primiparae* sind besonders gefährdet durch plazentare *P. falciparum*-Infektionen.

Plazentare – besonders Malariapigment-positive – Infektionen mit *P. falciparum* resultierten in einer erhöhten Prävalenz von mütterlicher Anämie, Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht besonders bei *Primiparae*.

Es konnten keine kongenitalen *P. falciparum*-Infektionen nachgewiesen werden.

Die Einnahme von Pyrimethamin reduzierte zwar bei den *Primiparae* die Prävalenz plazentarer Infektionen aber nur in geringem Ausmass. Bei *Multiparae* war der Effekt nicht signifikant.

Lediglich bei den *Primiparae* reduzierte sich das Risiko einer Anämie durch die Einnahme von Pyrimethamin. Auf die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht hatte Pyrimethamin keinen signifikanten Einfluss, unabhängig von der Parität.

Das maternofetale Übertragungsverhältnis von Pyrimethamin und Chloroquin war unabhängig von einer vorliegenden plazentaren Infektion linear.

#### 4.2.1 Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft

Bereits 1930 registrierte Butler bei 18 % von 328 Gebärenden in Ghana mittels Mikroskopie von „Dicken Tropfen“ aus peripheren Blutproben eine *P. falciparum*-Infektion. Noch heute wird in Afrika die Diagnose einer Malaria in der Schwangerschaft anhand einer mikroskopisch detektierten Parasitämie gestellt. Dieses Vorgehen erfasst nur einen Teil der tatsächlich vorliegenden Infektionen während der Schwangerschaft (Desowitz & Alpers, 1992; Leke *et al.* 1999; Mockenhaupt *et al.* 2002). So lag im Studiengebiet die Prävalenz einer mikroskopisch sichtbaren Parasitämie im peripheren Blut der Schwangeren mit 19,2 % im gleichen Bereich wie vor siebzig Jahren. Die Prävalenz der tatsächlich vorliegenden *P. falciparum*-Infektionen, die sich mittels PCR aus plazentaren Blutproben diagnostizieren ließ, war mit 59,6 % fast dreimal so hoch. Desowitz & Alpers (1992) wiesen bei Schwangeren in Papua-Neu-Guinea nur bei ca. der Hälfte der Frauen mit nachgewiesener plazentarer Infektion eine periphere Parasitämie nach. Mittels Mikroskopie eines „Dicken Tropfens“ aus einer plazentaren Blutprobe ließ sich bei der Studiengruppe immerhin eine Infektionsprävalenz von 34,3 % ermitteln und lag damit bei ähnlichen Werten wie in vergleichbaren Studien im tropischen Afrika (McGregor, 1983, Brabin, 1983; Sullivan *et al.*, 1999). Die Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta bietet eine Erklärung für diese Beobachtungen (Fried and Duffy, 1996).

Die Häufigkeit einer plazentaren Infektion und die plazentaren Parasitendichten nahmen mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl ab. Der Anteil submikroskopischer Infektionen, die sich zwar mittels PCR, nicht aber mittels Mikroskopie nachweisen lassen, stieg dagegen mit zunehmender Anzahl an Schwangerschaften an. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien zur Epidemiologie der plazentaren und peripheren *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft. *Primiparae* sind besonders gefährdet sich mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft zu infizieren (Brabin, 1983; McGregor, 1983; Alecrim *et al.*, 2000; Steketee *et al.* 2001; Okoko *et al.* 2002) und haben höhere Parasitendichten (Ismail *et al.*, 2000), während *Multiparae* einen größeren Anteil an schwieriger zu detektierenden submikroskopischen Infektionen zeigen (Bottius *et al.*, 1996; Mockenhaupt *et al.* 2000a). Diese Ergebnisse lassen sich mit der Entwicklung einer stammesspezifischen Immunität gegenüber CSA-bindenden *P. falciparum*-Subspezies und folglich geringerer plazentarer Sequestrierung mit zunehmender Anzahl an Schwangerschaften erklären (Fried and Duffy 1996; Beeson and Duffy 2005; Duffy and Fried 2005). *In vitro* gelang es Ricke *et al.* (2000) mit den Seren schwangerer *Multigravidae* aber nicht mit den Seren von *Primigravidae* die Adhäsion von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten an CSA zu hemmen.

Leukozyten-assoziiertes Pigment oder Hämozoïn fand sich bei 30,4 % der Schwangeren. Studien, die den Pigmentnachweis mittels histologischer Untersuchung der Plazenten vornahmen und damit nicht nur Leukozyten-assoziiertes Pigment sondern auch Pigment in Fibrinablagerungen und der Basalmembran der Plazenta nachweisen konnten, verzeichneten höhere Prävalenzen für plazentares Malariapigment (Walter, 1982; Bulmer *et al.*, 1993b; Ismail *et al.*, 2000).

Die Prävalenz von Malariapigment nahm deutlich mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl ab (P1: 41,8 % vs. P2&3: 28,8 % vs. P $\geq$ 4: 16,9 %). Bulmer *et al.* (1993b) erklärt diesen Umstand mit der verminderten Elimination von Parasiten aus der Plazenta bei Erstgebärenden im Gegensatz zu den *Multigravidae*. Zudem spiegelt sich an diesem Befund die erhöhte Infektionsprävalenz von *Primiparae*, da das Pigment generell nur langsam abtransportiert wird. Weitere Studien wiesen ebenfalls bei Erstgebärenden eine höhere Pigmentprävalenz nach als bei Mehrgebärenden (McGready *et al.*, 2002).

Ältere Schwangere zeigten niedrigere Infektionsprävalenzen als jüngere Frauen unabhängig von der Nachweismethode der Infektion. Da im Studiengebiet ein höheres Lebensalter deutlich mit einer höheren Parität assoziiert war, ist im Falle der Schwangerschafts-assoziierten Malaria sicherlich der Effekt der Parität auf den Erwerb einer Semiimmunität entscheidender als der des Alters. Allerdings sinkt auch für die nicht-schwangere Bevölkerung eines Endemiegebietes die Prävalenz und die Mortalität einer *P. falciparum*-Infektion deutlich mit zunehmendem Alter (Bull *et al.*, 1998; Steketee *et al.*, 2001).

## **4.2.2 Klinische Manifestation der plazentaren Infektion**

### **4.2.2.1 Mutter**

Fieber (Temperatur  $\geq 37,5$  °C) war in der Studienpopulation eine seltene Manifestation der plazentaren Malaria: nur 3,5 % der PCR-positiven und 3,9 % der Pigment-positiven Schwangeren waren fieberhaft. Dieser Umstand stellt den Stellenwert dieses Symptoms für die Diagnostik einer Malaria in Frage. Die geringe Assoziation von Fieber mit der Infektion bestätigt den auch schon in anderen Studien beschriebenen chronischen und oligosymptomatischen Verlauf der *P. falciparum*-Infektion in hochendemischen Gebieten (Bottius *et al.*, 1996; Roper *et al.*, 1996). Aufgrund der Seltenheit von Fieber in der Studiengruppe wurde es nicht als klinisch relevante Manifestation einer *P. falciparum*-Infektion gewertet.

Ungefähr ein Drittel der Schwangeren waren zum Zeitpunkt der Entbindung anämisch, davon zeigten nur 5 % eine hochgradige Anämie (Hb < 7 mg/dl). Andere Studien, die die Prävalenz der Anämie während der Schwangerschaft untersuchten, konnten wesentlich höhere Prävalenzen für

Anämie nachweisen (Shulman *et al.*, 1996; Mockenhaupt *et al.*, 2000b; Rogerson *et al.*, 2003). Dies lässt sich damit erklären, dass die Hämoglobinspiegel zum Zeitpunkt der Geburt physiologischerweise wieder höher sind als im Verlauf der Schwangerschaft (Brabin *et al.*, 1990a).

Eine plazentare Infektion mit *P. falciparum* ging mit einem zweifach erhöhten Risiko der Mutter für Anämie einher. Vor allen Dingen Pigment-positive Infektionen zeigten auch in den multivariaten Analysen eine besondere klinische Relevanz als Risikofaktor für Anämie. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung plazentarer Malaria als Ursache von Schwangerschafts-assoziiertes Anämie in Endemiegebieten. Erstgebärende zeigten eine größere Reduktion des Hb-Wertes durch eine Infektion als Mehrgebärende. Dies zeigt zum einen wiederum die erhöhte Vulnerabilität Erstgebärender für plazentare Malaria und ihre klinischen Manifestationen und zum anderen den protektiven Effekt der zunehmenden Immunität bei Mehrfachgebärenden. Außerdem verdeutlicht die hohe Prävalenz von Anämie bei den nicht-infizierten *Multigravidae* und in der Gesamtgruppe, die multifaktorielle Genese von Anämie in der Schwangerschaft (Menendez *et al.*, 2000a).

Die besondere pathophysiologische Bedeutung einer chronischen plazentaren *P. falciparum*-Infektion für das Entstehen einer chronischen Anämie während der Schwangerschaft wurde in verschiedenen Studien untersucht (Übersicht in Menendez *et al.*, 2000a). Grundlage des Pathomechanismus der Malaria-assoziiertes Anämie ist die Zerstörung und die verminderte Produktion von Erythrozyten. So kommt es bei einer akuten *P. falciparum*-Infektion bei Nichtimmunen in den ersten Tagen zu einer akuten Hämolyse und Erythrozytendestruktion durch Ruptur und Phagozytose sowohl von befallenen als auch von nicht-befallenen Erythrozyten sowie zu einer verstärkten Erythrozyten-Elimination in der Milz und im retikuloendothelialen System (Davis *et al.*, 1990; Phillips & Pasvol, 1992). Die Hämolyse scheint vor allem bei Infizierten ohne bestehende Immunität von großer Bedeutung zu sein (Menendez *et al.*, 2000a). Im Verlauf einer chronischen Infektion scheinen allerdings der pathophysiologische Effekt einer entzündungsbedingten Knochenmarksuppression (Phillips *et al.*, 1986) mit nachfolgender Dyserythropoese und Retikulozytopenie (Clark & Chaudhri, 1988) sowie verschiedene andere immunmodulatorische Effekte wie u. a. die Suppression der Erythropoetinbildung (El Hassan *et al.*, 1997) und das Ungleichgewicht von Zytokinen (Kurtzhals *et al.*, 1998) entscheidend zu sein.

Wichtige weitere Risikofaktoren für das Entstehen einer Anämie während der Schwangerschaft sind andere parasitäre und virale Infektionen wie z. B. HIV, Hakenwürmer und Bilharziose. Außerdem spielen nutritive Faktoren wie Eisen- und Folsäuremangel eine Rolle sowie

genetische Effekte durch hereditäre Hämoglobinopathien (Phillips & Pasvol, 1992; Dreyfuß *et al.*, 2000, Rogerson *et al.* 2003). Im Studiengebiet konnte ein Eisenmangel nur selten nachgewiesen werden, allerdings konnten neben Malaria andere Infektionen und die homozygote Form der  $\alpha$ -Thalassämie als Risikofaktoren für Anämie identifiziert werden (Mockenhaupt *et al.*, 2000b). Daten aus dem Jahr 2005, die in Ghana bei Schwangeren während der Vorsorge erhoben wurden, zeigten eine HIV-Prävalenz von 2,7 % (Ghana Aids Commission, 2005), so dass im Studiengebiet eine *P. falciparum*-Infektion, andere Infektionen und Hämoglobinopathien hauptverantwortlich für das Auftreten der Anämie in der Schwangerschaft zu sein scheinen.

#### 4.2.2.2 Neugeborenes

Etwa jede fünfte Frau (18,9 %) brachte ihr Kind zu früh zur Welt. Das Risiko einer Frühgeburt nahm mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl ab (P1: 26,1 %; P2&3: 15,6 % und P $\geq$ 4: 12,4 %). Die hohe Anfälligkeit Erstgebärender in Endemiegebieten für Frühgeburtlichkeit belegte bereits Brabin (1990a). Eine plazentare Infektion zeigte eine hohe klinische Relevanz für das Auftreten von Frühgeburtlichkeit. Diese Assoziation von plazentarer Infektion und Frühgeburtlichkeit wiesen bereits andere Studien nach (Sullivan *et al.*, 1999; Menendez *et al.*, 2000b, Osman *et al.*, 2001; Okoko *et al.*, 2002).

Erwartungsgemäß war ein großer Teil der zu früh geborenen Kinder untergewichtig (49 %), während nur 8,5 % der termingerechten Neugeborenen ein Geburtsgewicht < 2500 g d. h. eine intrauterine Wachstumsretardierung zeigten. Die Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht in der Gesamtgruppe lag bei 16,2 %. Bei den *Primiparae* war gut ein Viertel der Neugeborenen untergewichtig. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen anderer Studien in ländlichen Endemiegebieten Afrikas (Steketee *et al.*, 1996; Menendez *et al.*, 2000b; Okoko *et al.*, 2002). Eine Pigment-positive plazentare *P. falciparum*-Infektion ging mit einem erhöhten Risiko einher, ein untergewichtiges Kind zur Welt zu bringen. Allerdings zeigte die Stratifizierung in die Paritätsgruppen diesbezüglich nur eine Signifikanz für *Primiparae*. Der Zusammenhang zwischen plazentarer Infektion und niedrigem Geburtsgewicht vor allem bei Erstgebärenden wurde bereits mehrfach beschrieben (Mc Gregor, 1983; Le Hesran *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998; Menendez *et al.*, 2000b; Okoko *et al.*, 2002; N'Dao *et al.*, 2006; Kayentao *et al.*, 2007).

Eine chronisch-rezidivierende plazentare *P. falciparum*-Infektion bewirkt wahrscheinlich über die chronische Entzündungsreaktion mit erhöhter Expression von Entzündungsmediatoren (u. a. TNF $\alpha$ , Interferon und Interleukin-2 und 10) eine plazentare Insuffizienz mit Behinderung der



uteroplazentaren Blutzirkulation und damit des maternofetalen Transfers. Weiterhin führt die Sequestration von Parasiten in der Plazenta auch zur direkten endothelialen Dysfunktion und damit zu einem erhöhten Risiko für Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht (Fried *et al.*, 1998a; Dorman *et al.*, 2002; Crocker *et al.*, 2004). Außerdem zeigte die erhöhte Konzentration der proinflammatorischer Zytokine – besonders TNF $\alpha$  – im plazentaren Gewebe, die sowohl durch die akute als auch die chronisch-rezidivierende plazentare Infektion verursacht wird, eine deutliche Assoziation mit dem Auftreten von Frühgeburtlichkeit (Menendez *et al.*, 2000b), niedrigem Geburtsgewicht (Rogerson *et al.*, 2003) und intrauteriner Wachstumsretardierung (Moormann *et al.*, 1999; Okoko *et al.*, 2002).

Der wichtigste Risikofaktor sowohl für Frühgeburtlichkeit als auch für niedriges Geburtsgewicht war die mütterliche Anämie. Dieser Zusammenhang wurde bereits in anderen Studien sowohl für Frühgeburtlichkeit als auch für niedriges Geburtsgewicht nachgewiesen. Die klinischen Effekte der plazentaren Malaria werden vermutlich vor allem durch die mütterliche Anämie verursacht (Allen *et al.*, 1998; Lone *et al.*, 2004; Tako *et al.*, 2005). Die chronische Entzündung der Plazenta durch die Infektion fördert wiederum die mütterliche Anämie.

#### **4.2.3 Einfluss der Schwangerschaftsvorsorge auf die Infektionsprävalenz**

Der Besuch der Schwangerschaftsvorsorge reduzierte deutlich die Infektionsprävalenz. Ein häufiger Besuch der Schwangerschaftsvorsorge verminderte auch die Prävalenz von Anämie, niedrigem Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit, wie es schon in anderen Studien beschrieben wurde (Prazuck *et al.*, 1993; Rogerson *et al.*, 2003).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die engmaschige möglichst kostenfreie Betreuung von Schwangeren die regelmäßige Einnahme antiparasitärer Medikamente und die Aufklärung der Frauen hinsichtlich anderer Malaria-präventiver Maßnahmen z. B. die Verwendung von Moskitonetzen fördert (WHO, 2003a).

Die Anpassung der Aufklärung und Betreuung während der Schwangerschaft an den sozio-kulturellen und sozio-ökonomischen Hintergrund der Frauen ist eine große Herausforderung (Ribera *et al.*, 2007). Verschieden Studien konnten zeigen, dass das Verständnis der Frauen, was eine *P. falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft bedeutet, nur sehr begrenzt vorhanden ist (Nganda *et al.*, 2004; Launiala *et al.*, 2006).

#### 4.2.4 Prävalenz von Pyrimethamin

Obwohl fast alle der untersuchten Schwangeren angaben, regelmäßig Pyrimethamin als Prophylaxe in der Schwangerschaft eingenommen zu haben, ließen sich zum Zeitpunkt der Entbindung nur bei 35,7 % der Gebärenden Pyrimethaminspiegel von  $\geq 10$  ng/ml im Plasma nachweisen. Bei weiteren 42,5 % war zwar Pyrimethamin nachweisbar jedoch in einem grenzwertigen Bereich zwischen 1-9 ng/ml. Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) wurde von den Frauen zum Studienzeitpunkt nur selten eingenommen (Mockenhaupt *et al.*, 2001), so dass davon auszugehen ist, dass der Pyrimethaminnachweis einer Einnahme von Pyrimethamin als Einzelpräparat entspricht. Obige Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen einer Vorstudie im Studiengebiet von 1998, wo sich bereits eine große Diskrepanz zwischen Medikamentenanamnese und tatsächlich nachweisbaren Pyrimethaminspiegeln – allerdings im Urin – zeigte. Die Hauptursache für das häufige Vorliegen grenzwertiger Spiegel, liegt anderen Untersuchungen zufolge in der mangelnden Compliance der Patientinnen und der daraus resultierenden unregelmäßigen Einnahme der Medikamente (Kaseje *et al.* 1987; Heymann *et al.*, 1990). Sozioökonomische Gründe und mangelhafte Verfügbarkeit spielen dabei eher eine Rolle als der Mangel an Motivation bei Schwangeren und dem medizinischen Personal (Matola *et al.*, 1985). Eine Studie der WHO (2003c) stellte außerdem fest, dass 20-90 % der Präparate in Afrika nicht dem Standard entsprechen, was unabhängig von der Compliance ein weiterer Grund für das Vorliegen subprophylaktischer Plasmaspiegel sein könnte.

Bei einer wöchentlichen Gabe von 25 mg Pyrimethamin hat Weidekamm *et al.* (1982) eine mittlere Plasmakonzentration von 80 ng/ml mittels einer Computersimulation postuliert. Bergqvist *et al.* (1985) hat bei wöchentlicher Einnahme von Sulfadoxin (500 mg) und Pyrimethamin (25 mg) mittlere Pyrimethaminkonzentrationen im Plasma von 155 ng/ml gemessen. Die durchschnittliche Plasmakonzentration aller Frauen, bei denen Pyrimethamin zum Zeitpunkt der Geburt nachweisbar war, lag in der vorliegenden Studie mit 43 ng/ml deutlich unter diesen Werten, was sowohl durch eine unregelmäßige Einnahme als auch durch mangelhafte Präparate zu erklären ist. Ob eine veränderte Pharmakokinetik von Pyrimethamin während der Schwangerschaft vorliegt, wurde bisher nicht untersucht.

Die grenzwertigen Spiegel wurden miteinbezogen unter der Annahme, dass wenn am Ende der Schwangerschaft Pyrimethamin nachweisbar ist, im Verlauf der Schwangerschaft auch höhere Spiegel vorgelegen haben könnten. Genauso wie umgekehrt die Probandinnen mit prophylaktischen Spiegeln zum Zeitpunkt der Geburt u. U. während der Schwangerschaft intermittierend grenzwertige Spiegel hatten.

Die prophylaktisch gegen *Plasmodium falciparum* wirksame Plasmakonzentration ist für Pyrimethamin allein nicht gesondert untersucht worden. In einer Studie wurde eine minimale Hemmkonzentration von 4-6 ng/ml bezüglich einer *P. falciparum*-Infektion für Pyrimethamin bestimmt (Edstein *et al.*, 1990). Andere Untersucher gaben eine minimale Hemmkonzentration für sensitive Erreger von 9,9 ng/ml an (Smalley & Brown, 1982). Daraus lässt sich ableiten, dass bei dem in dieser Arbeit gewählten Grenzwert prophylaktischer Pyrimethaminspiegel von  $\geq 10$  ng/ml (Eggelte, 1990) zumindest sensitive Erreger abgetötet werden sollten. Im Umkehrschluss muss davon ausgegangen werden, dass Plasmodien, die trotz dieses Spiegels nachweisbar waren, unterschiedliche Grade von Resistenz aufweisen.

Ein Wohnort in der Stadt, ein höheres Bildungsniveau und die häufige Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge waren deutlich mit dem Vorliegen von Pyrimethaminspiegeln im Blut assoziiert, was dafür spricht, dass die Compliance der Schwangeren deutlich zu erhöhen ist durch eine Verbesserung der Betreuung, Information und Aufklärung sowie durch verbesserte Infrastruktur und sozioökonomische Bedingungen (Nganda *et al.*, 2004; Launiala *et al.*, 2006; Ribera *et al.*, 2007).

#### **4.2.5 Prävalenz von Chloroquin**

In der Studiengruppe hatten 17,8 % der Frauen Chloroquin im Plasma. Die häufige Selbstmedikation mit Chloroquin wurde schon in anderen Studien beschrieben (Foster *et al.*, 1991; Akanbi *et al.*, 2005) und bestätigte sich auch für Ghana (Buabeng *et al.*, 2007). Diese unkontrollierte Einnahme erklärt, warum sich in vielen Probandengruppen bereits vor Therapie- oder Prophylaxebeginn Chloroquin im Urin und im Blut nachweisen lässt (Greenberg *et al.*, 1989; Fadat *et al.*, 1991; Hellgren *et al.*, 1994).

Weder die Herkunft noch das Alter, die Parität, die Teilnahme an der Schwangerschaftsvorsorge und das Bildungsniveau waren mit der Chloroquinprävalenz assoziiert. Chloroquin zeigte außerdem keinen signifikanten Einfluss auf die Prävalenz einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum*. Auch auf die klinischen Manifestationen der plazentaren Malaria – Fieber, Anämie, niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtslichkeit – zeigte die Anwesenheit von Chloroquin keinen wesentlichen Effekt. Deswegen wird die Prävalenz von Chloroquin nur noch bezüglich des maternofetalen Transfers diskutiert.

#### 4.2.6 Effekt von Pyrimethamin auf die Prävalenz plazentarer Infektionen

Pyrimethamin hatte sogar im prophylaktischen Bereich bei den 770 Schwangeren unabhängig von der Nachweismethode der *P. falciparum*-Infektion in den multivariaten Risikoanalysen nur teilweise einen protektiven Effekt. In den univariaten Analysen hatten Schwangere, besonders *Primiparae*, ohne Pyrimethamin im Blut, zwar häufiger eine plazentare *P. falciparum*-Infektion, dennoch wiesen mehr als die Hälfte aller Gebärenden mit prophylaktischen Pyrimethaminspiegeln eine plazentare Infektion mit *P. falciparum* auf. Bei den *Multiparae* war ein positiver Effekt der Prophylaxe nur tendenziell zu sehen. Allerdings zeigte sich ein signifikant abnehmender Trend der Infektionsprävalenz mit steigendem Pyrimethaminspiegel, was die Bedeutung der Compliance und somit der regelmäßigen Einnahme einer antiparasitären Chemoprophylaxe unterstreicht.

Es gibt keine vergleichbaren Studien, die die antiparasitären Effekte von Pyrimethamin als Einzelprophylaxe in der Schwangerschaft untersuchten. Die existierenden Studien sind entweder sehr alt (veränderte Resistenzlage), nicht mit Schwangeren durchgeführt worden, verwenden andere Dosierungen und/oder haben deutlich geringere Fallzahlen (Covell *et al.*, 1953; Morley *et al.*, 1964; Nahlen *et al.*, 1989). Außerdem wurde der Nachweis der *P. falciparum*-Infektion in den meisten Studien mittels Mikroskopie durchgeführt und die plazentaren Infektionen wurden nicht gesondert untersucht.

Garner *et al.* (2006) konstatierte in einer zusammenfassenden Beurteilung von 16 Studien aus den Jahren 1964-2005, dass generell die Einnahme einer antiparasitären Prophylaxe (verschiedene Präparate) bzw. die Durchführung von IPT während der Schwangerschaft vor allen Dingen bei *Primiparae* zu einer signifikanten Reduktion von plazentaren und peripheren *P. falciparum*-Infektionen führte. Weitere Studien im tropischen Afrika konnten zeigen, dass eine antiparasitäre Chemoprophylaxe wiederum besonders bei *Primiparae* die Prävalenz peripherer und plazentarer Infektionen mit *P. falciparum* minderte (Schultz *et al.*, 1994; Verhoeff *et al.*, 1998; Parise *et al.*, 1998; Challis *et al.*, 2004; Falade *et al.*, 2007). Vor allen Dingen die Gabe von Sulfadoxin-Pyrimethamin als IPT war auch bei vorliegender HIV-Infektion trotz zunehmender Resistenzen effektiv (ter Kuile *et al.*, 2007).

Schon um 1960 wurden in Westafrika Pyrimethamin-resistente Stämme nachgewiesen (Archibald *et al.*, 1960; Dodge *et al.*, 1966). In Nigeria wurde die mangelnde Wirksamkeit von Pyrimethamin als alleinige antiparasitäre Prophylaxe aufgrund parasitärer Resistenzen nochmals 1989 von Nahlen *et al.* postuliert: Frauen, die Pyrimethamin als Prophylaxe erhielten, waren genauso häufig mit *P. falciparum* infiziert wie Schwangere ohne Prophylaxe. Der geringe protektive Effekt der Prophylaxe war bei Nahlen im Gegensatz zur vorliegenden Studie sogar

noch geringer bei den *Primiparae*. Dennoch wurde Pyrimethamin sowohl in Nigeria als auch in Ghana weiterhin als Malaria-Prophylaxe in der Schwangerschaft verwendet. Mockenhaupt *et al.* fanden 1998 im Rahmen einer Vorstudie in der gleichen Studienregion in Ghana eine hohe Prävalenz Pyrimethamin-resistenter Plasmodienstämme bei schwangeren Frauen. Da die Studie nicht zum Zeitpunkt der Geburt sondern während der Schwangerschaft im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge durchgeführt wurde, konnten plazentare Parasitämien und die Auswirkungen der Infektion auf das Neugeborenen nicht untersucht werden. Es zeigte sich aber, dass die *Primigravidae* von der antiparasitären Prophylaxe mit Pyrimethamin profitierten und weniger periphere Parasitämien und geringere Parasitendichten aufwiesen (Mockenhaupt *et al.*, 2001). Dies mag u. a. erklären, warum Pyrimethamin im Studiengebiet weiterhin zur Chemoprophylaxe bei Schwangeren eingesetzt wurde. Ein weiterer Grund liegt möglicherweise in dem Mangel an Alternativpräparaten.

Die Effektivität einer Prophylaxe wird hauptsächlich beeinflusst durch parasitäre Resistenzen und die Compliance der Schwangeren. Letztere wird wiederum neben der Qualität von Aufklärung und Betreuung u. a. durch die Nebenwirkungen der Medikamente auf Mutter und Fetus bestimmt. Andere Faktoren, die einen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Prophylaxe haben könnten, sind eine möglicherweise veränderte Pharmakokinetik eines Wirkstoffes bei Schwangeren, sowie Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und die Qualität der Präparate.

Da die meisten antiparasitären Prophylaktika ohne eine angemessene toxikologische und teratogene Analyse auf der Basis einer Risiko-/Nutzen-Abwägung in der Schwangerschaft angewendet werden müssen, ist über die Nebenwirkungen der verabreichten prophylaktischen Dosen bei Schwangeren wenig bekannt. Im Gegensatz zum Pruritus induzierenden Chloroquin (Osifo, 1984; Matola *et al.*, 1985) scheint die prophylaktische Gabe von 25 mg Pyrimethamin bisher keine bekannten Nebenwirkungen, die unmittelbar die Compliance beeinflussen, zu haben (White *et al.*, 1985). Das teratogene Risiko der niedrigen prophylaktischen Dosen von Pyrimethamin scheint ebenfalls gering zu sein (Harpey *et al.*, 1983a und b). Aktuellere Studien befürworten die Gabe von Pyrimethamin mit Sulfadoxin in Form von IPT in der Schwangerschaft und attestieren für die Standarddosierungen geringe Nebenwirkungen und Toxizität (Peters *et al.*, 2007).

Es ist nicht bekannt, ob sich die Pharmakokinetik von Pyrimethamin während der Schwangerschaft ändert. Immerhin scheint bei schwangeren Frauen die Pharmakokinetik für Chloroquin verändert zu sein. Massele zeigte 1997 in Ghana, dass die durchschnittliche renale Elimination in der mittleren bis späten Phase der Schwangerschaft gegenüber der

durchschnittlichen nicht-schwangeren Bevölkerung um 12 % erhöht und damit die durchschnittliche Halbwertszeit verkürzt war. Salihu *et al.* (2000) vermutete, dass die verminderte prophylaktische Wirkung von Chloroquin auf plazentare *P. falciparum*-Infektionen u. U. auf die verringerte Bioverfügbarkeit von Chloroquin in der Plazenta zurückgeführt werden kann, in der sich die Parasiten sequestrieren. Für Pyrimethamin gibt es diesbezüglich keine Untersuchungen.

Medikamenteninteraktionen von Pyrimethamin z. B. mit Folsäure sind ebenfalls nicht auszuschließen. Viele der untersuchten Schwangeren gaben eine Folateinnahme an. Die Befürchtung (Carter *et al.*, 2005; White *et al.*, 2006), dass eine Folatsubstitution die Wirkung der Folatantagonisten hemmen könnte, hat sich bisher nicht bestätigt. Die exogene prophylaktische Zufuhr von niedrigen Folsäuregaben (500 µg/d) beeinträchtigte die Wirkung nicht. Es scheint außerdem, dass Protozoen die exogen zugeführte Folsäure nicht aufnehmen können (White *et al.*, 1985; Forth, 1996; Hyde, 2005; Mbaye *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007). Da die Wirkung von Pyrimethamin auf die menschliche Dihydrofolatreduktase mindestens 200 Mal geringer ist als auf diejenige der Protozoen sind zytotoxische Effekte, z. B. auf die Blutbildung beim Menschen unwahrscheinlich (Estler, 2000).

Ein großes Problem ist neben der mangelnden Verfügbarkeit von Alternativpräparaten, dass die Qualität der in Afrika erhältlichen Präparate in 20-90 % nicht dem Standard zu entsprechen scheint (WHO, 2003b). Keine der Prophylaxe/IPT-Studien gibt an, ob die Wirksamkeit der eingenommenen Präparate getestet wurde. Auch in der vorliegenden Studie ist die Qualität der Präparate nicht untersucht worden.

#### **4.2.7 Effekt von Pyrimethamin auf die klinischen Befunde**

##### **4.2.7.1 Anämie**

Vorhandene Pyrimethaminspiegel reduzierten das Risiko einer Anämie sowohl bei den infizierten Schwangeren als auch in der Gesamtgruppe. In der multivariaten Analyse waren nur prophylaktische Spiegel ausreichend für eine signifikante Reduktion des Anämierisikos.

Nach Stratifizierung in die Paritätsgruppen zeigte sich vor allen Dingen für die *Primiparae* ein deutlicher Zusammenhang: Die mittleren Hämoglobinspiegel waren bei den nicht-infizierten *Primiparae* mit prophylaktischen Pyrimethaminspiegeln ca. 1 g/dl höher als bei den Schwangeren ohne Pyrimethamin im Blut. Weiterhin zeigte sich ein deutlich abnehmender Trend der Anämieprävalenz mit zunehmendem Pyrimethaminspiegeln sowohl bei den infizierten

als auch bei den nicht-infizierten Schwangeren. Dennoch hatte mehr als ein Drittel der Frauen mit Pyrimethaminspiegeln im prophylaktischen Bereich eine Anämie.

Die bereits zuvor zitierten Studien, die ebenfalls Pyrimethamin als alleinige antiparasitäre Prophylaxe in der Schwangerschaft betrachteten, haben die Prävalenz von Anämie nicht berücksichtigt (Morley, 1964; Nahlen *et al.*, 1989), so dass ein Vergleich nur mit Studien möglich ist, die den Einfluss anderer Präparate als antiparasitäre Chemoprophylaxe auf das Vorliegen mütterlicher Anämie während der Schwangerschaft untersucht haben.

Garner & Gulmezoglu (2006) kamen in ihrer Zusammenfassung von 16 Studien zur antiparasitären Prophylaxe bzw. IPT während der Schwangerschaft zu folgenden Ergebnissen: Schwangere Erst- und Zweitgebärende, die eine Prophylaxe oder IPT einnahmen, hatten ein deutlich reduziertes Risiko anämisch zu sein, als die Schwangeren ohne Prophylaxe (Fleming *et al.*, 1989; Shulman *et al.*, 1999; Ndomugenyi *et al.*, 2000). Dieses entspricht hinsichtlich der Erstgebärenden den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Studien, die Schwangere unabhängig von der Parität betrachteten, konnten keinen signifikanten Vorteil durch eine Prophylaxeinnahme auf die Prävalenz von Anämie bei den Schwangeren feststellen (Nosten *et al.*, 1994). Weitere Studien in Afrika konnten zeigen, dass eine antiparasitäre Chemoprophylaxe besonders bei *Primiparae* das Risiko von Anämie mindert (Schultz *et al.*, 1994; Verhoeff *et al.*, 1996; Parise *et al.*, 1998; Rogerson *et al.*, 2000; Challis *et al.*, 2004; Falade *et al.*, 2007). Vor allen Dingen IPT mit Sulfadoxin-Pyrimethamin hatte einen protektiven Effekt gegen Schwangerschafts-assoziierte Anämie (ter Kuile *et al.*, 2007).

#### **4.2.7.2 Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht**

Das Risiko für niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit wurde in der Studiengruppe durch die Einnahme von Pyrimethamin nicht reduziert. Auch in der Gruppe der *Primiparae* zeigten sich keine signifikanten positiven Effekte der Prophylaxe für das Neugeborene. Pyrimethamin minderte allenfalls indirekt über eine Risikominderung für Anämie (s. o.), die hauptverantwortlich für die klinischen Folgen einer *P. falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft zu sein scheint (Msolla *et al.*, 1997; Shulman *et al.*, 2001), das Risiko für das Auftreten von Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht.

In der Metaanalyse von Garner und Gulmezoglu (2006) zeigte sich durch die Einnahme einer antiparasitären Chemoprophylaxe oder IPT für Erst- und Zweitgebärende ein gemindertetes Risiko, ein untergewichtiges Neugeborenes zur Welt zu bringen (Morley, 1964; Parise *et al.*, 1998; Ndyomugenyi *et al.*, 2000; Cot *et al.*, 2002; Challis *et al.*, 2004). Wiederum konnten

Studien, die Schwangere unabhängig von der Parität betrachteten, keinen signifikanten Vorteil durch eine Prophylaxeinnahme auf die Prävalenz von Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht feststellen (Nosten *et al.*, 1994).

Weitere Studien konnten eine deutliche Reduktion der Prävalenz von niedrigem Geburtsgewicht durch die Anwendung von  $\geq 2$  SP-Gaben als IPT nachweisen (Verhoeff *et al.*, 1998; Rogerson *et al.*, 2000; Njagi *et al.*, 2003).

#### **4.2.7.3 Kongenitale Malaria**

In den meisten der vorliegenden Studien zur kongenitalen Malaria wurde die Diagnose mittels Nabelschnurblut erhoben. In den Studien, die peripheres Blut der Neugeborenen untersuchten, waren die Prävalenzen niedriger bzw. wie in der vorliegenden Studie bei 0 % (Akindede *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 1997; Runsewe-Abiodun *et al.*, 2006, Menendez *et al.*, 2007). Möglicherweise sind die Parasitämien im Nabelschnurblut durch eine Kontamination mit mütterlichem infiziertem Blut verursacht worden. Durch den Nachweis mittels PCR lassen sich nun auch submikroskopische Infektionen bei den Neugeborenen erfassen, gleichzeitig steigt die Bedeutung der Kontamination. Zwei Metaanalysen zur kongenitalen Malaria postulieren dennoch die Zunahme der Prävalenz kongenitaler Malaria in den Endemiegebieten (Menendez *et al.*, 2007; Uneke *et al.*, 2007). Als mögliche Ursachen werden u. a. höhere Parasitämien bei den Müttern durch die zunehmende Resistenzentwicklung gegen die antiparasitären Medikamente diskutiert (Chabasse *et al.*, 1988; Airede, 1991) und eine zunehmende Virulenz der Parasiten (Akindede *et al.*, 1993). Es wurde außerdem postuliert, dass u. U. wegen der eingenommenen antiparasitären Chemoprophylaxe ein reduzierter Antikörpertransfer von der Mutter auf das Kind erfolgt und dadurch das Risiko einer kongenitalen Malariainfektion steigt (Ibeziako & Williams, 1980; Staalsoe *et al.*, 2004).

Da sich bei keinem der 770 Neugeborenen mittels PCR einer peripher-venösen Blutprobe eine kongenitale Malaria nachweisen ließ, lässt sich über einen protektiven Effekt der mütterlichen Einnahme einer antiparasitären Prophylaxe keine Aussage machen. Ob die Einnahme von Antimalaria-Medikamenten während der Schwangerschaft einen Einfluss auf die plazentaren Parasitämien, den Zeitpunkt der ersten Malariainfektion bzw. die Entwicklung der Immunität des Neugeborenen und den sogenannten Nestschutz hat, ist noch nicht geklärt. Mutabingwa *et al.* (1993) sah keinen negativen Effekt auf den „Nestschutz“ durch die Einnahme von Chemoprophylaxe in der Schwangerschaft. Aponte *et al.* (2007) postulierten, dass durch die Gabe von Malariaprophylaxe im ersten Lebensjahr möglicherweise die Entwicklung der



Immunität gegenüber *P. falciparum* verzögert wird, was u. U. auch durch die diaplazentar übertragenen Medikamente bewirkt werden könnte. Aufgrund der Halbwertszeiten der in den Endemiegebieten gängigen Malaria-Medikamente, ist von einem Abklingen der Blutspiegel noch während der Phase des Nestschutzes auszugehen. Ein Einfluss auf die Immunitätsentwicklung ist daher wahrscheinlich gering.

#### **4.2.8 Maternofetaler Transfer von Pyrimethamin und Chloroquin**

Die diaplazentare Übertragung von Pyrimethamin und Chloroquin war linear und damit unabhängig von der Konzentration. Die fetalen Spiegel variierten zwischen 60 und 100 % der mütterlichen Spiegel. Auch eine plazentare Infektion veränderte das Übertragungsverhältnis nicht signifikant.

Peytavin *et al.* (2000) postulierte bereits die Unabhängigkeit der plazentaren Transferrate von der mütterlichen Pyrimethaminkonzentration, was für eine passive Diffusion oder einen aktiven Transport, der nicht zu sättigen ist, spräche. Diese Hypothese bezüglich des Transfermechanismus wird gestützt durch die von Trenque *et al.* (1994) festgestellte hohe Lipophilie und damit gute Membranpermeabilität von Pyrimethamin. Die meisten Medikamente passieren die Plazenta über Diffusion (Bourget *et al.*, 1995; van der Aa *et al.*, 1998). In Peytavins *ex vivo* Plazentamodell variierten die fetalen Konzentrationen von 38 - 80 % der mütterlichen Spiegel und waren damit niedriger als in der vorliegenden Studie. Dagegen fanden Dorangeon *et al.* (1990) und Trenque *et al.* (1994) im Rahmen der pränatalen Toxoplasmoseprophylaxe mit SP bei den Neugeborenen Pyrimethamin-Plasmaspiegel, die mit 50 bis 100 % der mütterlichen Konzentrationen den in der vorliegenden Studie gemessenen Transferraten entsprachen.

Für Chloroquin wurden in einem Tiermodell mit Schafen deutlich niedrigere fetale als mütterliche Konzentrationen gemessen (Augustijns *et al.*, 1991). Allerdings zeigten Boyd *et al.* bereits 1976, dass Plazenten von Schafen deutlich weniger permeabel waren als menschliche Plazenten. Für diese unterschiedliche Permeabilität spricht auch, dass Untersuchungen von neonatalem und mütterlichem Plasma für Chloroquin annähernd hundertprozentige Transferraten ergaben (Akintowa *et al.*, 1988). Im Rahmen einer semiquantitativen Analyse in einer anderen Studie ergaben sich fetale Chloroquinkonzentrationen (Urin und Blut) von ca. 50 % der mütterlichen Konzentrationen (Essien *et al.*, 1982).

Für Mefloquin zeigte Barzago *et al.* (1994) in einem *in vitro* Plazentaperfusionsmodell eine annähernd hundertprozentige plazentare Übertragung und postulierte, dass die hohe

Konzentration von Mefloquin in der Plazenta einen besonderen Infektionsschutz für Mutter und Kind bei plazentarer Malaria bietet.

Sowohl die zum diaplazentaren Chloroquin- als auch zum Pyrimethamintransfer vorliegenden Studien variieren deutlich in den Angaben der Transferraten, was wahrscheinlich auf die jeweils unterschiedliche Messmethodik zurückzuführen ist.

Ob die diaplazentar übertragenen Medikamente u. U. einen Schutz vor kongenitaler Infektion darstellen bzw. einen Einfluss auf den Nestschutz oder die Ausbildung der Immunität der Neugeborenen haben, läßt sich aus den vorliegenden Daten nicht ableiten und muß weiter untersucht werden.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Obwohl Pyrimethamin in der vorliegenden Studie zumindest für einen Teil der *Primiparae* noch einen Infektionsschutz zu bieten scheint, ist die Fortführung der Prophylaxe mit Pyrimethamin als Einzelpräparat im Studiengebiet und in von der Resistenzlage vergleichbaren Endemiegebieten nicht sinnvoll. Ursächlich für den Wirkungsmangel der Prophylaxe ist wahrscheinlich die hohe Prävalenz von Pyrimethamin-resistenten Parasiten. Bereits 1998 war die Prävalenz der mit Pyrimethamin-Resistenz assoziierten Hauptmutation am Codon 108 im Studiengebiet bei 81 %. Eine Dreifachmutation (Codon 108, 51 und 59) des DHFR-Gens, die die Pyrimethamin-Resistenz noch verstärkt, war in 36 % der Fälle vorhanden (Mockenhaupt *et al.*, 2001). Zum Studienzeitpunkt im Jahr 2000 lag die nachträglich ermittelte Prävalenz der Hauptmutation bereits bei über 90 % und die der Dreifachmutation bei 52 % (Mockenhaupt *et al.*, im Druck). Das Verhältnis zwischen lokaler Verbreitung der Resistenz-assoziierten Mutationen der Parasiten und noch zufriedenstellender Wirksamkeit der gängigen Malariamedikamente ist entscheidend und schwer zu ermitteln. Die meisten Malariamedikamente müssen trotz verbreiteter Resistenz aus Mangel an Alternativen weiter angewendet werden. So stehen auch in Ghana andere antiparasitäre Medikamente neben Pyrimethamin für die Prophylaxe in der Schwangerschaft praktisch nicht zur Verfügung. Eine ebenfalls denkbare Prophylaxe mit Chloroquin geht insbesondere bei langandauernder Anwendung mit einer geringen Medikamententreue einher aufgrund der bei Afrikanern weitverbreiteten Nebenwirkung des Juckreizes (Osifo, 1984; Matola *et al.*, 1985). Proguanil ist zwar kostengünstig, als Monosubstanz aber ebenfalls von den Pyrimethaminresistenz-vermittelnden Mutationen von *P. falciparum* betroffen (Basco & Ringwald, 2000) und muß außerdem täglich eingenommen werden, was wiederum zu einer mangelhaften Compliance

führen kann. Mefloquin wird erst seit kurzem zur Prophylaxe ab dem zweiten Trimester empfohlen und ist im afrikanischen Kontext prohibitiv teuer. Diese Erwägungen mögen u. a. die lokalen Gesundheitsbehörden, denen die hohe Prävalenz Pyrimethamin-resistenter Erreger (Mockenhaupt *et al.*, 2001) mitgeteilt wurde, dazu bewogen haben, die bereits damals scheinbar inadäquate Substanz weiterhin zu empfehlen.

Um die Ausbildung von Resistenzen über einen verminderten Selektionsdruck zu verhindern bzw. zu verzögern, bietet sich die intermittierende Gabe von Kombinationspräparaten an (WHO, 2001). Außerdem ist durch den deutlich geringeren finanziellen und logistischen Aufwand des *Intermittent Preventive Treatment* (IPT) gegenüber einer wöchentlichen Prophylaxe eine konsequente regelmäßige Einnahme eher zu erwarten. Entsprechend der Empfehlungen der WHO (WHO, 2004) wurde in Ghana IPT mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) anstelle der wöchentlichen Pyrimethamin-Prophylaxe im Jahre 2005 eingeführt. IPT beinhaltet mindestens zwei Gaben einer therapeutischen Dosis Sulfadoxin und Pyrimethamin im zweiten und dritten Schwangerschaftstrimester unabhängig von dem Vorliegen einer Infektion mit *P. falciparum* (WHO, 2004).

Trotz zunehmender Resistenzen gegen SP profitierten schwangere Frauen und ihre Neugeborenen in den Endemiegebieten von der Präventivbehandlung (Newman *et al.*, 2003; Garner & Gulmezoglu, 2006; ter Kuile *et al.*, 2007). In einer neueren Therapiestudie bei Schwangeren in Ghana konnten Heilungsraten von 70-90 % erreicht werden (Tagbor *et al.*, 2006).

Im Jahr 2006 konnten im Studiengebiet nach einjähriger Implementation von IPT mit SP bereits eine Halbierung der Prävalenz von Malaria in der Schwangerschaft nachgewiesen werden (Hommerich *et al.*, 2007). Auch die Prävalenz von mütterlicher Anämie war deutlich geringer und das durchschnittliche Geburtsgewicht der Neugeborenen war signifikant höher.

Die Befürchtung, dass durch die Präventivbehandlung von asymptomatischen Individuen möglicherweise die Ausbreitung von Resistenzen gegen SP zusätzlich beschleunigt wird (O'Meara *et al.*, 2006), scheint allerdings berechtigt zu sein. So hat sich im Studiengebiet die Prävalenz von *P. falciparum* mit DHFR-Dreifach-Mutation über einen Zeitraum von acht Jahren verdoppelt: 36 % im Jahr 1998 gegenüber 72 % im Jahr 2006 (Mockenhaupt *et al.*, im Druck).

Bis zu welchem Ausmass an Resistenz das IPT mit SP effektiv bleibt, ist noch ungeklärt. Die WHO empfiehlt die Anwendung von IPT mit SP in der Schwangerschaft weiterhin für Länder, in denen die Versagensrate der Therapie bei Kindern  $\leq 50$  % liegt (WHO, 2005). Mockenhaupt *et al.* zeigten, dass die DHFR-Dreifachmutation in Nordghana das Risiko des Therapieversagens von IPT mit SP bei Kindern um das zehnfache erhöht (Mockenhaupt *et al.*, 2005). Der

prädikative Wert von DHFR-Mutationen bei Schwangeren ist noch unbekannt. Eine diesbezügliche Studie wäre sinnvoll.

Besonders vor dem Hintergrund der zunehmenden Resistenzentwicklung der Parasiten ist die Entwicklung und Testung neuer Medikamente und Medikamentenkombinationen, die zur Prophylaxe und Therapie der Infektion mit *P. falciparum* während der Schwangerschaft geeignet sind, dringend notwendig (White, 2005). Neue Optionen in Prophylaxe und Therapie der Malaria besonders auch in der Schwangerschaft eröffnen sich möglicherweise durch die Kombinationspräparate mit Folatantagonisten aus Proguanil und Atovaquone, sowie Chlorproguanil und Dapson bzw. Chlorproguanil, Dapson und Artesunate (Kain, 2003; Marra *et al.*, 2003; Nzila *et al.*, 2006). Wegen schwerer Nebenwirkungen wurden jedoch Dapson-haltige Malariamedikamente Anfang 2008 vom Markt genommen und ihre Weiterentwicklung eingestellt. Die Kombination von Alternativpräparaten wie Artesimin, Amodiaquin und Mefloquin sowie die Kombinationspräparate mit Folatantagonisten und Artemether-Lumefantrin werden bereits für die Therapie der akuten und besonders der multiresistenten *P. falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft vereinzelt getestet (Nosten *et al.*, 2000; McGready *et al.*, 2003; Brabin *et al.*, 2004; Tagbor *et al.*, 2007). Das teratogene Risiko dieser Präparate ist allerdings noch weitestgehend unklar. Nur Mefloquin wurde bisher als Einzelpräparat ab dem 2. Trimester prophylaktisch angewendet. Die Resistenzraten gegen Mefloquin sind in diesen Gebieten in Indochina bereits hoch (Nosten *et al.*, 2000). Nosten *et al.* (2000) zeigte allerdings in einem Gebiet mit hochgradiger Mefloquinresistenz mit der Kombination aus Mefloquin und Artesunate bei Schwangeren therapeutisch angewendet eine hundertprozentige Heilungsrate. Die Kombination des hochpotenten Blutschizontozids Artesimin und seiner Derivate mit den gebräuchlichen Malaria-Medikamenten erscheint zumindestens hoffnungsvoll (Taylor *et al.*, 2004; Dellicour *et al.*, 2007). Deen *et al.* (2001) und Adam *et al.* (2006) zeigten die Wirksamkeit und die scheinbar sichere Anwendung in der Schwangerschaft ab dem zweiten Trimester von Artesunate und SP in therapeutischer Dosierung. In großen multizentrischen Studien des von der Bill und Melinda Gates Stiftung finanzierten „Malaria in Pregnancy Consortium“ werden derzeit verschiedene Kombinationspräparate für die Therapie und Prophylaxe der Malaria in der Schwangerschaft getestet ([www.mip-consortium.org](http://www.mip-consortium.org)).

Neben der Optimierung von Diagnostik, Prophylaxe bzw. Präventivtherapie und Therapie muss die Aufklärung und medizinische Betreuung der Schwangeren verbessert werden. Der Besuch der Schwangerschaftsvorsorge reduzierte die Infektionsprävalenz, die Prävalenz von Anämie, niedrigem Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit, wie es schon in anderen Studien beschrieben wurde (Prazuck *et al.*, 1993; Rogerson *et al.*, 2003). Außerdem ließ sich bei regelmäßigem

Besuch der Schwangerschaftsvorsorge Pyrimethamin häufiger nachweisen. Dies spricht dafür, dass die engmaschige, möglichst kostenfreie Betreuung von Schwangeren die regelmäßige Einnahme antiparasitärer Medikamente fördert. Erfreulicherweise ist die Schwangerschaftsvorsorge in Ghana seit Beginn des Jahres 2008 kostenfrei.

Ein besseres Verständnis für die Zusammenhänge von Infektion und Schwangerschaft zu erreichen, ist neben der Verbesserung der sozio-ökonomischen Bedingungen der Frauen eine der wichtigsten Voraussetzungen für die erfolgreiche Umsetzung einer antiparasitären Chemoprophylaxe bzw. Präventivtherapie und anderer malariapräventiver Maßnahmen, wie z. B. die Benutzung imprägnierter Moskitonetze (Nganda *et al.*, 2004). Entscheidend für das Versagen der Präventivtherapie bzw. der Prophylaxe sind jedoch neben parasitären Resistenzen nicht die Motivation und die Compliance der Schwangeren und des medizinischen Personals, sondern die mangelnde Verfügbarkeit der Medikamente, die falsche Einnahme und die schlechte Qualität der Präparate (WHO, 2003; Abuaku *et al.*, 2005; Buabeng *et al.*, 2007).

## 5 Zusammenfassung

Jedes Jahr werden etwa 24 Millionen Frauen in den Malaria-Endemiegebieten schwanger. Malaria während der Schwangerschaft kann in mütterlicher Anämie, niedrigem Geburtsgewicht, Frühgeburtslichkeit, intrauteriner Wachstumsverzögerung und Fehl- und Totgeburten resultieren. Es wird geschätzt, dass der Malaria in der Schwangerschaft jährlich 10.000 mütterliche Todesfälle und bis zu 200.000 bei Säuglingen zugeschrieben werden können.

Die WHO empfahl bereits 1986, dass schwangere Frauen in den Malaria-Endemiegebieten im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge eine antiparasitäre Chemoprophylaxe erhalten sollten. Das Malaria-Experten Komitee der WHO betonte nochmals im Jahre 2000 die Notwendigkeit einer antiparasitären Prophylaxe oder Präventivbehandlung während der Schwangerschaft. Die dramatische Entwicklung von parasitärer Resistenz gegenüber den verfügbaren Medikamenten hat zu einer Abkehr von kontinuierlicher Chemoprophylaxe bei Schwangeren in den Endemiegebieten geführt. Stattdessen empfiehlt die WHO heute die präventive intermittierende Therapie (IPT) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin, die mindestens zweimalig ab dem 2. Trimester gegeben wird.

Im Studiengebiet von Agogo, Ghana, wiesen im Jahr 2000, über 90 % der von Schwangeren isolierten *Plasmodium falciparum*-Stämme eine Punktmutation auf, die mit Pyrimethaminresistenz vergesellschaftet ist. Dennoch wurde Pyrimethamin Schwangeren dort weiterhin routinemäßig zur Chemoprophylaxe verabreicht. Die vorliegende Studie untersucht die Effekte einer solchen Chemoprophylaxe im Kontext weitverbreiteter Medikamentenresistenz.

Vom 24. Januar 2000 bis zum 24. Januar 2001 wurden im holoendemischen Malariagebiet von Agogo 770 Gebärende, sowie ihre Plazenten und Neugeborenen in die Untersuchung eingeschlossen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob und inwieweit die im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge verordnete antiparasitäre Prophylaxe mit Pyrimethamin einen Schutz vor der plazentaren Infektion mit *P. falciparum* bietet bzw. einen Effekt auf die Ausprägung der Infektion und ihre klinische Manifestation bei Mutter und Kind hat. Die Infektion der Plazenta mit *P. falciparum* wurde mittels mikroskopischen Nachweises von Parasiten und/oder Malariapigment sowie PCR diagnostiziert. Mütterliche Anämie, Frühgeburtslichkeit und niedriges Geburtsgewicht wurden erfasst und Plasmakonzentrationen von Pyrimethamin mittels ELISA gemessen. Die Einflüsse von Pyrimethamin auf die plazentare Infektion mit *P. falciparum* und seine Manifestation wurde in uni- und multivariaten Analysen ausgewertet.

Mit 59,6 % wiesen mehr als die Hälfte der Frauen eine mit der PCR nachweisbare Infektion der Plazenta mit *P. falciparum* auf. Bei nur 19,2 % der Frauen zeigte sich eine mikroskopisch

detektierbare periphere Parasitämie. Bei 30,4 % der Schwangeren konnte Malariapigment in der Plazenta nachgewiesen werden. Sowohl die Prävalenz von plazentaren Infektionen als auch von plazentarem Pigment nahmen signifikant mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl ab. Es konnten keine kongenitalen Infektionen nachgewiesen werden. Die jeweilige Prävalenz von Anämie (34,4 %), Frühgeburtlichkeit (18,9 %) und niedrigem Geburtsgewicht (16,2 %) war bei den infizierten Müttern signifikant höher als bei den nicht-infizierten – besonders bei Erstgebärenden und bei Malariapigmentnachweis. Von den 770 Frauen wiesen zum Zeitpunkt der Entbindung 35,7 % prophylaktische und 42,5 % grenzwertige Pyrimethaminspiegel auf, während sich bei 21,8 % kein Pyrimethamin im Blut nachweisen ließ. In der Gruppe der Frauen ohne Pyrimethaminspiegel wiesen 69,1 % eine mit der PCR darstellbare Infektion der Plazenta auf. Gebärende mit grenzwertigen bzw. prophylaktischen Spiegel waren zwar signifikant seltener, aber in immer noch mehr als der Hälfte der Fälle infiziert (59,6 % bzw. 53,8 %). Die Prävalenz einer mütterlichen Anämie war bei Frauen ohne Pyrimethaminnachweis höher (47,0 %) als bei solchen mit grenzwertigen (31,8 %) oder prophylaktischen Medikamentenspiegeln (29,5 %). Sowohl der Effekt auf die Infektion als auch auf die Anämie war bei Erstgebärenden stärker ausgeprägt. Auf das Auftreten von Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht hatte die Einnahme von Pyrimethamin keinen signifikanten Einfluss. Nebenbefundlich wurde eine nahezu lineare Korrelation zwischen mütterlichen und kindlichen Plasmakonzentrationen von Pyrimethamin und Chloroquin festgestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Chemoprophylaxe Schwangerer mit Pyrimethamin im Studiengebiet und in Gebieten vergleichbarer Resistenzlage unzureichend ist. IPT mit Sulfadoxin-Pyrimethamin wurde in Ghana im Jahre 2005 eingeführt. Neuere Untersuchungen in Agogo, Ghana, haben gezeigt, dass sich die Prävalenz der *P. falciparum*-Infektion infolgedessen halbiert hat. Allerdings hat die parasitäre Resistenz gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin dort deutlich zugenommen, so dass voraussehbar ist, dass diese Maßnahme in einigen Jahren ebenfalls an Wirkung einbüßen wird.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstreichen letztlich die Notwendigkeit kontinuierlicher Überprüfung der Wirksamkeit der gegen die Malaria in der Schwangerschaft gerichteten Kontrollmaßnahmen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abuaku BK**, Koram KA, Binka FM. Antimalarial prescribing practices: a challenge to malaria control in Ghana. *Med Princ Pract* 2005; 14: 332-337.
- Adam I**, Ali DM, Abdalla MA. Artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria during pregnancy in eastern Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 632-635.
- Airede AI**. Congenital malaria with chloroquine resistance. *Ann Trop Paediatr* 1991; 11: 267-269.
- Akanbi OM**, Odaibo AB, Afolabi KA *et al*. Effect of self-medication with antimalarial drugs on malaria infection in pregnant women in South-Western Nigeria. *Med Princ Pract* 2005; 14: 6-9.
- Akindele JA**, Sowunmi A, Abohweyere AE. Congenital malaria in a hyperendemic area: a preliminary study. *Ann Trop Paediatr* 1993; 13: 273-276.
- Akintowa A**, Gbajumo SA, Biola Mabadeje AF. Placental and Milk Transfer of Chloroquine in Humans. *Ther Drug Monit* 1988; 10: 147-149.
- Alecrim WD**, Espinosa FEM, Alecrim MGC. *P. falciparum* infection in the pregnant patient. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14(1): 83-95, viii-ix.
- Al-Yaman F**, Genton B, Reeder JC *et al*. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91(5): 602-605.
- Aponte JJ**, Menendez C, Schellenberg D *et al*. Age interactions in the development of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* and its clinical presentation. *PLoS Med* 2007; 4: e242.
- Apgar V**, Holaday DA, James S *et al*. Evaluation of the newborn infant-second report. *JAMA* 1958; 168: 1985-1988.
- Archibald HM**, Ross CM. A preliminary report on the effect of diamino-diphenyl sulphone on malaria in northern Nigeria. *J Trop Med Hyg* 1960; 63: 25-27.
- Astier H**, Renard C, Cheminel V *et al*. Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high-performance liquid chromatography after automated liquid-solid extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 698: 217-223.
- Augustijns P**, Jongsma HW, Verbeke N. Transplacental Distribution of Chloroquine in Sheep. *Dev Pharmacol Ther* 1991; 17: 191-199.



- Barzago MM**, Omarini D, Bortolotti A *et al.* Mefloquine Transfer during in vitro Human Placenta Perfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 28-31.
- Basco LK**, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon VI. Sequence variations in the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate Synthase gene and in vitro resistance to pyrimethamine and cycloguanil. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(2): 802-806.
- Beeson JG**, Duffy PE. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 297: 187-227.
- Berqvist Y**, Eriksson M. Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high-performance liquid chromatograph. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 297-301.
- Bottius EA**, Guanzirolli A, Trape FF *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.
- Bourget P**, Roulot C, Fernandez H. Models for placental transfer studies of drugs. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28: 161-180.
- Bouyou-Akotet MK**, Issifou S, Meye JF *et al.* Depressed natural killer cell cytotoxicity against *P. falciparum*-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clin Infect Dis* 2004; 38(3): 342-347.
- Boyd RD**, Haworth C, Stacey TE *et al.* Permeability of the sheep placenta to unmetabolized polar non-electrolytes. *J Physiol* 1976; 256: 617-634.
- Brabin BJ**. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ* 1983; 61(6): 1005-1016.
- Brabin BJ**, Ginny M, Sapau J *et al.* Consequences of maternal anaemia on outcome of pregnancy in a malaria endemic area in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* 1990(a); 84(1): 11-24.
- Brabin BJ**. An analysis of malaria parasites rates in infants: 40 years after Ian McGregor. *Trop Dis Bull* 1990(b); 87: R 1-16.
- Brair ME**, Brabin BJ, Milligan P *et al.* Reduced transfer of tetanus antibodies with placental malaria. *Lancet* 1994; 343: 208-209.
- Bray RS**, Garnham PC. The life-cycle of primate malaria parasites. *Br Med Bull* 1982; 38: 117-122.
- Browne ENL**, Frimpong E, Sieverstsen J *et al.* Malariometric update for the rainforest and savanna of Ashanti region, Ghana. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 94: 15-22.

- Bryce J**, Boschi-Pinto C, Shibuya K *et al.* WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365: 1147-1152.
- Buabeng KO**, Duwiejua M, Dodoo ANO *et al.* Self-reported use of anti-malarial drugs and health facility management of malaria in Ghana. *Malar J* 2007; 6: 85.
- Bull PC**, Lowe BS, Kortok M *et al.* Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998; 4: 358-360.
- Bull PC**, Marsh K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol* 2002; 10: 55-58.
- Bulmer JN**, Rasheed FN, Francis N *et al.* Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology* 1993(a); 22: 211-218.
- Bulmer JN**, Rasheed FN, Morrison L *et al.* Placental malaria. II. A semi-quantitative investigation of the pathological features. *Histopathology* 1993(b); 22: 219-225.
- Butler GG**. Malaria in parturient women. Gold coast report of laboratory services, year 1929-30, appendix C; 31-33. Quoted in *Tropical diseases bulletin* 1932; 29: 349-350.
- Carrington HC**, Crowther AF, Davey DG *et al.* A metabolite of paludrine with high antimalarial activity. *Nature* 1951; 168: 1080.
- Carter JY**, Loolpapit MP, Lema OE *et al.* Reduction of the efficacy of antifolate antimalarial therapy by folic acid supplementation. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 166-170.
- Center for Disease Control**. Recommendations for the prevention of malaria among travelers. *JAMA* 1990; 236: 2729-2740.
- Chabasse D**, De Gentile L, Ligny C *et al.* Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Mali revealed by congenital malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 547.
- Challis K**, Osman NB, Cotiro M *et al.* Impact of double dose of sulphadoxine-pyrimethamine to reduce prevalence of pregnancy malaria in southern Mozambique. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 1066-1073.
- Chizzolini C**, Trottein F, Bernard FX *et al.* Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 57-64.
- Clark IA**, Chaudhri G. Tumor necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 1988; 70: 99-103.
- Clauß G**, Finze FR, Partzsch L. Grundlagen. In : Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner. 3. Auflage, Frankfurt am Main 1999, Deutschland.

- Clendennen TE**, Long GW, Baird JK. QBC and Giemsa-stained thick blood films: diagnostic performance of laboratory technologists. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1996; 87: 649-653.
- Cot MJ**, Le Hesran JY, Miaillhes P *et al.* Increase of birth weight following chloroquine chemoprophylaxis during the first pregnancy: results of a randomized trial in Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 581-585.
- Cot MJ**, Le Hesran JY, Miaillhes P *et al.* Effect of chloroquine prophylaxis during pregnancy on maternal haematocrit. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 37-43.
- Covell G**, Shute PG, Maryon M. Pyrimethamine (Daraprim) as a prophylactic agent against a west African strain of *P. falciparum*. *Br Med J* 1953; 1: 1081-1082.
- Crocker IP**, Tanner OM, Myers JE *et al.* Syncytiotrophoblast degradation and the pathophysiology of the malaria-infected placenta. *Placenta* 2004; 25: 273-282.
- Curd FHS**, Davey DG, Rose FL. Study on synthetic antimalarial drugs. X. Some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity. *Nature* 1945; 168: 1080.
- Curtis J**, Duraisingh MT, Trigg JK *et al.* Direct evidence that asparagines at position 108 of the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase is involved in resistance to antifolate drugs in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90(6): 678-680.
- Davis TM**, Krishna S, Looareesuwan S *et al.* Erythrocyte sequestration and anaemia in severe falciparum malaria. Analysis of acute changes in venous hematocrit using a simple mathematical method. *J Clin Invest* 1990; 86: 793-800.
- Deen JL**, von Seidlein L, Pinder M *et al.* The safety of the combination artesunate and pyrimethamine-sulfadoxine given during pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 424-428.
- Delfino RT**, Santos-Filho OA, Figueroa-Villar JD. Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant Plasmodium falciparum DHFR. *Biophys Chem* 2002; 98: 287-300.
- Dellicour S**, Hall S, Chandramohan D *et al.* The safety of artesimins during pregnancy: a pressing question. *Malar J* 2007; 6: 15.
- De Moares-Pinto MI**, Verhoeff F, Chimsuku L *et al.* Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 79: F202-205.
- Desai M**, ter Kuile FO, Nosten F *et al.* Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(2): 93-104.

- Desowitz RS**, Alpers MP. Placental *Plasmodium falciparum* parasitaemia in East Sepik (Papua New Guinea) women of different parity: the apparent absence of acute effects on mother and foetus. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86: 95-102.
- Desowitz RS**, Elm J, Alpers MP. *Plasmodium falciparum*-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgE antibodies in paired maternal-cord sera from east Sepik Province, Papua New Guinea. *Infect Immun* 1993; 61(3): 988-993.
- Diagne N**, Rogier C, Cisse B *et al.* Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 166-170.
- Dodge JS**. Some notes on the isolation of a strain of *P. falciparum* insensitive to pyrimethamine in a northern group of provinces. *J Nigerian Med Assoc* 1966; 3: 383-386.
- Dorangeon PH**, Fay R, Marx-Chemla C *et al.* Passage transplacentaire de l'association pyriméthamine-sulfadoxine lors du traitement antenatal de la toxoplasmose congénital. *La Presse Médicale* 1990; 19: 2036.
- Dorman EK**, Shulman CE, Kingdom J *et al.* Impaired uteroplacental blood flow in pregnancies complicated by *falciparum* malaria. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 19: 165-170.
- Dreyfuss M**, Stoltzfus R, Shrestha J *et al.* Hookworms, malaria and vitamin A deficiency contribute to anemia and iron deficiency among pregnant women in the plains of Nepal. *J Nutr* 2000; 130: 2527-2536.
- Duffy PE**, Fried M. Malaria in the pregnant woman. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 295: 169-200.
- Edstein MD**, Rieckmann KH, Veenendaal JR *et al.* Multiple-dose pharmacokinetics and in vitro antimalarial activity of dapson plus pyrimethamine (Maloprim) in man. *Br J Clin Pharmacol* 1990; 30: 259-265.
- Eggelte TA**, Navaratnam V, Payne D (Hrsg.) *The Validation of Chemical and Immunochemical Tests for Antimalarials in Body Fluids: Production of monoclonal antibodies against antimalarial drugs for use in immunoassays.* Center for Drug Research International Monograph University Sains Malaysia, Penang 1990, Malaysia; 3: 35-63.
- Eggelte TA**, Sondij S, Gussenhove G. Simple dipstick tests for the determination of antimalarials in body fluids. *Proceedings XIIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, Pattaya 1992, Thailand; 2: pp. 242.
- El Hassan AM**, Aeed AM, Fandrey J *et al.* Decreased erythropoietin response in *Plasmodium falciparum* malaria-associated anaemia. *Eur J haematol* 1997; 59: 299-304.
- Essien EE**, Afamefuna GC *et al.* Chloroquine and its metabolites in human cord blood, neonatal blood, and urine after maternal medication. *Clin Chem* 1982; 28: 1148-1152.

- Estler CJ** (Hrsg.). Antiprotozoenmittel. In: Lehrbuch der allgemeinen und speziellen Pharmakologie und Toxikologie. 5. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart 2000, Deutschland.
- Falade CO**, Yusuf BO, Fadero FF *et al.* Intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine is effective in preventing maternal and placental malaria in Ibadan, southwestern Nigeria. *Malar J* 2007; 6: 88.
- Falco EA**, Goodwin LG, Hitchings GH *et al.* 2:4-diaminopyrimidines – a new series of antimalarials. *Br J Pharmacol Chemother* 1951; 6(2): 185-200.
- Farnert A**, Rooth I, Svensson *et al.* Complexity of Plasmodium falciparum infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis* 1999; 179: 9885-995.
- Filler SJ**, Kazembe P, Thigpen M *et al.* Randomized trial of 2-dose versus monthly sulfadoxine-pyrimethamine intermittent preventive treatment for malaria in HIV-positive and HIV-negative pregnant women in Malawi. *J Infect Dis* 2006; 194: 286-293.
- 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: 601-604.
- Fischer PR.** Congenital malaria: an African survey. *Clin Paediatr* 1997; 36: 411-413.
- Fleming AF.** Tropical obstetrics and gynecology. 1. Anaemia in pregnancy in tropical Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 441-448.
- Fleming AF.** Antimalarial prophylaxis in pregnant Nigerian women. *Lancet* 1990; 335: 45.
- Fried M**, Duffy PE. Adherence of *P. falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 1996; 272: 1502-1504.
- Fried M**, Muga RO, Misore AO *et al.* Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immun* 1998; 160: 2523-2530.
- Fromm E**, Wittmann J. Derivate des p-nitrophenols. *Deutsch Chem Ges* 1908; 41: 2264-2294.
- Forth W**, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.) Antiprotozoenmittel. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1996, Deutschland.
- Foster SD.** Pricing, distribution, and use of antimalarial drugs. *Bull World Health Org* 1991; 69: 349-363.
- Ghana Aids Comission.** HIV Sentinel Surveillance Report 2005.  
<http://www.ghanaid.gov.gh/main/publications.asp>

- Gillespie DA**, Hardman N. Microbubbles in replicating nuclear deoxyribonucleic acid from *Physarum polycephalum*. *Biochem J* 1979; 183: 477-480.
- Gilles HM**. Management of severe and complicated malaria. WHO Geneva 1991, Switzerland.
- Giha HA**, Staalsoe T, Dodoo D *et al*. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. *Immunol Lett* 2000; 71: 117-126.
- Garner P**, Gulmezoglu AM. Drugs for preventing malaria in pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD000169.
- Ginsburg H**, Krugliak M. Chloroquine – some open questions on its antimalarial mode of action and resistance. *Drug Resist Updat* 1999; 2: 180-187.
- Greenberg AE**, Ntumbanzondo M, Ntula N *et al*. Hospital-based surveillance of malaria-related paediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire. *Bull World Health Organ* 1989; 67: 189-196.
- Guggenmos-Holzmann I**, Wernecke KD. *Medizinische Statistik*. Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin, Wien 1995.
- Guyatt HL**, Snow RW. Malaria in pregnancy as an indirect cause of infant mortality in sub-Saharan Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 569-576.
- Harpey JP**. Pyrimethamine in pregnancy. *Lancet* 1983(a); 2: 1193.
- Harpey JP**, Darbois Y, Lefèbvre G. Teratogenicity of pyrimethamine. *Lancet* 1983(b); 2: 399.
- Hellgren U**, Ericsson O, Kihamia CM *et al*. Malaria parasites and chloroquine concentrations in Tanzanian schoolchildren. *Trop Med Parasitol* 1994; 45: 293-297.
- Henning L**, Schellenberg D, Smith T *et al*. A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 687-694.
- Heymann DL**, Steketee RW, Wirima JJ *et al*. Antenatal chloroquine chemoprophylaxis in Malawi: chloroquine resistance, compliance, protective efficacy and cost. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 496-498.
- Hogh B**. Clinical and parasitological studies on immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996; 102: 1-53.
- Holder AA**, Guevara Patino JA, Uthaipibull C *et al*. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia* 1999; 41: 409-414.
- Hommerich L**, von Oertzen C, Bedu-Addo G *et al*. Decline of placental malaria in southern Ghana after the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy. *Malar J* 2007; 6: 144.

- Hyde JP.** Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* 2005; 94: 191-206.
- Ibeziako PA, Williams AI.** The effect of malarial chemoprophylaxis on immunoglobulin levels of pregnant Nigerian women and the newborn. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87: 976-982.
- Ismail MR, Ordi J, Menendez C et al.** Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol* 2000; 31: 85-93.
- Kain KC.** Current status and replies to frequently posed questions on atovaquone plus proguanil (Malarone) for the prevention of malaria. *BioDrugs* 2003; 17: 23-28.
- Kaseje DL, Sempebwa EK, Spencer HC.** Malaria chemoprophylaxis to pregnant women provided by community health workers in Saradidi, Kenya. I. Reasons for non-acceptance. *Ann Trop Med Parasitol* 1987; 81: 77-82.
- Kayentao K, Kodio M, Newman R et al.** Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *J Infect Dis* 2005; 191: 109-116.
- Kayentao K, Mungai M, Parise M et al.** Assessing malaria burden during pregnancy in Mali. *Acta Trop* 2007; 102: 106-112.
- Khan B, Omar S, Kanyara JN et al.** Antifolate drug resistance and point mutations in *Plasmodium falciparum* in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 456-460.
- Kreienbrock L, Schach S.** *Epidemiologische Methoden.* Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1997, Deutschland.
- Kulmala T, Vaahtera M, Ndekha M et al.** The importance of preterm birth for peri- and neonatal mortality in rural Malawi. *Pediatr Perinat Epidemiol* 2000; 14: 219-226.
- Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ et al.** Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998; 351: 1768-1772.
- Launiala A, Kulmala T.** The importance of understanding the local context: women's perceptions and knowledge concerning malaria in pregnancy in rural Malawi. *Acta Trop* 2006; 98: 111-117.
- Le Hesran JY, Cot M, Personne P et al.** Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 826-831.
- Leke RFG, Djokam RR, Mbu R et al.** Detection of the *Plasmodium falciparum* Antigen Histidine-Rich Protein 2 in blood of pregnant women: Implications for diagnosing placental malaria. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2992-2996.

- Leopardi O**, Naughten W, Salvia L *et al.* Malaric placentas. A quantitative study and clinico-pathological correlations. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 892-900.
- Lone FW**, Qureshi R, Emanuel F. Maternal anaemia and its impact on perinatal outcome. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 486-490.
- Marra F**, Salzman JR, Ensom MH. Atovaquone-proguanil for prophylaxis and treatment of malaria. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 1266-1275.
- Massele AY**, Kilewo C, Aden Abel Y *et al.* Chloroquine blood concentrations and malaria prophylaxis in Tanzanian women during the second and third trimesters of pregnancy. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 52: 299-305.
- Matola YG**, Malle LN. Factors affecting the compliance of malaria chemosuppression with chloroquine at some maternal and child health clinics in Tanga Region, Tanzania. *East Afr Med J* 1985; 62: 720-724.
- Matteelli A**, Caligaris S, Castelli F *et al.* The placenta and malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 97: 803-810.
- Mbaye A**, Richardson K, Balajo B *et al.* Lack of inhibition of the anti-malarial action of sulfadoxine-pyrimethamine by folic acid supplementation when used for intermittent preventive treatment in Gambian primigravidae. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 74: 960-964.
- McGready R**, Brockman A, Cho T *et al.* Haemozoin as a marker of placental parasitization. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 644-646.
- McGready R**, Keo NK, Villegas L *et al.* Artesunate-atovaquone-proguanil rescue treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy: a preliminary report. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 592-594.
- McGregor IA**, Wilson ME, Billewicz WZ. Malaria infection of the placenta in The Gambia, West Africa; its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 232-244.
- Menendez CJ**, C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 2000(a); 16: 469-476.
- Menendez CJ**, Ordi J, Ismail MR *et al.* The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 2000(b); 181: 1740-1745.
- Menendez CJ**, Mayor A. Congenital malaria: the least known consequence of malaria in pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 207-213.
- Mercereau-Puijalon O**. Revisiting host/parasite interactions: molecular analysis of parasites collected during longitudinal and cross-sectional surveys in humans. *Parasite Immunol* 1996; 18: 173-180.



- Miller LH**, Greenwood B. Malaria – a shadow over Africa. *Science* 2002; 298: 121-122.
- Mockenhaupt FP**, Rong B, Till H *et al.* Submicroscopic *P. falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health* 2000(a); 5: 167-173.
- Mockenhaupt FP**, Rong B, Gunther M *et al.* Anaemia in pregnant Ghanaian women: importance of malaria, iron deficiency, and haemoglobinopathies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000(b); 94: 477-483.
- Mockenhaupt FP**, TA Eggelte, Böhme T *et al.* *P. falciparum* dihydrofolate reductase alleles and pyrimethamine use in pregnant Ghanaian women. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 21-26.
- Mockenhaupt FP**, Ulmen U, von Gaertner C *et al.* Diagnosis of placental malaria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 306-308.
- Mockenhaupt FP**, Bousema TJ, Eggelte TA *et al.* *Plasmodium falciparum dhfr* but not *dhps* mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 2005; 10:901-8.
- Mockenhaupt FP**, Bedu-Addo G, Eggelte TA *et al.* Rapid increase of sulfadoxine-pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* in pregnant women, Ghana. *J Infect Dis* 2008, im Druck.
- Moormann AM**, Sullivan AD, Rochford RA *et al.* Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis* 1999; 180: 1987-1993.
- Morgan HG**. Placental malaria and low birthweight neonates in urban Sierra Leone. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88: 575-580.
- Morley D**, Woodland M, Cuthbertson WFJ. Controlled Trial of Pyrimethamine in Pregnant Women in an African Village. *Brit Med J* 1964; 1: 667-668.
- Mount AM**, Mwapasa V, Elliott S *et al.* Impairment of humoral immunity to *P. falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. *Lancet* 2004, 363: 1860-1867.
- Msolla MJ**, Kinabo JL. Prevalence of anaemia in pregnant women during the last trimester. *Int J Food Sci Nutr* 1997; 48: 265-270.
- Mutabingwa TK**, Malle LN, Verhave JP *et al.* Malaria chemosuppression during pregnancy. IV. Its effects on the newborn's passive malaria immunity. *Trop Geogr Med* 1993; 45: 150-156.
- Na-Bangchang K**, Tan-Ariya P, Ubalee R *et al.* Alternative method for determination of pyrimethamine in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 21: 433-437.
- Nahlen BL**, Akintunde A, Alakija T *et al.* Lack of efficacy of pyrimethamine prophylaxis in pregnant nigerian women. *Lancet* 1989; 2: 830-834.

- N'Dao CT**, N'Diaye JL, Gaye A *et al.* Placental malaria and pregnancy outcome in a peri urban area in Senegal. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2006; 54: 106-112.
- Ndyomugenyi R**, Magnussen P. Chloroquine prophylaxis, iron-folic acid supplementation or case management of malaria attacks in primigravidae in western Uganda: effects on maternal parasitaemia and haemoglobin levels and on birthweight. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 413-418.
- Newman RD**, Parise ME, Slutsker L *et al.* Safety, efficacy and determinants of effectiveness of antimalarial drugs during pregnancy: implications for prevention programmes in *Plasmodium falciparum*-endemic sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 488-506.
- Newman RD**, Moran AC, Kayentao K *et al.* Prevention of malaria during pregnancy in West Africa: policy change and the power of subregional action. *Trop Med Int Health* 2006; 11: 462-469.
- Nganda RY**, Drakeley C, Reyburn H *et al.* Knowledge of malaria influences the use of insecticide treated nets but not intermittent presumptive treatment by pregnant women in Tanzania. *Malar J* 2004; 3: 42.
- Njagi JK**, Magnussen P, Estambale B *et al.* Prevention of anaemia in pregnancy using insecticide-treated bednets and sulfadoxine-pyrimethamine in a highly malarious area of Kenya: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 277-282.
- Nosten F**, ter Kuile F, Maelankiri L *et al.* Mefloquine prophylaxis prevents malaria during pregnancy: a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 1994; 169: 595-603.
- Nosten F**, van Vugt M, Price R *et al.* Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet* 2000; 365: 297-302.
- Nyirjesy P**, Kavyasa T, Axelrod P *et al.* Malaria during pregnancy: neonatal morbidity and mortality and the efficacy of chloroquine chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 127-132.
- Nzila A.** The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J Antimicrob Chemother* 2006; 6: 1043-1054.
- Okoko BJ**, Wesumperuma LH, Ota MOC *et al.* The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis* 2001; 184: 627-632.

- Okoko BJ**, Ota MO, Yamuah LK *et al.* Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian McGregor. *J Health Popul Nutr* 2002; 20: 4-11.
- O'Meara WP**. Potential impact of intermittent preventive treatment (IPT) on spread of drug-resistant malaria. *PLoS Med* 2006; 3: e141.
- Ordi J**, Ismail MR, Ventura PJ *et al.* Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 1006-1011.
- Orton L**, Garner P. Drugs for treating uncomplicated malaria in pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD004912.
- Osifo NG**. Chloroquine-induced pruritus among patients with malaria. *Arch Dermatol* 1984; 120: 80-82.
- Osman NB**, Challis K, Cotiro M *et al.* Perinatal outcome in an obstetric cohort of Mozambican women. *J Trop Pediatr* 2001; 47: 30-38.
- Parisie ME**, Ayisi JG, Nahlen BL *et al.* Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 813-822.
- Peters PJ**, Thigpen MC, Parise ME *et al.* Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf* 2007; 30: 481-501.
- Peytavin G**, Leng JJ, Forestier F *et al.* Placental Transfer of Pyrimethamine studied in an ex vivo placental perfusion model. *Biol Neonate* 2000; 78: 83-85.
- Phillips RE**, Looareesuwan S, Warrell DA *et al.* The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q J Med* 1986; 58: 305-323.
- Phillips RE**, Pasvol G Anaemia of Plasmodium falciparum malaria. *Balliere's Clin Haematol* 1992; 5: 315-330.
- Prazuck T**, Tall F, Roisin AJ *et al.* Risk factors for preterm delivery in Burkina Faso. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 489-494.
- Rasheed FN**, Bulmer JN, De Francisco A *et al.* Relationships between maternal malaria and malarial immune responses in mothers and neonates. *Parasitol Immun* 1995; 17: 1-10.
- Ribera JM**, Hausmann-Muela S, D'Alessandro U *et al.* Malaria in pregnancy: what can the social sciences contribute? *PLoS Med* 2007; 4: e92.

- Ricke CH**, Staalsoe T, Koram K *et al.* Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *P. falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J Immunol* 2000; 165: 3309-3016.
- Rogerson SJ**, van den Broek NR, Chaluluka E *et al.* Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve month survey. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 335–340.
- Rogerson SJ**, Pollina E, Getachew A *et al.* Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 115-119.
- Roper CI**, Elhassan IM, Hviid L *et al.* Detection of very low level *P. falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 325-331.
- Runsewe-Abiodun IT**, Ogunfowora OB, Fetuga BM. Neonatal malaria in Nigeria – a 2 year review. *BMC Pediatr* 2006; 6: 19.
- Saiki RK**, Scharf S, Faloona F *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
- Salihu HM**, Tchuinguem G, Ratard R. Effect of chloroquine prophylaxis on birthweight and malaria parasite load among pregnant women delivering in a regional hospital in Cameroon. *West Indian Med J* 2000; 49: 143-147.
- Schultz LJ**, Steketee RW, Macheso A *et al.* The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 515-522.
- Schwick P**, Eggelte TA, Hess F *et al.* Sensitive ELISA dipstick test for the detection of chloroquine in urine under field conditions. *Trop med Int Health* 1998; 3: 828-832.
- Sharp PA**, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytic agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973; 12: 3055-3063.
- Shulman CE**, Graham WJ, Jilo H *et al.* Malaria is an important cause of anaemia in primigravidae: evidence from a district hospital in coastal Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 535-539.

- Shulman CE**, Dorman EK, Cutts F *et al.* Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 632-636.
- Sirima SB**, Sawadogo R, Moran AC *et al.* Failure of a chloroquine chemoprophylaxis program to adequately prevent malaria during pregnancy in Koupela district, Burkina Faso. *Clin. Infect. Dis* 2003; 36: 1374–1382.
- Smalley ME**, Brown J. In *vitro* demonstration of pyrimethamine resistance of “wild” *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76(3): 324-328.
- Snounou G**, Viriyakosol S, Zhu XP *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, Deichmann U *et al.* A preliminary continental risk map for malaria mortality among African children. *Parasitol Today* 1999; 15: 105-111.
- Staalsoe T**, Shulman CE, Dorman EK *et al.* Intermittent preventive sulfadoxine-pyrimethamine treatment of primigravidae reduces levels of plasma immunoglobulin G, which protects against pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2004; 72: 5027-5030.
- Steketee RW**, Nahlen BL, Parise ME *et al.* The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64: 28-35.
- Stoltzfuß RJ**. Rethinking anaemia surveillance. *Lancet* 1997; 349: 1764-1766.
- Sullivan AD**, Nyirenda T, Cullinan T *et al.* Placental haemozoin and malaria in pregnancy. *Placenta* 2000; 21: 417-421.
- Tagbor H**, Bruce J, Browne E *et al.* Efficacy, safety, and tolerability of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine used alone or in combination for malaria treatment in pregnancy: a randomised trial. *Lancet* 2006; 368: 1349-1356.
- Tako EA**, Zhou A, Lohoue J *et al.* Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 72: 236-242.
- Taylor WR**, White NJ. Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf* 2004; 27: 15-61.
- Ter Kuile FO**, Parise ME, Verhoeff FH *et al.* The burden of co-infection with human immunodeficiency virus typ 1 and malaria in pregnant women in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 41-54.
- Ter Kuile FO**, van Eijk AM, Filler SJ. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. *JAMA* 2007; 297: 2603-2616.

- Tjitra E**, Suprianto S, Dyer M *et al.* Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2412-2417.
- Trenque T**, Marx C, Quereux C *et al.* Human maternofetal distribution of pyrimethamine-sulfadoxine. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 45:179-180.
- Uneke CJ**. Congenital Plasmodium falciparum malaria in sub-Saharan Africa: a rarity or frequent occurrence? *Parasitol Res* 2007; 101: 835-842.
- Van der Aa EM**, Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J *et al.* Mechanism of drug transfer across the human placenta. *Pharmacy World & Science* 1998; 20: 139-148.
- Verhoeff FH**, Brabin BJ, Chimsuku L *et al.* An evaluation of the effects of intermittent sulfadoxine-pyrimethamine treatment in pregnancy on parasite clearance and risk of low birthweight in rural Malawi. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 141-150.
- Verhoeff FH**, Le Cessie S, Kalanda BF *et al.* Post-neonatal infant mortality in Malawi: the importance of maternal health. *Ann Trop Paediatr* 2004; 24: 161-169.
- Von Schenk H**, Falkensson M, Lundberg B. Evaluation of Hemo-cue, a new device for determining haemoglobin. *Clin Chem* 1986; 32: 526-529.
- Walter PR**, Garin Y, Blot P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1982; 109: 330-342.
- Weidekamm E**, Plozza-Nottebrock H, Forgo I *et al.* Plasma concentrations in pyrimethamine and sulfadoxine and evaluation of pharmacokinetic data by computerized curve fitting. *Bull WHO* 1982; 60: 115-122.
- White NJ**. Clinical Pharmacokinetics of Antimalarial Drugs. *Clin Pharmacokin* 1985; 10: 187-215.
- White NJ**. Intermittent Presumptive Treatment for Malaria. *PLoS Med* 2005; 2(1): e3
- Whitty CJ**, Edmonds S, Mutabingwa TK. Malaria in pregnancy. *Bjog* 2005; 112: 1189-1195.
- Witte AM**, Klever HJ, Brabin BJ *et al.* Field evaluation of the use of an ELISA to detect chloroquine and its metabolites in blood, urine and breast-milk. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 521-525.
- WHO**. Nutritional Anaemias. *Tech Rep Ser* 1972; 529.
- WHO**. Expert Committee on Malaria, 18th Report. Geneva 1986, Switzerland.
- WHO**. The epidemiology of drug resistance of malaria parasites: Memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1987; 65(6): 797-816.
- WHO**. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(1): 1-90.

- WHO.** Drug resistance in malaria. Geneva 2001, Switzerland.
- WHO.** Africa malaria report. Geneva 2003(a), Switzerland.
- WHO.** The quality of antimalarials. A study in selected African Countries. Geneva 2003(b), Switzerland.
- WHO.** Assesment of the safety of artesimin compounds in pregnancy. Geneva 2003(c), Switzerland.
- WHO.** A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control during Pregnancy in the African Region. Brazzaville 2004, Congo.
- WHO.** Recommendations on the use of Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) for Intermittent Preventive Treatment during Pregnancy (IPT) in areas of moderate to high resistance to SP in the African Region. Brazzaville 2005, Congo.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BF	Blickfeld
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CSA	Chondritinsulfat A
DHFR	Dehydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>lat.: et alii</i>
g	Gramm
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
HIV	engl.: Human Immunodeficiency Virus
IgG	Immunglobulin G
IPT	engl.: Intermittend Preventive/Presumptive Treatment/Therapy
IUGR	Intrauterine Growth Retardation
KI	Konfidenzintervall
kg	Kilogramm
LBW	engl.: Low Birth Weight
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MSP-1/-2	engl.: Merozoite Surface Protein 1/2
µl	Mikroliter
n	Fallzahl
OR	Odds Ratio
P	Parasit
<i>P</i>	<i>Plasmodium</i>



PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction
PfEMP1	engl.: P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
SSW	Schwangerschaftswoche
SP	Sulfadoxin-Pyrimethamin
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
UpM	Umdrehung pro Minute
vs.	versus
WHO	engl.: World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

## **7.2 Bezugsquellen**

Die verwendeten Geräte und Materialien stammen von folgenden Firmen:

BectonDickinson, Heidelberg

Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

BioTek Instruments, Bad Reichenhall, Deutschland

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Coulter Counter HC555, Clinicon, Mannheim

Hemocue, Angelholm, Schweden

Kodak Ltd., Liverpool, UK

Merck, Darmstadt

Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Pisataway, USA

Quiagen, Hilden

Roth, Karlsruhe

Sarstedt Inc., Newton, USA

Schleicher & Sch II Inc., Keene, USA

Willozyt, Will, Wetzlar

Carl Zeiss, Esslingen

### **7.3 Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Humboldt-Universität zu Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Effekte der Chemoprophylaxe mit Pyrimethamin auf die plazentare Infektion mit *Plasmodium falciparum* und ihre klinische Manifestation in einem Hochresistenzgebiet in Süd-Ghana

am Institut für Tropenmedizin Berlin, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. F. Mockenhaupt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und die Arbeit, auch in Teilen, keine Kopie darstellt. Ich bestätige bei der Verfassung dieser Arbeit keine anderen als die angeführten Hilfsmittel benutzt und die entsprechende Literatur vollständig angegeben zu haben.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, den 07.10.2008

Renate Boye

#### **7.4 Danksagung**

Ich danke meinen Eltern, die mein Studium und auch die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Priv.-Doz. Dr. F.P. Mockenhaupt möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die fortwährende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung danken.

Dem ehemaligen Institutsleiter Herrn Prof. Dr. U. Bienzle sei für seine kontinuierliche Unterstützung und hilfreiche Kritik gedankt.

Mein Dank gilt außerdem der Leitung des Agogo Presbyterian Hospitals für die freundliche Aufnahme und Unterstützung in Agogo.

Besonders Danken möchte ich Dr. T. A. Eggelte am Departement of Clinical Pharmacology, Academic Medical Center, University of Amsterdam für seine Arbeit und Unterstützung.

Ich bedanke mich weiterhin bei den Mitarbeitern des Tropeninstituts Berlin, des Departement of Clinical Pharmacology in Amsterdam sowie des Agogo Presbyterian Hospitals; die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wäre ohne ihre Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte ganz besonders allen Mitarbeitern des Studienteams danken insbesondere Frau Dr. Christiane von Gaertner für ihre sowohl fachliche als auch persönliche Unterstützung.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und meinen Freunden für Ihre Geduld und stetige Unterstützung.

## **7.5. Lebenslauf**

Der Lebenslauf der Autorin wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.