

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

DISSERTATION

Der Einfluss intermittierender präventiver Behandlung von Säuglingen
mit Sulfadoxin-Pyrimethamin
auf die Multiplizität der Infektion mit *Plasmodium falciparum*
und deren Bedeutung als immunologischer Parameter beim Kleinkind

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Ulrike C. Buchholz
aus Stuttgart

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. F. P. Mockenhaupt
2. Prof. Dr. med. H.-W. Presber
3. Prof. Dr. med. H. D. Nothdurft

Datum der Promotion: 4. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Malaria	7
1.1.1	Erreger	7
1.1.2	Pathophysiologie	7
1.1.3	Klinik	8
1.2	Abwehr durch das Immunsystem	10
1.2.1	Angeborene unspezifische Immunantwort	10
1.2.2	Erworbene spezifische Immunantwort	11
1.3	Semiimmunität	11
1.3.1	Die drei Elemente der Semiimmunität	12
1.3.2	Entwicklung der Semiimmunität in hochendemischen Gebieten	13
1.3.2.1	Definition Malariaendemiegebiet	13
1.3.2.2	Stufen der Immunitätsentwicklung	14
1.4	Prophylaktische Eingriffe während der Entwicklung der Semiimmunität	15
1.4.1	Gründe und Gefahren	15
1.4.2	Intermittierende präventive Behandlung von Säuglingen (IPTi)	15
1.4.3	Ergebnisse IPTi-Studien in Tamale und Afigya Sekyere	16
1.4.4	Einfluss von IPTi auf die Entwicklung der Semimmunität	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	STUDIENAUFBAU, MATERIAL, METHODEN	20
2.1	Studienaufbau	20
2.1.1	Studienrahmen	20
2.1.2	Studiendesign	20
2.1.3	Studienzeit	22
2.1.4	Studienleitung und Studienzentren	22
2.1.5	Studienorte	22
2.1.6	Studiengruppen und Probanden	23

2.1.7 Interventionen.....	24
2.1.7.1 Planmäßige Interventionen: IPTi.....	24
2.1.7.2 Außerplanmäßige Interventionen: Therapien bei Erkrankungen.....	24
2.1.8 Untersuchungen	25
2.1.8.1 Untersuchungen IPTi-1, IPTi-2, IPTi-3.....	25
2.1.8.2 Nachuntersuchungen.....	25
2.2 Methoden zur Untersuchung der Blutproben.....	26
2.2.1 Hämatologische Diagnostik.....	26
2.2.2 Parasitologische Diagnostik	26
2.2.2.1 Mikroskopischer Nachweis und Spezifizierung von Plasmodien.....	26
2.2.2.2 Nachweis submikroskopischer Infektionen	26
2.2.2.3 Genotypisierung von <i>P. falciparum</i> und Bestimmung der MOI	27
2.2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.2.2.3.2 Gelelektrophorese.....	31
2.2.2.3.3 Bestimmung der Multiplizität der Infektion	31
2.2.3 Untersuchung auf Rückstände von Chloroquin und Pyrimethamin	32
2.3 Definition Einfluss- und Zielgrößen	32
2.3.1 Studiengruppen	32
2.3.2 Infektion.....	32
2.3.3 Multiplizität der Infektion	33
2.3.4 Malaria.....	33
2.3.5 Anämie	33
2.4 Statistische Analyse	33
2.4.1 Kenndaten der Studiengruppen.....	33
2.4.2 Einflussgrößen auf die Polyklonalität einer Infektion	34
2.4.3 Einfluss des Infektionsstatus auf das prospektive, malariabedingte Morbiditätsrisiko.....	34
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Studiengruppen	36
3.1.1 Basisdaten zum Zeitpunkt der Rekrutierung und Teilnahmeverhalten	36

3.1.1.1 Tamale.....	36
3.1.1.2 Afigya Sekyere.....	39
3.1.1.3 Die Kohorten im Vergleich	41
3.1.2 Basisdaten zum Zeitpunkt der Untersuchung der MOI im 15. Lebensmonat....	42
3.2 Multiplizität der Infektion.....	44
3.2.1 Erfolgsquoten bei der Bestimmung der MOI.....	44
3.2.2 Altersverlauf der MOI in Tamale: Dritter bis 15. Lebensmonat	45
3.2.3 MOI im 15. Lebensmonat	46
3.3 Einflussgrößen auf die Multiplizität der Infektion	47
3.3.1 Studienort	47
3.3.2 Infektionsnachweismethode	48
3.3.3 IPTi.....	48
3.3.4 Chloroquin und SP	49
3.3.5 Parasitendichte.....	50
3.3.6 Anämie	50
3.4 Einflussgrößen auf die Polyklonalität einer Infektionen	50
3.5 Einfluss des Infektionsstatus im 15. Lebensmonat auf das prospektive, malariabedingte Morbiditätsrisiko	52
3.5.1 Risikovergleich in Abhängigkeit des Infektionsstatus: Infizierte versus nicht infizierte Kinder	52
3.5.1.1 Risikovergleich infizierte versus nicht infizierte Kinder unter Beachtung von IPTi.	53
3.5.1.2 Risikovergleich infizierte versus nicht infizierte Kinder unter Beachtung des Symptomatikstatus.....	55
3.5.2 Risikovergleich in Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion	56
3.5.2.1 Risikovergleich monoklonal infizierte versus nicht infizierte Kinder.....	57
3.5.2.2 Risikovergleich polyklonal infizierte versus nicht infizierte Kinder.....	57
3.5.2.3 Risikovergleich monoklonal infizierte versus polyklonal infizierte Kinder ...	57
3.5.2.4 Risikovergleich monoklonal infizierte versus polyklonal infizierte Kinder unter Beachtung des Symptomatikstatus.....	59

4	DISKUSSION	61
4.1	Methodendiskussion	61
4.1.1	Studiendesign.....	61
4.1.2	Diagnose einer <i>P. falciparum</i> Infektion und Bestimmung deren Multiplizität	62
4.1.2.1	Infektionsnachweismethode.....	62
4.1.2.2	Bestimmung der MOI	62
4.1.2.3	Ermittlung Höhe der MOI	63
4.1.3	Gruppierung der MOI-Ergebnisse.....	64
4.2	Ergebnisdiskussion	65
4.2.1	Einflussgrößen auf die Multiplizität der <i>P. falciparum</i> Infektion im 15. Lebensmonat.....	65
4.2.1.1	Vorangegangene Malariaepisoden	65
4.2.1.2	Intermittierende präventive Behandlung im ersten Lebensjahr mit SP.....	65
4.2.1.3	Eigenbehandlung mit Chloroquin und Pyrimethamin	66
4.2.1.4	Studienorte	66
4.2.1.5	Schlussfolgerung	68
4.2.2	Einfluss einer polyklonalen <i>P. falciparum</i> Infektionen im 15. Lebensmonat auf das prospektive Risiko malariabedingter Morbidität	68
4.2.2.1	Infektion versus Nichtinfektion	68
4.2.2.2	Polyklonale versus monoklonale Infektion	70
4.2.2.3	Ergebnisdifferenzen zwischen den Studienorten	70
4.2.2.4	Frequenz der Nachuntersuchungen und medikamentöse Malariatherapie	71
4.2.2.5	Schlussfolgerung	72
4.3	Gesamtfazit	73
4.4	Ausblick: MOI als Parameter zur Evaluierung von Präventionsmaßnahmen	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	77

7	ANHANG	86
7.1	Abkürzungen.....	86
7.2	Erklärung.....	90
7.3	Danksagung	91
7.4	Lebenslauf.....	92

1 Einleitung

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2006 lebt ca. die Hälfte der Weltbevölkerung in den tropischen Malariaendemiegebieten. Unter den mit dem Erreger *Plasmodium* infizierten Menschen treten dabei jährlich bis zu 247 Millionen Malariafälle auf, wobei weit mehr als eine Million Personen an der Infektionskrankheit versterben [1]. Die sozioökonomische Auswirkung von malariabedingter Morbidität und Mortalität auf die betroffenen Länder wird auf eine jährliche Wirtschaftswachstumseinbuße von 1,3% geschätzt [2].

Die Infektionsraten und die klinische Manifestation der Malaria variieren stark und hängen u. a. vom Klima ab, von den Arten der *Anopheles*mücke als Vektor und den Plasmodien als Erreger sowie von der immunologischen und konstitutionellen Beschaffenheit der befallenen Individuen und nicht zuletzt von gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Faktoren wie Armut und dem Zugang zum Gesundheitssystem.

Trotz dieser komplexen Epidemiologie können geographisch betrachtet die afrikanischen Länder südlich der Sahara als besonders betroffene Gebiete hervorgehoben werden, und demographisch gesehen als von der Malaria besonders bedroht die Gruppe der Kinder unter fünf Jahren. Außerdem lässt sich unter den Erregern *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) als die häufigste und zudem virulenteste Parasitenart ausmachen.

Um die hohe Morbidität und Mortalität afrikanischer Kinder infolge der Malaria effektiver zu reduzieren, wurden in den letzten Jahrzehnten wiederholt Präventionskonzepte entwickelt und erprobt: Studien analysierten die Wirksamkeit von Vektorkontrolle mittels Insektiziden, die von Impfstoffen, insektizidimprägnierten Moskitonetzen und dauerhafter Chemoprophylaxe [3]. Sämtliche Programme erwiesen sich aus medizinischen oder praktischen Gründen als nur unzureichend wirksam, ebenso wie der in den meisten Ländern Subsahara-Afrikas durchgeführte Versuch der Malariakontrolle mittels Frühdiagnostik und Frühtherapie. Eine generelle Hürde stellt der erschwerte Zugang zu einem funktionierenden Gesundheitssystem dar [4].

Eine neue, jüngst durch die WHO als Empfehlung verabschiedete Konzeption [5] sieht vor, Säuglingen vorbeugend und intermittierend Antimalariamedikamente zu verabreichen, und zwar zu den Terminen des auch in Ländern mit schwacher medizinischer Infrastruktur gut etablierten Impfprogramms *Expanded Programme on*

Immunisation (EPI). Aufgrund der Ergebnisse vorheriger Studien ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieses sogenannte *Intermittent Preventive Treatment in Infants* (IPTi) bei Kindern langfristig die Entwicklung einer Semiimmunität gegen Plasmodien beeinträchtigen und verzögern könnte, und somit das Malariarisiko nur um einige Jahre zu Ungunsten des älteren Kindes verschöbe [6-8]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese Hypothese anhand zweier IPTi-Studien in Ghana zu überprüfen und dabei die *Multiplizität der Infektion* (MOI) als Indikator für das Ausmaß der Immunitätsentwicklung zu analysieren.

1.1 Malaria

1.1.1 Erreger

Der Erreger der Malaria, das Sporozoon *Plasmodium*, ist ein Parasit: Überträger und Endwirt ist die nachtaktive, weibliche *Anopheles*mücke, Zwischenwirt ist der Mensch. Die vier bedeutenden humanpathogenen Erreger sind: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax*.

Als so genannte *Sporozoiten* gelangen die Plasmodien aus der Speicheldrüse der infizierten *Anopheles*mücke beim Blutsaugen in die menschliche Blutbahn und dringen innerhalb von 30 min in die Parenchymzellen der Leber ein. *P. vivax* und *P. ovale* persistieren dort teilweise jahrelang als *Hypnozoiten* im Ruhestadium. Grundsätzlich findet in der Leber aber im Laufe von einer bis mehreren Wochen eine erste asexuelle Vermehrung als *Gewebsschizonten* statt, bis es zur Ruptur der Hepatozyten kommt und zehntausende *Merozoiten* in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Die Merozoiten befallen ihrerseits wiederum nach wenigen Sekunden Erythrozyten. Dort findet (nach der Reifung von der *Ringform* zum *Trophozoit*) eine weitere asexuelle Vermehrung zu *Blutschizonten* statt, nach zwei bis drei Tagen rupturieren die befallenen Zellen und wiederum treten Merozoiten in den Blutkreislauf über. In einigen der Erythrozyten entwickeln sich die Plasmodien jedoch zu *Gametozyten*, die sich, von *Anopheles* bei der Blutmahlzeit aufgenommen, in der Darmmukosa der Stechmücke geschlechtlich vermehren und so zu neuen Plasmodien-Genotypen und schließlich zu neuen Sporozoiten in der Speicheldrüse der Mücke führen [9].

1.1.2 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Malaria basiert auf den Blutstadien der Plasmodien: Sie schränken nicht nur die Funktion der Erythrozyten ein, sondern lösen durch Endotoxine

und die Stimulation wirtseigener Zytokine direkt und indirekt verschiedene Mechanismen aus. Diese sind häufig ambivalenter Art: Sie wirken einerseits antiparasitär und andererseits - zumeist bei überschießenden immunologischen Reaktionen - pathogen. Auch wenn die Details dieser pathologischen Vorgänge nur unzureichend erforscht sind, so scheinen einige der Mechanismen verstanden:

Bestimmte Oberflächenbestandteile der Parasiten wirken als Endotoxine, darunter das Glycosylphosphatidylinositol (GPI). GPI stimuliert Monozyten und bewirkt dort u. a. die Freisetzung von TNF- α , IL-1, IL-6 und NO [10]. TNF- α und IL-1 wirken allgemein proinflammatorisch und führen auch zum wichtigen Pathomechanismus und typischen Symptom Fieber. TNF- α und IL-1 induzieren zudem die Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)) auf Endothelzellen der Kapillargefäße [11], was unter Mitwirkung weiterer Pathomechanismen (im Nachstehenden beschrieben) dazu führt, dass infizierte Erythrozyten dort binden und es in Folge der Zytoadhärenz zu Mikroischämien und -infarkten kommt [12, 13].

P. falciparum modifiziert die Oberfläche der befallenen Erythrozyten durch den Einbau von Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1 (PfEMP-1). Dieses Protein fungiert als Adhäsionsmolekül an den Endothelzellen der Kapillargefäße und bewirkt außerdem die Anlagerung nicht infizierter an infizierte Erythrozyten (Rosetting) [14, 15]. Zytoadhärenz und Rosetting führen zum Verschluss des Gefäßlumens, folglich zu einer eingeschränkten Mikrozirkulation und zu lokaler Hypoxie mit anschließenden Zell- und Organschäden unterschiedlichen Ausmaßes.

Außerdem führt das intraerythrozytäre Stadium zu Anämie: Zum einen wird Hämoglobin (Hb) für den Stoffwechsel und die Vermehrung von den Plasmodien verbraucht, zum anderen gehen befallene Erythrozyten zu Grunde. Zu einer Hämolyse führt außerdem, dass die infizierten Erythrozyten sich morphologisch verändern und so vermehrt durch das Monozyten-Phagozyten-System (MPS) abgebaut werden. Aufgrund welcher pathophysiologischer Mechanismen es zudem zum Abbau von nicht infizierten Erythrozyten und zu einer Dyserythropoese kommt, ist nur bedingt bekannt [16, 17].

1.1.3 Klinik

Der Verlauf der Infektion und das klinische Erscheinungsbild hängt von der Entwicklungsstufe der Erreger ab, vom Immunstatus des befallenen Individuums (s. 1.3) und von der Art der Erreger: Bei den vier humanpathogenen Plasmodienarten unterscheidet sich das klinische Bild der Infektion beim nicht semiimmunen Patienten in Inkubations-

zeit, Fieberrhythmus, Rezidiv- und Letalitätsrisiko. Dies spiegelt sich auch in einer unterschiedlichen Bezeichnung wieder: Zu den nicht lebensbedrohlichen Malariaformen gehören die durch *P. vivax* und *P. ovale* verursachte *Malaria tertiana* und die durch *P. malariae* verursachte *Malaria quartana*. Die häufigste und potentiell lebensbedrohliche Form aber ist die durch *P. falciparum* verursachte *Malaria tropica* [9]. Eine Übersicht über die Malariatypen, ihre Erregerarten und klinischen Merkmale bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: Charakteristika der Malaria in Abhängigkeit der Erregerart

Malariatyp	Erregerart	Inkubationszeit	Fieberrhythmus*	Rezidiv
benigne				
Malaria quartana	<i>P. malariae</i>	21 - 42 Tage	2 Tage fieberfrei	nach bis zu 20 Jahren möglich
Malaria tertiana	<i>P. vivax</i>	10 - 20 Tage	1 Tag fieberfrei	nach Monaten bis Jahren möglich bei persistierenden Hypnozoiten; Spontanheilung möglich
	<i>P. ovale</i>			
maligne				
Malaria tropica	<i>P. falciparum</i>	7 - 20 Tage (z.T. länger)	unregelmäßig	bis zu etwa 1 Jahr möglich

* erst nach einigen Tagen mit unregelmäßigem Fieber

Klinik der Malaria tropica

Die Klinik der Malaria tropica wird an dieser Stelle ausführlicher erläutert, da sie in der Fragestellung der vorliegenden Arbeit beinhaltet ist.

Die Symptomatik der akuten Malaria wird durch das asexuelle Blutstadium bestimmt und ist zunächst vor allem durch die pyrogene und inflammatorische Immunantwort geprägt. Insbesondere im Anfangsstadium weist sie daher nur unspezifischen Zeichen von Infektionskrankheiten auf, wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen und gastrointestinale Beschwerden. Der sichere Befund „Malaria“ lässt sich deshalb nur zusammen mit dem Erregernachweis stellen, weshalb die Malaria tropica definiert ist als eine asexuelle *P. falciparum* Parasitämie, einhergehend mit Fieber. Erst nach einigen Tagen kommt es zur Ausprägung der der Malaria eigenen (bedingt periodischen) Wechselfiebersymptomatik mit Temperaturanstieg unter Schüttelfrost und anschließendem Abfall bei Hitze-

empfinden und Schweißausbruch. Weitere typische Symptome sind Anämie, Thrombozytopenie und Hepatosplenomegalie [9].

Eine akute Malaria tropica kann sich zu einer komplizierten, *schweren Malaria* [18] entwickeln. Sie verläuft ohne Therapie in bis zu 50% der Fälle tödlich, häufig aufgrund von zerebraler Beteiligung. Aber auch andere Organsysteme können durch Mikroischämien und -infarkte (s. 1.1.2) fatal geschädigt werden, und es kann zu Herz-Kreislauf-, Lungen- und Nierenversagen kommen. Nicht selten treten zudem Störungen der Blutgerinnung und metabolische Entgleisungen mit Azidose und Hypoglykämie auf.

Bei einem *chronischen Verlauf* aufgrund einer nicht therapierten Malaria, wiederholter Rezidive oder Reinfektionen kommt es zudem zu Anämie, Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie und gegebenenfalls zu Unterernährung.

Das oben beschriebene klassische Bild der akuten Malaria tropica präsentiert sich nur beim nicht semiimmunen Patienten – dies sind in den Endemiegebieten heimische Kleinkinder sowie Zugereiste und neu Zugewanderte. Der über Jahre hinweg in Endemiegebieten zum semiimmunen gereifte Patient erkrankt bei Neuinfektionen nicht oder nur mild an Malaria (s. 1.3.1).

1.2 Abwehr durch das Immunsystem

Sowohl die angeborene als auch die erworbene spezifische Immunantwort sind durch den vielförmigen Entwicklungszyklus des *Plasmodiums* mit ständig wechselnden Phänotypen und intrazellulärem Einnisten (in zudem kernlosen und somit MHC-I-freien Erythrozyten) deutlich erschwert. Die Abwehr durch das Immunsystem ist entsprechend komplex und nur ansatzweise entschlüsselt.

1.2.1 Angeborene unspezifische Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird u. a. durch Endotoxine hervorgerufen (vgl. 1.1.2), aufgrund derer Monozyten proinflammatorische bzw. pyrogene Zytokine (wie TNF- α und IL-1) und toxische Metabolite (wie NO) ausschütten, die direkt oder indirekt antiparasitär wirken [19]. Zudem stellt sich die angeborene Immunantwort insbesondere in Form des MPS dar, dass die durch das Komplementsystem bzw. durch Antikörper (AK) opsonierten Sporozoiten, Merozoiten und befallenen Erythrozyten phagozytiert.

1.2.2 Erworbene spezifische Immunantwort

Die CD8⁺-T-Zellen der erworbenen zellulären Immunantwort detektieren über antigenpräsentierende MHC I-Moleküle die befallenen Leberparenchymzellen: Sie zerstören die infizierten Zellen, mitsamt den Gewebsschizonten, und sezernieren IFN- γ , das wiederum Monozyten aktiviert und pyrogen wirkt. Monozyten bzw. Makrophagen, die Plasmodien phagozytiert haben, aktivieren über die antigenpräsentierenden MHC II-Moleküle CD4⁺-T-Zellen, die dann weiter differenziert als T_H1-Zellen Monozyten bzw. als T_H2-Zellen B-Zellen anregen. B-Zellen differenzieren daraufhin zu Plasmazellen und produzieren die wichtigen AK [20, 21]. Diese, auf den jeweiligen Erregergenotyp spezialisierten AK, stellen die erworbene *humorale* spezifische Immunantwort dar: Sie binden an die im Blut frei zirkulierenden Sporozoiten und Merozoiten sowie an befallene Erythrozyten und ermöglichen so jeweils deren Phagozytose durch das MPS. AK gegen das von den Parasiten an der Erythrozytenmembran exprimierte PfEMP-1 verhindern zudem Zytoadhärenz und Rosetting [22].

1.3 Semiimmunität

Die auf Gedächtniszellen und AK beruhende, sterile Immunität, die bei viralen und bakteriellen Infektionen bzw. Impfungen dauerhaften Schutz vor Neuinfektionen bietet, kommt bei einer *P. falciparum*-Reinfektion nicht zum Tragen. Die Wirksamkeit der AK ist insbesondere durch die außerordentliche Vielfalt der jeweiligen Antigene (AG) qualitativ gemindert. Grund für den AG-Polymorphismus ist die Fülle an unterschiedlichen Plasmodien-Genotypen, infolge der meiotischen Rekombination im Moskito [23]. Zudem scheint es auch im intraerythrozytären, asexuellen Vermehrungszyklus zu einer Zunahme von Antigenversionen durch AG-Switch zu kommen [24, 25].

Im Regelfall entwickelt sich bei Personen in endemischen Malariagebieten im Laufe von Jahren, nach wiederholten Infektionen und Erkrankungen, eine so genannte *Semiimmunität* gegen Plasmodien: Diese Menschen sind bei geringer Parasitendichte chronisch infiziert, bleiben dabei aber neben milder Anämie und Hepatosplenomegalie in der Regel symptomlos und erkranken auch bei Neuinfektionen nicht oder nur leicht an Malaria.

Eine weitere relative Immunität gründet auf hereditären Resistenz- oder Schutzfaktoren: Genetische Polymorphismen führen direkt zu erschwerten Umweltbedingungen für den Parasiten (bspw. durch Hämoglobinopathien wie HbS, HbC oder α -Thalassämien [26]) oder indirekt zu einer besonders effektiven Ausbildung der Immunantwort (z.B. durch

Genvarianten, die für MHCII, TNF- α , ICAM-1 oder die induzierbare NO-Synthase kodieren [27]).

1.3.1 Die drei Elemente der Semiimmunität

Die genauen Grundlagen der Semiimmunität sind wenig bekannt, aufgrund zahlreicher Studien gehen gängige Modelle aber von Folgendem aus: Einerseits sind die antiparasitär wirkenden Zytokine der unspezifischen Immunabwehr abgeschwächt [28, 29]. Andererseits zeigt sich das Immunsystem gegenüber der Endotoxine der Plasmodien tolerant (*antitoxische Immunität*), sodass es trotz Infektion zu keinen akuten klinischen Symptomen kommt [30, 31]. Beide Elemente ermöglichen, dass die Infektion - bei niedrig gehaltener Parasitendichte - anhält. Dies ist schließlich die Grundlage für (nicht genauer entschlüsselte) Immunmechanismen, die zu einer Limitierung bzw. Kontrolle von Neuinfektionen mit Plasmodien führen. Dieses dritte Phänomen wird mit dem Begriff *Prämunitation* [32] beschrieben bzw. modellhaft erklärt: Die auf die persistierenden Genotypen eingestellte, erworbene spezifische Immunantwort kann neu auftretende Plasmodienstämme beim Vorliegen gleicher oder ähnlicher Epitope direkt oder aufgrund von Kreuzreaktionen kontrollieren bzw. abwehren [31, 33]. Allerdings ließ sich in der Vergangenheit kein klarer Zusammenhang zwischen identifizierten IgG-AK und der Qualität der Immunantwort nachweisen [34]. Hingegen wurde in zahlreichen Studien wiederholt festgestellt, dass bei semiimmunen Individuen die Wahrscheinlichkeit, an Malaria zu erkranken, umso geringer ist, je höher die Multiplizität der Infektion (MOI) liegt bzw. dass eine polyklonale Infektion (MOI > 1) protektiv wirkt [35-38]. Dabei ist die MOI definiert als die Anzahl differenzierbarer Plasmodien-Genotypen zu einer bestimmten Zeit im Wirt [37, 39-41] (vgl. 2.2.2.3). Somit gilt die MOI beim semiimmunen Menschen als Indikator für das Ausmaß der Prämunitation. Zugleich ist sie der objektivste Parameter zum Einschätzen des Ausmaßes der Semiimmunität [31].

Tabelle 2 bietet eine Übersicht über die drei Elemente der Semiimmunität.

Tabelle 2: Die drei Elemente der Semiimmunität

Mechanismus	Ausmaß ermittelbar über	Ziel	Auswirkung
abgeschwächte antiparasitäre Zytokine	Parasitendichte	keine Eliminierung, sondern anhaltende, niedrigschwellige Parasitämie	ermöglicht Prämunition
Toleranz gegenüber Endotoxinen = antitoxische Immunität	Klinische Symptome, insb. Fieber*	keine klinischen Symptome, insb. kein Fieber; keine Eliminierung, sondern anhaltende, niedrigschwellige Parasitämie	ermöglicht Prämunition
persistierende Plasmodieninfektion = Prämunition	Multiplizität der Infektion (MOI)	hohe Parasitenvielfalt	spezifische Immunantwort kontrolliert Neuinfektionen mit gleichen oder ähnlichen Epitopen

* Das Ausmaß der Toleranz gegenüber Malariaendotoxinen kann definiert werden über die mittlere Parasitendichte \bar{x}_{geom} , bei der erste Symptome bzw. Fieber auftreten [42].

1.3.2 Entwicklung der Semiimmunität in hochendemischen Gebieten

Die Semiimmunität entwickelt sich lediglich in endemischen Malariagebieten und nur nach wiederholten Infektionen und Erkrankungen [43].

1.3.2.1 Definition Malariaendemiegebiet

Als Malariaendemiegebiete gelten gemäß WHO-Kriterien Regionen, in denen über Jahre hinweg konstant messbare Transmissions- und Inzidenzraten vorliegen. Entsprechend werden Gebiete hinsichtlich jener zweier Parameter charakterisiert: Bezüglich der Erregerübertragung wird zwischen Transmissionsgebiet mit oder ohne saisonale Schwankungen unterschieden und hinsichtlich der Infektionshäufigkeit findet eine Klassifizierung über den Anteil (%) der zwei- bis neunjährigen Kinder statt, bei denen eine mikroskopisch detektierbare Parasitämie oder eine Splenomegalie vorliegt: Danach wird die Region als hypo- (0-10%), meso- (11-50%), hyper- (51-75%) oder holoendemisch (>75%) klassifiziert [44].

1.3.2.2 Stufen der Immunitätsentwicklung

Im Folgenden soll der Verlauf der Entwicklung vom Säugling hin zum gegen *P. falciparum* semiimmunen Jugendlichen speziell in hyper- und holoendemischen Endemiegebieten beispielhaft aufgezeigt werden, unter Beachtung der drei Elemente der späteren Semiimmunität: abgeschwächte antiparasitäre Zytokine (gemessen an der Parasitendichte), antitoxische Immunität (beurteilt über Symptome, insb. Fieber) und Prämunitation (ermittelt über die MOI).

In den ersten Lebensmonaten erkranken Kinder nicht an Malaria und weisen nur geringgradige Parasitendichten auf. Ihnen verleihen die im Rahmen des sogenannten „Nestschutzes“ diaplazentar übertragenen, mütterlichen IgG-AK eine passive Immunität gegen *P. falciparum* [45, 46]. Zudem wirkt das anhaltende fetale Hämoglobin (HbF) protektiv [47, 48], da HbF (wie die Hämoglobinopathien, s. 1.3) Replikation und Multiplikation der Plasmodien innerhalb der Erythrozyten erschwert. Nach den ersten 16 - 20 Lebenswochen schließlich ist sowohl der Titer mütterlicher AK [49, 50], als auch der HbF-Wert [47] unter das Wirkniveau abgefallen. Damit steigt das Erkrankungsrisiko unmittelbar, zusätzlich erhöht durch ein mit zunehmender Körpergröße steigendes Expositionsrisiko [51]. Eine Plasmodieninfektion jeglicher Dichte geht dann beim Säugling mit einer Malariaepisode einher. Das Immunsystem versucht in deren Verlauf die Parasiten komplett mittels antiparasitärer Zytokinen zu vernichten, so dass über die Erkrankung hinaus keine niedrigschwellige Parasitämie gehalten werden kann. MOI kann somit in diesem Alter meist nur im Rahmen von Malariaattacken nachgewiesen werden, ist also krankheitsassoziiert und spiegelt keine Prämunitation wieder [52, 53].

In etwa mit dem zweiten Lebensjahr lässt sich die Entwicklung der Semiimmunität und ihrer Einzelfaktoren erkennen: Das Immunsystem toleriert zusehends Parasitämien, allerdings in großem Ausmaß, so dass die Parasitendichte in diesem Alter Spitzenwerte erreicht [54, 55]. So kommt es sehr häufig zu fieberhaften Malariaattacken, auch weil die Toleranz gegenüber parasitären Endotoxinen noch gering ist. MOI steigt in diesem Alter mit zunehmender Parasitendichte [56]. Mit fortschreitendem Alter gehen asymptomatische Infektionen und eine hohe MOI bereits mit einem Schutz vor Neuinfektionen einher [35-38, 57].

Ungefähr mit Beginn des sechsten Lebensjahres nehmen Morbidität und Mortalität stark ab, und um das 15. Lebensjahr herum erreicht die Malariainzidenz schließlich den anhaltenden Tiefpunkt [54], die Semiimmunität ist voll ausgereift.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Ausbildung der Semiimmunität bzw. deren Geschwindigkeit von der lokalen Malariaendemizität abhängt [43]. Dabei entwickeln sich die Einzelfaktoren der Semiimmunität bzw. die objektivierbaren Parameter Parasitendichte, Symptome und MOI in unterschiedlicher Geschwindigkeit und Beziehung zueinander. Deren jeweilige Aussagekraft über den Immunstatus gegen Malaria ist im Verlauf bislang nur wenig erforscht. Mögliche Korrelationen zwischen der MOI und dem Malariarisiko im Kleinkindalter stellen einen Teil der Nachforschungen im Rahmen dieser Arbeit dar.

1.4 Prophylaktische Eingriffe während der Entwicklung der Semiimmunität

1.4.1 Gründe und Gefahren

Angesichts der Entwicklung des Immunsystems von Menschen in hochendemischen Gebieten und der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken [1] wird deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit, an Malaria zu erkranken und zu versterben, besonders in den ersten fünf Lebensjahren sehr hoch ist, und diese Altersgruppe somit besonderen Schutzes bedarf. Andererseits wird im Blick auf die Entstehung der Semiimmunität auch klar, dass jegliche Behandlung bzw. Vermeidung von Plasmodieninfektionen bei Säuglingen und Kleinkindern die Etablierung der Semiimmunität behindern bzw. verzögern könnte, da diese auf wiederholtem Erregerbefall beruht. Aufgrund dieser Kontroverse müssen Eingriffe gegen Malaria im Kindesalter eingehend überdacht und ihre Spätfolgen überprüft werden. Bislang wurde beobachtet, dass prophylaktische Interventionen die Entwicklung der Semiimmunität unterbrechen und verzögern [58-60] und/ oder es unmittelbar nach deren Beendigung zu einem Anstieg, einem so genannten *Rebound* von Morbidität und Mortalität kommen kann [6-8, 60-63].

1.4.2 Intermittierende präventive Behandlung von Säuglingen (IPTi)

Das Wissen um die Entwicklung der Semiimmunität und die Erkenntnisse über die potentiell nachteiligen Spätwirkungen von Interventionen bei Kindern haben in der aktuellen Forschung zu dem Konzept der intermittierenden präventiven Behandlung von Säuglingen mit Antimalariamedikamenten geführt, dem so genannten *Intermittent Preventive Treatment in Infants* (IPTi). Dabei wird Säuglingen in Malariaendemiegebieten wiederholt zu bestimmten Zeitpunkten, unabhängig ihres Infektionsstatus, eine Dosis eines Antimalariamedikaments mit prophylaktischer Wirkung verabreicht. Auf diese Weise sollen die Kinder präventiv vor Malaria im ersten Lebensjahr geschützt werden,

ohne dass dabei die Grundlage für die Entwicklung der Semiimmunität gefährdet und ein Reboundeffekt riskiert wird, denn die intermittierende Behandlung erlaubt (im Gegensatz zu einer dauerhaften) durch den zwischenzeitlichen Medikamentenspiegelabfall das Zustandekommen von Infektionen.

Um die Wirksamkeit von IPTi zu erforschen, wurde dieses Konzept im Verlauf der letzten zehn Jahre u. a. im Rahmen von sechs, jeweils randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudien in Subsahara-Afrika durchgeführt [64-69]. Die mehrmaligen Interventionen wurden jeweils zum Zeitpunkt der Standardimpfungen im Rahmen des Impfprogramms EPI durchgeführt. Das Medikament der Wahl war jeweils Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP). Neben dem therapeutischen Effekt bietet dieses Kombinationspräparat synergistischer Folsäureantagonisten (im Verhältnis 20:1) aufgrund langer Halbwertszeiten (Sulfadoxin ca. acht, Pyrimethamin ca. vier Tage) einen chemoprophylaktischen Schutz von mindestens vier Wochen.

Die in Tamale, Nordghana [68] und Afigya Sekyere, Südghana [67] durchgeführten IPTi-SP-Studien bildeten die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Deshalb werden deren Ergebnisse zur Wirksamkeit von IPTi bezüglich der Reduzierung von malariabedingter Morbidität und Mortalität im Folgenden schwerpunktmäßig vorgestellt.

1.4.3 Ergebnisse IPTi-Studien in Tamale und Afigya Sekyere

Sowohl in Tamale, als auch in Afigya Sekyere erwies sich IPTi-SP im ersten Lebensjahr als sinnvoll, da die Intervention die Inzidenzdichte von Malaria signifikant sinken ließ, im hyperendemischen Tamale um 32%, im holoendemischen Afigya Sekyere um 21%. Ebenso reduzierte IPTi-SP in diesem Zeitraum an beiden Studienorten das Risiko für Malaria und Anämie sowie die Fälle an Krankenhausaufenthalten [67, 68, 70]. Tabelle 3 bietet eine Übersicht über die Protektive Effektivität (PE) von IPTi-1 und -2 bis zum zwölften Lebensmonat. Die Daten entstammen einer gepoolten Analyse durch Aponte et al. [70].

Tabelle 3: Protektive Effektivität von IPTi im ersten Lebensjahr (3. - 12. Lebensmonat) in % (95% KI)

	Tamale	P	Afigya Sekyere	P
Malaria				
- Inzidenz	32,4 (19,6 - 43,2)	< 0,001	20,7 (8,7 - 31,2)	0,001
- Risiko	30,7 (19,6 - 40,3)	< 0,001	11,4 (-0,6 - 22,1)	0,062
Anämie*				
- Risiko	17,0 (0,8 - 30,5)	0,041	11,1 (-4,5 - 24,4)	0,154
Hospitalisierung				
- Inzidenz	49,8 (18,5 - 69,0)	0,005	17,8 (-22,4 - 44,8)	0,334

* Hb < 8g/dl; KI: Konfidenzintervall

Im Gegensatz zu IPTi-1 und -2 bewirkte die über das erste Lebensjahr hinweg fortgesetzte Behandlung in Form von IPTi-3 im 15. Lebensmonat keine nachhaltigen Effekte mehr [67, 68]. Somit erscheint eine auf das zweite Lebensjahr ausgeweitete Version der intermittierenden präventiven Behandlung in diesen beiden hochendemischen Gebieten als nicht sinnvoll. Tabelle 4 bietet eine Übersicht über die PE von IPTi-3 bis zum 21. Lebensmonat. Die Daten entstammen den Veröffentlichungen von Kobbe et al. [67] und Mockenhaupt et al. [68].

Tabelle 4: Protektive Effektivität von IPTi-3 (15. - 21. Lebensmonat) in % (95% KI)

	Tamale	P	Afigya Sekyere	P
Malaria				
- Inzidenz	9,9 (-5,8 - 23,3)	0,20	-5,2 (-24,5 - 11,1)	0,56
Anämie*				
- Inzidenz	14,3 (-9,6 - 33,1)	0,22	-9,9 (-37,0 - 11,9)	0,40
Hospitalisierung				
- Inzidenz	13,3 (-26,9 - 40,8)	0,46	-58,6 (-163,7 - 4,6)	0,08

* Tamale: Hb < 7g/dl, Afigya Sekyere: < 7,5 g/dl; KI: Konfidenzintervall;

Im Beobachtungszeitraum bis zur Vollendung des zweiten Lebensjahres blieb ein befürchteter Reboundeffekt der Intervention für Malariafälle aus. Postinterventionell wurde eine Häufung von Fällen von Anämie in Afigya Sekyere (Hb < 7,5 g/dl) und von schwe-

rer Malariaanämie in Tamale beobachtete. Obgleich von geringer Zahl und lange erst lange nach der letzten Dosis von IPTi aufgetreten weisen diese Fälle auf die Möglichkeit eines Rebound hin [67, 68, 70].

Zu keinem Zeitpunkt und an keinem der Studienorte ließ sich ein Einfluss von IPTi auf die Mortalität nachweisen [67, 68].

Die vielversprechenden Ergebnisse zur protektiven Wirkung von IPTi im ersten Lebensjahr stimmen mit den anderen vier, bislang mit SP durchgeführten Studien ähnlichen Protokolls in Tansania, Mosambik, Ghana und Gabun überein [64-66, 69]. Dies ergab auch die Gegenüberstellung aller sechs Untersuchungen im Rahmen einer gepoolten Analyse durch Aponte et al. [70]. Zudem konnten dort keine nachteiligen Auswirkungen von IPTi im ersten Lebensjahr auf das Risiko für nachfolgende Fälle unkomplizierter Malaria festgestellt werden. Jedoch zeichnete sich für den postinterventionellen Zeitraum in Navrongo, Ghana ein signifikanter Anstieg von Malariafällen mit hoher Parasitendichte ab [65]. In Ifakara, Tansania hingegen konnte ein übers erste Lebensjahr hinweg anhaltender Schutz gegen Malaria verzeichnet werden [71].

Festzuhalten bleibt, dass sich das Konzept der intermittierenden präventiven Behandlung in hochendemischen Gebieten im ersten Lebensjahr als sinnvoll auszeichnet, da es in diesem Zeitraum wenngleich nicht die Mortalität, so doch die malariabedingte Morbiditäten effektiv senkt. Jedoch lässt der in Folge von IPTi beobachtete Reboundeffekt [65] ebenso wie der entdeckte, konträre Effekt anhaltenden Schutzes [71] eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Semiimmunität durch die Intervention vermuten.

1.4.4 Einfluss von IPTi auf die Entwicklung der Semimmunität

Bislang liegen zur Auswirkung von IPTi auf die mit dem zweiten Lebensjahr beginnende komplexe Entwicklung der Semiimmunität noch keinerlei Studien vor. In der Vergangenheit haben sich lediglich vier Studien mit dem Einfluss von Interventionen zur Malariaprävention im frühen Kindesalter auf die MOI auseinandergesetzt: Die Wirksamkeit des Impfstoffes SPf66 untersuchten Haywood et al. bei Säuglingen [72], Beck, Felger et al. bei Kleinkindern [35]. Letzt genannte analysierten zudem den Effekt dauerhafter Gabe von Dapson-Pyrimethamin (DP) bei Säuglingen [8] und Fraser-Hurt und Kollegen die Wirkung von insektizidimprägnierten Moskitonetzen (ITN) bei ein- bis zweijährigen Kindern [56]. Hinsichtlich der MOI ergab sich, dass eine Expositionsminderung durch ITN

keinen Einfluss auf die MOI hatte. Hingegen senkten sowohl die Impfung, als auch die dauerhafte Chemoprophylaxe mit DP die MOI deutlich, wobei für letztere Intervention zugleich ein Reboundeffekt beobachtet wurde.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Vorkehrungen zur Prävention von Malaria im Säuglingsalter laufen Gefahr, die Entwicklung der Semiimmunität und Prämunitation negativ zu beeinflussen, und so zu einem Anstieg der malariabedingten Morbidität nach Beendigung der Intervention zu führen [6-8, 60-63]. Prämunitation stellt dabei den Schutz vor Superinfektionen mit *P. falciparum* dar, beruhend auf einer persistierenden, polyklonalen Infektion, die es dem Immunsystem erlaubt, neu auftretende Plasmodienstämme direkt oder aufgrund von Kreuzreaktionen zu kontrollieren bzw. abzuwehren [30-32]. Das Ausmaß der Prämunitation kann annähernd durch die Anzahl differenzierbarer Plasmodien-Genotypen im Wirt als Multiplizität der Infektion (MOI) bemessen werden [8]. Studien haben gezeigt, dass dauerhafte Präventionsmaßnahmen im Kindesalter dazu führen, dass die MOI sinkt und post-interventionell zugleich die Malariainzidenz steigt [8].

Die vorliegende Arbeit soll analysieren, welchen Einfluss das neuartige Präventionskonzept, die intermittierende präventive Behandlung von Säuglingen (IPTi) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP), auf die Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum* beim Kleinkind hat. Außerdem soll untersucht werden, in welchem Zusammenhang die MOI in diesem Alter mit dem prospektiven Risiko für malariabedingte Morbidität steht.

Grundlage für die Untersuchung waren zwei in den Jahren 2003 bis 2005 durchgeführte placebokontrollierte, randomisierte, doppelblinde IPTi-Studien in Tamale, Nordghana und im Afigya Sekyere District, Südghana, bei denen IPTi die Inzidenz der Malaria im ersten Lebensjahr um 33% bzw. um 21% reduzierte [67, 68]. Insgesamt wurden 2270 Säuglinge eingeschlossen, die im Alter von drei, neun und 15 Monaten, unabhängig ihres Infektionsstatus, eine therapeutische Dosis Sulfadoxin-Pyrimethamin oder Placebo erhielten. Während der Studienzeit vom dritten bis zum 24. Lebensmonat erfolgten Nachuntersuchungen in monatlichen (Afigya Sekyere) bzw. in dreimonatlichen (Tamale) Abständen. Die Multiplizität der Infektion wurde im 15. Lebensmonat, sechs Monate nach der zweiten IPTi-Dosis, untersucht. Außerdem wurde die Multiplizität der Infektion in Beziehung zum prospektiven Risiko für nachfolgende Malariaepisoden und Anämien (Monat 15-24) gesetzt.

2 Studienaufbau, Material, Methoden

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Studienrahmen

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden zwei Feldstudien in Afigya Sekyere, Ghana und in Tamale, Ghana fanden innerhalb des Forschungsprojekts *Intermittent treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine as a Mean of Malaria Control in African Children* statt. Die Studien wurden durch die *Deutsche Malariainitiative* (BMBF, BMZ, DFG, DAAD) gefördert und unter der wissenschaftlichen Leitung des Bernhard-Nocht-Instituts (BNI) für Tropenmedizin, Hamburg und des Instituts für Tropenmedizin (IfT), Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Die Studien wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Kriterien der Helsinki Deklaration [73] durchgeführt und durch einen externen Gutachter als den Qualitätsanforderungen der *Good Clinical Practice* konform erachtet. Die ethische Zustimmung wurde von den zuständigen, ghanaischen Komitees erteilt: den Ethikkomitees der University for Development Studies, Tamale, des Gesundheitsministeriums der Northern Region, Tamale und der Medizinischen Fakultät der Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi.

Von der Verfasserin eigenständig vorgenommene Untersuchungen umfassten die Genotypisierung der *P. falciparum* Infektionen und die Bestimmung der Multiplizität der Infektion (s. 2.2.2.3).

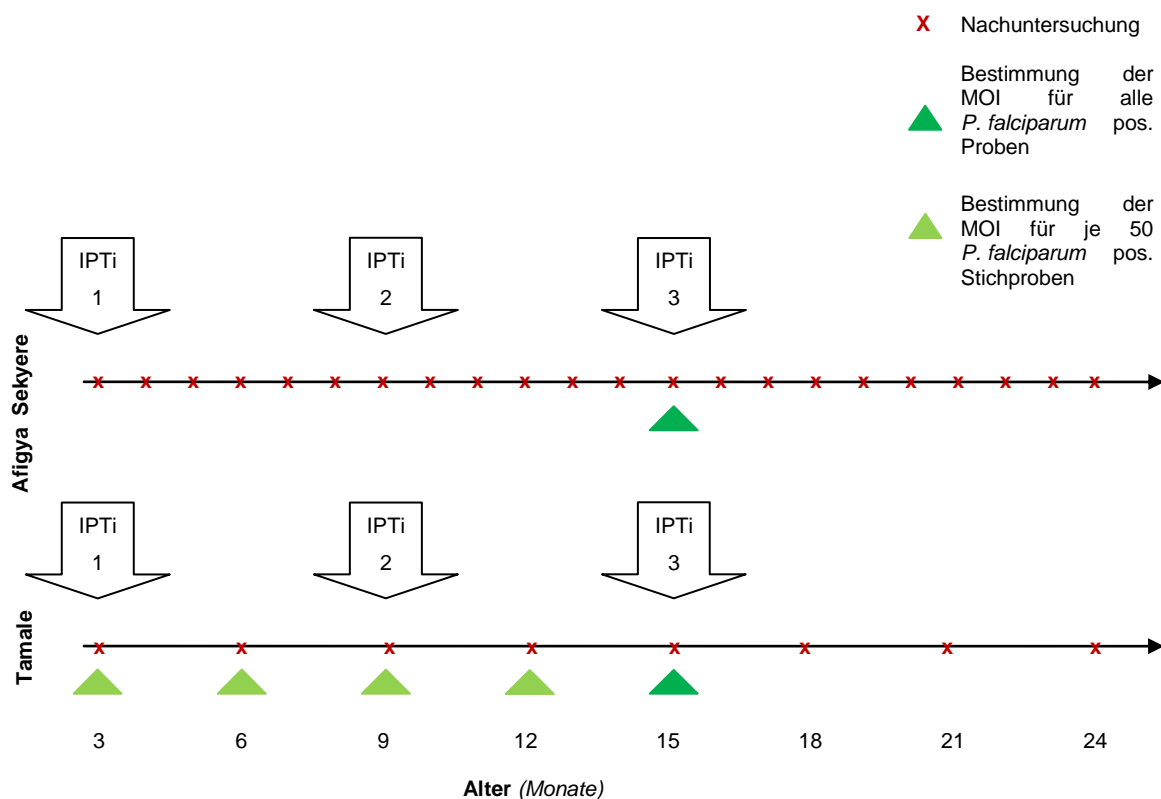
2.1.2 Studiendesign

Die beiden Feldstudien waren jeweils als placebokontrollierte, randomisierte und doppelblinde Kohortenstudien gestaltet. Im Verlauf des Jahres 2003 wurden an den beiden Studienorten in Afigya Sekyere und in Tamale insgesamt 2270 Säuglinge rekrutiert, wovon die eine Hälfte im Alter von drei (IPTi-1), neun (IPTi-2) und 15 (IPTi-3) Monaten eine therapeutische Dosis Sulfadoxin-Pyrimethamin (125 / 6,25 mg) erhielt, die andere ein Placebo. Um die unmittelbaren und längerfristigen Auswirkungen von IPTi mit SP zu erforschen, wurden die Probanden regelmäßig auf bestimmte Parameter hin untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten zum Zeitpunkt der Therapiegabe und bei Nachuntersuchungen, die sich in monatlichen (Afigya Sekyere) bzw. dreimonatlichen (Tamale)

Abständen anschlossen und bis zum Erreichen des 24. Lebensmonats fortgeführt wurden.

Im Hinblick auf die Fragen der vorliegenden Arbeit wurde dabei die MOI bei der letzten Intervention IPTi-3 für alle *P. falciparum* positiv detektierten Proben ermittelt. Für die Kohorte in Tamale wurde zudem die MOI im dritten, sechsten, neunten und zwölften Lebensmonat für jeweils 50 positive Stichproben bestimmt. Abbildung 1 bietet eine Übersicht über die Zeitpunkte der Interventionen und Untersuchungen.

Abbildung 1: Übersicht Studiendesign



Der Stichprobenumfang wurde auf der Grundlage der Daten von Schellenberg et al. extrapoliert: Eine Fallzahl von je 1000 Kindern pro Kohorte wurde als ausreichend eingeschätzt, um im Vergleich zwischen Behandlungs- und Placebogruppe einen Rückgang der Inzidenz von Malaria und schwerer Anämie um je 25% zu detektieren [64].

Mittels Blockrandomisierung in Gruppen von je zehn, erhielten jeweils fünf Kinder SP und fünf Placebo. Randomisierungs- und Medikamentencodes wurden vor Beginn der Studie gebildet, von einem unabhängigen Dritten verwahrt und erst entschlüsselt, als das zuletzt rekrutierte Kind 24 Monate alt war.

2.1.3 Studienzeit

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bei jedem einzelnen Probanden über 21 Monate, vom dritten (IPTi-1) bis zum vollendeten 24. Lebensmonat. Damit dauerte die Feldstudie in Tamale von März 2003 bis Juli 2005, in Afigya Sekyere von Januar 2003 bis September 2005. Molekularbiologische und immunologische Diagnostik, Datenverarbeitung und statistische Analysen fanden am IfT Berlin und am BNI Hamburg in den Jahren 2006 bis 2008 statt.

2.1.4 Studienleitung und Studienzentren

Vor Ort wurden die Studien jeweils von einem Studienteam durchgeführt: Zwei Ärzte, zwei bis drei Pflegekräfte, zwei bis drei Laborassistenten und zehn bis fünfzehn Community Health Worker waren für Rekrutierung, Untersuchung, Behandlung und Datenerfassung zuständig. Das Studienzentrum in Tamale war das Bulpeila Health Centre, in Afigya Sekyere wurde die Studie über die jeweiligen Gesundheitszentren der zu dem Distrikt gehörenden neun Siedlungen durchgeführt.

2.1.5 Studienorte

Die beiden Studienorte in Ghana, Westafrika unterscheiden sich bezüglich geographischer Lage, Wirtschaft, Klima und Epidemiologie:

Tamale ist die Hauptstadt von Ghanas Northern Region mit einer Bevölkerungszahl von ca. 350 000 Menschen und einer Fläche von ca. 750 km². Die Stadt ist ländlich geprägt, Haupteinkommensquellen sind Selbstversorgerlandwirtschaft und Kleinhandel. Das Klima und die Vegetation sind vom Savannentyp, die Regenzeit erstreckt sich von Mai bis Oktober, die Trockenzeit von November bis April. Das Malariagebiet wird als hyperendemisch eingestuft, mit ganzjähriger Infektionsgefahr und nur moderaten saisonalen Schwankungen [74]. Entomologische Daten stehen nicht zur Verfügung.

Während der Zeit der Studiendurchführung war der Gebrauch von Moskitonetzen gering (3%) [75] und die Kontrolle der Malaria bestand im Wesentlichen aus der präsumtiven Behandlung mit Chloroquin mit Heilungsraten unter 50% [76]. SP als Therapeutikum bei Kindern hatte sich in einer vorausgegangenen Studie in 86% der Fälle als wirksam erwiesen [77]. Mehr als die Hälfte der Kinder, die im Krankenhaus mit schwerer Malaria aufgenommen wurden, wiesen schwere Anämien auf [78].

Afigya Sekyere ist ein Verwaltungsgebiet in der Ashanti Region in Südghana, die Bevölkerungszahl wird auf 110 000 geschätzt, die Fläche auf 770 km². Die Wirtschaft der Region basiert hauptsächlich auf dem Anbau von „cash crops“ wie Coca, Kaffee und Palmöl, obgleich der Großteil der Bevölkerung Selbstversorger sind. Trotz Landwirtschaft und Rodungsbau ist das Gebiet nach wie vor weitgehend vom tropischen Regenwald bedeckt. Das Klima ist tropisch mit Regenzeiten von Mai bis Oktober [79]. Das Malariagebiet wird als hyper- bis holoendemisch eingestuft mit ganzjähriger Infektionsgefahr und nur moderaten saisonalen Schwankungen [79]. *P. falciparum* überwiegt mit 80-90% als Erreger der Malaria, *Anopheles gambiae* und *Anopheles funestus* sind die Hauptüberträger. Moskitonetze wurden zur Zeit der Studie von nur 2% der Bevölkerung genutzt [80]. Das Therapeutikum erster Wahl bei Malaria ist seit März 2003 Amodiaquin-Artesunat (s. 2.1.7.2), zuvor wurde hauptsächlich mit Chloroquin behandelt. Jüngsten Studien zufolge liegt gegen Chloroquin eine hohe und gegen SP eine moderate Resistenz vor [81]. Aktuelle, repräsentative Daten zur Anämieprävalenz liegen nicht vor.

2.1.6 Studiengruppen und Probanden

In Tamale umfasste die Geburtskohorte 1200, in Afigya Sekyere 1070 Säuglinge. Die Kinder wurden im dritten Lebensmonat rekrutiert (zum Zeitpunkt ihrer zweiten Impfung im Rahmen des EPI) und erhielten dann jeweils ihren individuellen Identifikationscode und einen Studenausweis. Folgenden Kriterien mussten bei der Rekrutierung von den Studienteilnehmern erfüllt sein:

- schriftliche Einverständniserklärung der Eltern bzw. der Mutter
- ständiger Wohnsitz im Studiengebiet

Kinder, die zu irgendeinem Zeitpunkt der Studie folgende Kriterien erfüllten, wurden von einer (weiteren) Teilnahme ausgeschlossen:

- schweres Untergewicht
- Zeichen angeborener Fehlbildungen
- zerebrale Schäden aufgrund von Asphyxie
- Zeichen hepatischer oder renaler Dysfunktion, die nicht auf Malaria zurückzuführen waren
- Überempfindlichkeitsreaktionen auf Sulfonamide oder Pyrimethamin
- sonstige schwere Nebenwirkungen von SP
- Widerruf der Einverständniserklärung

2.1.7 Interventionen

2.1.7.1 Planmäßige Interventionen: IPTi

SP bzw. Placebo wurde den Probanden (unabhängig ihres *P. falciparum*-Infektionsstatus) zum Zeitpunkt der Standardimpfungen im Rahmen des EPI im dritten (IPTi-1) und neunten Lebensmonat (IPTi-2) verabreicht sowie zusätzlich im 15. Lebensmonat (IPTi-3) (vgl. Abbildung 1), jeweils nach Untersuchung, Anamnese und Blutabnahme.

Sulfadoxin-Pyrimethamin (Fansidar®, Roche, Schweiz) bzw. Placebo aus Laktose und Maisstärke (Roche, Schweiz) wurden als Tabletten in feuchtigkeit- und lichtundurchlässigen Blisterpackungen zu Verfügung gestellt, optisch waren die Produkte nicht zu unterscheiden. Die Verpackungen waren bereits im Vorfeld mit den jeweiligen Identifikationscodes bedruckt worden und den Probanden somit klar zuzuordnen. Verum bzw. Placebo wurden jeweils unter medizinischer Aufsicht eingenommen: Die Tablette wurde zerkleinert, in Wasser aufgelöst und dann verabreicht. Die Probanden waren anschließend 30 min unter Beobachtung und im Falle von Erbrechen wurde die Behandlung wiederholt. Die Dosis betrug jeweils eine halbe Tablette, was im Falle von SP einer Menge von 125 mg Sulfadoxin und 6,25 mg Pyrimethamin entspricht.

2.1.7.2 Außerplanmäßige Interventionen: Therapien bei Erkrankungen

Im Falle einer diagnostizierten Malaria (s. 2.3.4) wurden die Kinder medikamentös behandelt: in Tamale mit Artesunat (Mepha, Schweiz) über fünf Tage (8 mg pro kg KG am ersten, 4 mg pro kg KG an den folgenden Tagen), in Afigya Sekyere mit Artesunat-Amodiaquin (Sanofi-Aventis, Frankreich) über drei Tage (täglich 4 mg pro kg KG Artesunat und 10 mg pro kg KG Amodiaquin). Wurde eine schwere Malaria diagnostiziert (s. 2.3.4), wurden die Kinder in das nächste Krankenhaus eingewiesen und gemäß den nationalen Therapierichtlinien behandelt.

Eine nicht ärztlich verordnete, eigenständig durchgeführte Antimalariatherapie wurde bei jedem Besuch durch eine spezifische Medikamentenanamnese überprüft sowie in Tamale zum Zeitpunkt von IPTi-3 durch die Untersuchung ausgewählter Blutproben auf Chloroquin- und Pyrimethaminrückstände (s. 2.2.3).

Im Falle eines Hb von < 8 g/dl wurde oral Eisen-(II)-Sulfat und Folsäure verabreicht. Folsäure wurde nach erfolgter IPTi aufgrund möglicher, unerwünschter Wechselwirkungen mit SP über sieben Tage nicht verabreicht [82]. Alle anderen im Studienzeit-

raum aufgetretenen Erkrankungen wurden gemäß der nationalen Therapierichtlinien behandelt [83].

2.1.8 Untersuchungen

2.1.8.1 Untersuchungen IPTi-1, IPTi-2, IPTi-3

Zum Zeitpunkt von IPTi-1, IPTi-2 und IPTi-3 (s. Abbildung 1), zu den regulären Nachuntersuchungen (s. 2.1.8.2) und bei Vorstellung eines Kindes zu jedem anderen Zeitpunkt wurde eine standardisierte Anamnese erhoben, das Kind von einem Arzt körperlich untersucht, venöses Blut abgenommen und labortechnisch analysiert, und schließlich wurden sämtliche Ergebnisse dokumentiert .

Bei der körperlichen Untersuchung und der labortechnischen Untersuchung des Blutes wurden u.a. folgende, für die vorliegende Arbeit relevanten Parameter bestimmt:

- Temperatur (°C), tympanisch in Afigya Sekyere, axillär in Tamale (Thermo-Scan plus IRT 3520, Braun, Deutschland)
- Größe (cm)
- Gewicht (kg)
- Oberarmumfang (cm)
- mikroskopische Parasitämie (Parasiten/ μ l)
- Hämoglobin (g/dl)

zusätzlich zum Zeitpunkt von IPTi-3:

- submikroskopische Plasmodieninfektion für alle Proben in Tamale
- MOI der Plasmodieninfektion für alle mikroskopisch pos. Proben, sowie MOI für submikroskopisch positive Proben in Tamale
- Chloroquin- und Pyrimethaminkonzentrationen (ng/ml) für alle Proben aus Tamale, bei denen die MOI ermittelt wurde

2.1.8.2 Nachuntersuchungen

Die Kinder wurden zusätzlich zu den Untersuchungen zu den Zeitpunkten der Intervention bis zum vollendeten 24.Lebensmonat in dreimonatlichen (Tamale) bzw. in monatlichen Intervallen (Afigya Sekyere) (s. Abbildung 1) in das Studienzentrum einbestellt und wie oben beschrieben (s. 2.1.8.1) untersucht.

Außerdem wurden die Eltern der Probanden aufgefordert, bei jeglichen gesundheitlichen Beschwerden bzw. im Falle eines Verdachts auf Malaria mit ihrem Kind beim jeweiligen Studienzentrum zur Untersuchung vorstellig zu werden.

2.2 Methoden zur Untersuchung der Blutproben

2.2.1 Hämatologische Diagnostik

Die Hämoglobinkonzentration (g/dl) wurde unmittelbar nach der venösen bzw. kapillaren Blutentnahme mittels eines HemoCue Photometers bestimmt.

2.2.2 Parasitologische Diagnostik

2.2.2.1 Mikroskopischer Nachweis und Spezifizierung von Plasmodien

Der mikroskopische Nachweis einer Plasmodieninfektion erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme nach üblichem Standard: Blutausstrich und Dicker Tropfen wurden auf einen Objektträger aufgetragen für 30 min in 4% Giemsalösung (pH 7,2) gefärbt, gespült, luftgetrocknet und schließlich unter einem Lichtmikroskop mit einem Öl-Immersionsobjektiv bei 1000facher Vergrößerung untersucht.

Der Blutausstrich diente der Differenzierung der Plasmodienart (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*), der Dicke Tropfen erlaubte die Bestimmung der Parasitendichte: Dabei wurden Plasmodien im asexuellen Stadium pro 200 Leukozyten ausgezählt (bzw. pro 500 bei weniger als zehn detektierten), die Dichte wurde in Plasmodien/ μ l Blut angegeben (unter der Annahme von 8000 Leukozyten/ μ l Blut).

2.2.2.2 Nachweis submikroskopischer Infektionen

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden in einem Labor am IfT durchgeführt, um systematische Fehler bspw. durch variable DNA-Qualität zu relativieren.

Der Nachweis einer submikroskopischen Parasitämie, inklusive der Bestätigung der Plasmodienspezies, erfolgte molekularbiologisch mithilfe einer speziellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [84]: Die für *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae* spezifischen DNA-Sequenzen des *ssrRNA*-Gens wurden mittels geschachtelter PCR amplifiziert, die Fragmente anschließend durch Elektrophorese auf mit Ethidiumbromid versetztem, hochauflösendem Agarosegel aufgetrennt, mittels UV-Belichtung sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Die Bestimmung der artspezifischen Banden erfolgte visuell.

2.2.2.3 Genotypisierung von *P. falciparum* und Bestimmung der MOI

Der Bestimmung der Multiplizität der Infektion ging mit der Genotypisierung der *P. falciparum* Infektionen einher, da die MOI definiert ist als die Anzahl von Plasmodien-Genotypen im Wirt [37, 39-41].

Da Plasmodien lediglich über einen haploiden Chromosomensatz verfügen, lässt sich die Klonalität über die Zahl verschiedener Genotypen eines Locus bestimmen. Im Sinne größtmöglicher Genauigkeit werden standardgemäß mehrere polymorphe Plasmodien-gene detektiert. Im Rahmen dieser Studie wurden die Proben auf zwei Gene von *P. falciparum* hin untersucht, die jeweils für Merozoite Surface Proteine (MSP) codieren und für deren Allele ausgeprägte Längenpolymorphismen vorliegen: Gen *msp-1* mit den drei Allelen K1, Mad20 und Ro33 und Gen *msp-2* mit den zwei Allelen FC27 und IC/3D7.

Die Detektion dieser Allele bzw. die Genotypisierung der Plasmodien in den Proben erfolgte mittels PCR und Gelelektrophorese und wurde, ebenso wie die anschließende Bestimmung der MOI, von der Verfasserin der vorliegenden Arbeit am IfT Berlin durchgeführt.

2.2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR zur Amplifikation der Allele von *msp-1* und *msp-2* erfolgte nach dem Protokoll von Snounou et al. [84]. Die geschachtelte PCR umfasste pro Gen eine äußere und je nach Anzahl der Allele mehrere innere PCRs.

Mittels der äußeren PCR wurden zunächst die konservativen DNA-Sequenzen von *msp-1* und *msp-2* amplifiziert. Dazu wurden 2 µl der zuvor mittels Extraktion (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Deutschland) aus der jeweiligen Probe gewonnen genomischen DNA in einen Reaktionsansatz von 24 µl gegeben (verwendete Primer und Zusammensetzung siehe Tabellen 5 und 6). Anschließend erfolgte die PCR im Thermocycler (Biometra, Deutschland) bei 35 Zyklen. Die Abfolge der Reaktionsschritte ist in Tabelle 7 dargestellt.

Die so gewonnenen Amplifikate dienen als Grundlage für die folgenden, inneren PCRs zur Amplifikation der Allele von *msp-1* und *msp-2*. Hierzu wurde jeweils 1 µl der entsprechenden Matrize einem Reaktionsansatz von 49 µl beigefügt (verwendete Primer und Zusammensetzung siehe Tabellen 5 und 8). Dann wurde die PCR im Thermocycler (Biometra, Deutschland) bei 35 Zyklen durchgeführt. Die Abfolge der Reaktionsschritte ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 5: Primer für die PCR- Reaktionsansätze

Lokus und Reaktion	Allel	Name Primerpaar	Sequenz Primerpaar
<i>msp-1</i>			
äußere PCR		M1- OF	5'-CTA GAA GCT TTA GAA GAT GCA GTA TTG -3'
		M1- OR	5'-CTT AAA TAG TAT TCT AAT TCA AGT GGA TCA -3'
innere PCR	K1	M1- KF	5'-AAA TGA AGA AGA AAT TAC TAC AAA AGG TGC-3'
		M1- KR	5'-GCT TGC ATC AGC TGG AGG GCT TGC ACC AGA -3'
	Mad20	M1- MF	5'-AAA TGA AGG AAC AAG TGG AAC AGC TGT TAC-3'
		M1- MR	5'-ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA ATT ACC-3'
	Ro33	M1- RF	5'-TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG-3'
		M1- RR	5'- CAT CTG AAG GAT TTG CAG CAC CTG GAG ATC-3'
<i>msp-2</i>			
äußere PCR		M2- OF	5'-ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA -3'
		M2- OR	5'-CTT TGT TAC CAT CGG TAC ATT CTT-3'
innere PCR	FC27	M2- FCF	5'-AAT ACT AAG AGT GTA GGT GCA RAT GCT CCA-3'
		M2- FCR	5'-TTT TAT TTG GTG CAT TGC CAG AAC TTG AAC-3'
	IC/3D7	M2- ICF	5'-AGA AGT ATG GCA GAA AGT AAK CCT YCT ACT -3'
		M2- ICR	5'-GAT TGT AAT TCG GGG GAT TCA GTT TGT TCG -3'

Tabelle 6: Reaktionsansatz äußere PCR (*msp-1*, *msp-2*)

Substanz (und Hersteller)	Volumen (μl)	Stoffmengenkonzentration im Ansatz
H₂O	19	
Puffer (Amersham, Großbritannien)	2,5	10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂
Gelatine (Merck, Deutschland)	2,5	0,1 mg/ml
dNTP-Gemisch (Invitrogen, USA)	0,125	je 125 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
äußerer Primer, Partner A* (MWG-Biotech, Deutschland)	0,2	160 nM
äußerer Primer, Partner B* (MWG-Biotech, Deutschland)	0,2	160 nM
HotStarTaq-Polymerase (HotStarTaq®, Qiagen, Deutschland)	0,2	1 U

*siehe Tabelle 5

Tabelle 7: Reaktionsschritte äußere PCR (*msp-1*, *msp-2*)

Reaktionsschritte	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (min)	
Denaturierung, initiale	95	15	
1. Denaturierung	94	1	} 35 Zyklen
2. Primeranlagerung	58	2	
3. Extension	72	2	
Extension, abschließende	72	10	

Tabelle 8: Reaktionsansatz innere PCR (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC/3D7)

Substanz (und Hersteller)	Volumen (µl)	Stoffmengenkonzentration im Ansatz
H₂O	38	
Puffer (Amersham, Großbritannien)	5	10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂
Gelatine (Merck, Deutschland)	5	0,1 mg/ml
dNTP-Gemisch (Invitrogen, USA)	0,35	je 175 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
innerer Primer, Partner A* (MWG-Biotech, Deutschland)	0,4	160 nM
innerer Primer, Partner B * (MWG-Biotech, Deutschland)	0,4	160 nM
Taq-Polymerase (Amersham, Großbritannien)	0,3	1,5 U

*siehe Tabelle 5

Tabelle 9: Reaktionsschritte innere PCR (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC/3D7)

Reaktionsschritte	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Denaturierung, initiale	95	5	
1. Denaturierung	94	1	} 35 Zyklen
2. Primeranlagerung	63	2	
3. Extension	72	2	
Extension, abschließende	72	5	

2.2.2.3.2 Gelelektrophorese

Die Detektion der gewonnenen Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Gelelektrophorese, die die Allele bzw. Allelvarianten aufgrund ihrer Längenpolymorphismen auftrennt und voneinander unterscheiden lässt.

Für die dazu verwendeten, hochauflösenden Agarosegele wurden je nach Allel 5 g, 6 g oder 7 g Agarose (NuSieve GTG®, Cambrex, USA) in 200 µl TBE-Puffer (90 mM TRIS-Base/ pH 9,0, 90 mM Borsäure, 2 mM Na₂-EDTA) aufgelöst und 2 min in einer Mikrowelle verkocht. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit 5 µl Ethidiumbromid (0,2 µl/ml) versetzt und in einer Gelform bei 4 °C ausgehärtet. Die so gewonnenen 2,5% igen Gele dienten der Auftrennung der Amplifikationsprodukte von Allel IC/3D7, die 3% igen der Auftrennung der Amplifikationsprodukte von FC27 und die 3,5% igen Gele der der Amplifikationsprodukte von Allelen des Gens *msp-1*.

Zur Elektrophorese wurden 10 µl der jeweiligen Amplifikationsprodukte mit 0,6 µl Blau-marker (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40% Glycerol) angefärbt und in eine Gelsubstratrasche gegeben. Nach der Beladung wurden die in TBE-Laufpuffer gelagerten Gele unterschiedlich lang einer Spannung von 80 V ausgesetzt und die Amplifikationsprodukte so ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Laufzeit orientierte sich an der Größenordnung der Allele und betrug für Ro33 ca. 90 min, für K1, Mad20, FC27 120 min und für IC/3D7 150 min. Um ein Schmelzen der Gele zu verhindern, wurde das Verfahren unter permanenter Kühlung durchgeführt (Lagerung der Gelelektrophoresekammern in Eisbädern).

Die Banden wurden anschließend mittels UV-Belichtung sichtbar gemacht und photographisch mit Hilfe einer Auswertungssoftware (Genetools, Syngene, England) dokumentiert und bewertet. Dabei erfolgte die Quantifizierung der Allelvarianten über eine visuelle Größenbestimmung der Banden in Basenpaaren (bp) mit Hilfe eines DNA-Molekulargewichtsmarkers (20 bp Extended Range DNA Ladder, Cambrex, USA). Dieser war bei jeder Gelelektrophorese zweifach parallel zu den Proben gelaufen.

2.2.2.3.3 Bestimmung der Multiplizität der Infektion

Zur Ermittlung der MOI wurden (wie in Tabelle 10 am Beispiel einer Probe dargestellt) jeweils für das Gen *msp-1* und *msp-2* getrennt die Anzahl aller mittels PCR und Gelelektrophorese detektierten Allelvarianten ausgezählt und addiert. Standardgemäß ergab die größere Summe die MOI [37, 39-41]. Somit stellt MOI nicht die maximal mögliche Anzahl A von genetisch verschiedenen Plasmodien in der Probe dar

($A = \{n_{\text{Genvariante } MSP_1} \times n_{\text{Genvariante } MSP_2}\}$), sondern die mit Sicherheit zu bestimmende Mindestzahl. Der in Tabelle 10 vorgestellte Fall begründet exemplarisch diese Definition: Hier könnten gegebenenfalls drei *msp-1*-Fragmente mit jeweils drei der fünf *msp-2*-Fragmente die gleichen Parasiten darstellen.

Tabelle 10: Bestimmung der MOI am Beispiel einer *P. falciparum* positiven Blutprobe

	<i>msp-1- Gen</i>			<i>msp-2- Gen</i>	
Amplifizierte Allele	Ro33	Mad20	K1	FC27	IC/3D7
Größe der Amplifikationsprodukte (bp)		230	200	500	280
			255	650	350
					380
Anzahl der Allelvarianten	0	1	2	2	3
Anzahl der Genvarianten	3			5	
MOI	5				

bp: Basenpaare

Konnten nur Allele eines Gens amplifiziert werden, ging die Probe nicht in die Analysen zur MOI als Ziel- und Einflussgröße mit ein.

2.2.3 Untersuchung auf Rückstände von Chloroquin und Pyrimethamin

Die Bestimmung der Konzentration von Chloroquin und Pyrimethamin im Blut erfolgte mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) [85] am Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Niederlande. Die Nachweisgrenze für Chloroquin lag bei 10 ng/ml, die für Pyrimethamin bei 25 ng/ml.

2.3 Definition Einfluss- und Zielgrößen

2.3.1 Studiengruppen

Die *Behandlungsgruppe* umschließt die Probanden, die zum Zeitpunkt der Interventionen IPTi-1, -2 und -3 Sulfadoxin-Pyrimethamin verabreicht bekamen, die *Placebogruppe* die, die jeweils ein Placebo erhielten.

2.3.2 Infektion

Eine *mikroskopische Infektion* ist definiert als eine *P. falciparum* Infektion, die, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, mittels Dickem Tropfen unter dem Mikroskop diagnostiziert wurde.

Eine *submikroskopische Infektion* ist definiert als eine *P. falciparum* Infektion, die nicht mikroskopisch, sondern nur, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, mittels PCR festgestellt werden konnte.

2.3.3 Multiplizität der Infektion

Der Wert der MOI gibt die Mindestzahl bestimmbarer Plasmodien-Genotypen zu einer bestimmten Zeit im Wirt wieder [8, 41] (s. 2.2.2.3). Die MOI ist ein verhältnisskaliertes Merkmal und wird in ganzen Zahlen angegeben: $\mathbb{N} = \{1, 2, \dots\}$.

MOI = 1 ist als *monoklonale*, MOI > 1 als *polyklonale Infektion* definiert.

2.3.4 Malaria

Eine *asymptomatische Parasitämie* ist definiert als eine asexuelle *P. falciparum* Parasitämie ohne klinische Symptome, insbesondere ohne Fieber.

Malaria ist definiert als eine asexuelle *P. falciparum* Parasitämie, einhergehend mit Fieber mit tympanischen Temperaturen $\geq 38,2$ °C (Afigya Sekyere) bzw. axillären Temperaturen $\geq 37,5$ °C (Tamale) oder mit spontan berichtetem Fieber in den vergangenen 48 h. *Schwere Malaria* wurde gemäß der WHO Kriterien definiert [18].

2.3.5 Anämie

Anämie (schwerer Ausprägung) ist definiert als ein Hb < 7 g/dl (Tamale) bzw. als ein Hb < 7,5 g/dl (Afigya Sekyere).

2.4 Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen wurden mit den Programmen Excel 12.0 (Microsoft, USA), SPSS 15.0 (SPSS Inc., USA), Stata 9.0 Software Program (StataCorp LP, USA) und R-GUI (Freie Software, www.r-project.org) durchgeführt.

2.4.1 Kenndaten der Studiengruppen

Für die Untersuchung der Assoziation nominaler Merkmale wurde jeweils zunächst die Nullhypothese H_0 (kein Zusammenhang) aufgestellt, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$. Anschließend wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Traf in Folge H_0 nicht zu ($P < 0,05$), wurde die Alternativhypothese H_A formuliert und ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen beschrieben.

Um die Assoziation metrischer Merkmale zu untersuchen, wurde wiederum jeweils zunächst die H_0 aufgestellt (bei $P < 0,05$) und diese mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests geprüft. Lag $P < 0,05$, wurde ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen angenommen (H_A).

Für die Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen metrischen Merkmalen wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient r_s berechnet. Dabei lautete für H_0 (kein Zusammenhang) $r_s = 0$ bei einem möglichen Wertebereich von $-1 \leq r_s \leq +1$. Traf in Folge die Nullhypothese nicht zu, wurde H_A formuliert, wobei bei einem Wert von $+1$ ein vollständig positiver bzw. bei einem Wert von -1 ein vollständig negativer linearer Zusammenhang angenommen wurde. Eine Alternativhypothese wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ mittels t-Test geprüft.

2.4.2 Einflussgrößen auf die Polyklonalität einer Infektion

Um das Ausmaß und die Richtung der Assoziation zwischen verschiedenen unabhängigen Variablen nominaler Art (bspw. Studienort, Intervention) und jeweils der abhängige binären Zielgröße (polyklonale Infektion) zu bestimmen, wurde das Chancenverhältnis, die Odds Ratio (OR) ermittelt und dazu das 95% Konfidenzintervall (KI 95%) berechnet. Dabei wurde die Nullhypothese H_0 (kein Zusammenhang) mit $OR = 1$ festgelegt. Umschloss das KI 95% die 1, wurde die Alternativhypothese H_A formuliert, wobei bei einem Wert von > 1 eine positive bzw. bei einem Wert von < 1 eine negative Assoziation angenommen wurde.

Weiter wurden die möglicherweise miteinander zusammenhängenden Einflussgrößen (bspw. „aktuelle Malaria“) in ihrer Auswirkung auf die Zielgröße mittels logistischem Regressionsmodell in multivariater Analyse nochmals getrennt voneinander untersucht und jeweils die adjustierte Odds Ratio (aOR) ermittelt und dazu das 95% Konfidenzintervall (KI 95%) berechnet.

2.4.3 Einfluss des Infektionsstatus auf das prospektive, malariabedingte Morbiditätsrisiko

Um das Ausmaß und die Richtung der Assoziation zwischen den unabhängigen Variablen nominaler Art (Infektionsstatus: nicht/ mono-/ polyklonal infiziert) und den jeweiligen, abhängigen binären Zielgrößen (asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria, Anämie) zu bestimmen, wurden über die errechneten Inzidenzdichten (ID) die Inzidenzdichten Ratio (IDR) ermittelt und dazu das 95% Konfidenzintervall (KI 95%) be-

stimmt. Dabei lautete die Nullhypothese H_0 (kein Zusammenhang) $IDR = 1$. Umschloss das KI 95% die 1, wurde die Alternativhypothese H_A formuliert, wobei bei einem Wert von > 1 eine positive bzw. bei einem Wert von < 1 eine negative Assoziation angenommen wurde.

Die IDR wurden jeweils mittels negativer Binomialregression berechnet, um die multiplen Messungen bei gleichen Kindern und den eventuellen Einfluss einer *P. falciparum*-Infektion auf die nächste Infektion zu berücksichtigen.

Die Inzidenzdichten (ID) von Parasitämien, Malaria, schwerer Malaria und Anämien wurden jeweils berechnet als die Anzahl aller während der Beobachtungszeit aufgetretenen Fälle, dividiert durch die Summe der Risikozeiten aller Probanden. Die Risikozeit eines Probanden begann für die hier vorgenommenen Analysen im 15. Lebensmonat mit IPTi-3 und endete mit dem vollendeten 24. Lebensmonat bzw. mit dem Studienabbruch oder Tod. Die Risikozeit wurde in Jahren angegeben, als Person-Years-at-Risk (PYAR). Ein diagnostizierter Fall von Parasitämie, Malaria, schwerer Malaria oder Anämie wurden jeweils als Episode gewertet: Probanden wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen als außerhalb der Risikozeit für den jeweiligen Parameter betrachtet, um eine Mehrfachzählung von Fällen gleicher Ursache zu vermeiden

Die Querschnittuntersuchung zur Analyse der Einflussgrößen auf die MOI im 15. Lebensmonat erfolgte gemäß einer Per-Protocol-Analyse, so dass die Berechnungen nur für die Kinder durchgeführt wurden, die zu IPTi-3 erschienen waren. Die Längsschnittuntersuchung zur Analyse der Beziehung zwischen der MOI und dem prospektiven Risiko nachfolgender Malaria- und Anämieepisodes (15. bis 24. Lebensmonat) wurde im Sinne einer Intention-to-Treat-Analyse ausgeführt, d.h. dass die Kalkulationen mit der Anzahl aller zu IPTi-3 anwesenden Kinder erfolgte, unabhängig ihrem anschließenden Teilnahmeverhalten an der Studie. Wurde ein Kind zu einer Nachuntersuchung nicht vorstellig, so wurde es als gesund gewertet, erschien es an zwei aufeinander folgenden Terminen nicht, wurde es aus der Wertung genommen.

3 Ergebnisse

3.1 Studiengruppen

Im Verlauf des Jahres 2003 wurden in Tamale 1200 drei Monate alte Säuglinge rekrutiert, in Afigya Sekyere 1070. Die Querschnittuntersuchung ein Jahr später erfolgte in Tamale für 1086 der Kinder, in Afigya Sekyere für 964. Die Längsschnittuntersuchung mit einer Datenerhebung bis zum zweiten Geburtstag wurde in Tamale für 1047 der Probanden durchgeführt, in Afigya Sekyere für 887. Basisdaten zum Zeitpunkt der Rekrutierung und Querschnitterhebung werden im Folgenden jeweils für die beiden Kohorten getrennt und im Vergleich dargestellt, ebenso wie das jeweilige Teilnahmeverhalten.

3.1.1 Basisdaten zum Zeitpunkt der Rekrutierung und Teilnahmeverhalten

3.1.1.1 Tamale

Behandlungsgruppe und Placebogruppe der Kohorte Tamale glichen sich zum Zeitpunkt der Rekrutierung in Umfang und bezüglich sämtlicher Kenndaten: Wie Tabelle 11 zeigt, gab es außer einem höheren Hb-Wert in der Placebogruppe ($P = 0,009$) zwischen den Studiengruppen keine weiteren signifikanten Unterschiede hinsichtlich demographischer, anthropometrischer und klinischer Parameter.

Ebenso glichen sich Behandlungs- und Placebogruppe in ihrem Teilnahmeverhalten im Verlauf der Studie: Wie Abbildung 2 zeigt, gab es auch zum Zeitpunkt von IPTi-2 und IPTi-3 keine signifikanten Altersunterschiede, weiterhin war der Anteil beständiger Studienteilnehmer zwischen den Studiengruppen jeweils ausgeglichen (IPTi-1: $P = 1$; IPTi-2: $P = 0,881$; IPTi-3: $P = 1$; 24. Lebensmonat: $P = 0,874$). Insgesamt konnten 90,5% der Probanden zum Zeitpunkt von IPTi-3 auf die MOI hin untersucht werden und 87,3% nahmen bis ans Ende der Studie teil.

Tabelle 11: Basisdaten Kohorte Tamale zum Zeitpunkt der Rekrutierung im 3. Lebensmonat

Parameter		Placebo-Gruppe (n = 600)	SP-Gruppe (n = 600)
Demographische u. anthropometrische Parameter	weibliches Geschlecht, %, (n)	50,0 (300)	49,5 (297)
	Ethnische Gruppe, Dagomba, %, (n)	96,5 (597)	94,8 (569)
	Größe Haushalt		
	- Personen, $\bar{x} \pm SD$	12,2 \pm 7,5	12,6 \pm 9,1
	Alter		
	- Monate, $\bar{x} \pm SD$	2,36 \pm 0,48	2,33 \pm 0,48
	Gewicht		
	- kg, $\bar{x} \pm SD$	5,60 \pm 0,93	5,58 \pm 0,87
	Gewicht- Alter Relation		
	- Z-Wert, $\bar{x} \pm SD$	-0,29 \pm 1,28	-0,32 \pm 1,23
	Gewicht- Größe Relation		
	- Z-Wert, $\bar{x} \pm SD$	-0,73 \pm 1,92	-0,83 \pm 1,90
	Größe- Alter Relation		
	- Z-Wert, $\bar{x} \pm SD$	-0,08 \pm 1,80	-0,04 \pm 1,72
Oberarmumfang			
- cm, $\bar{x} \pm SD$	14,12 \pm 1,35	14,10 \pm 1,39	
Klinische Parameter	<i>P. falciparum</i> Parasitämie, %, (n)	3,8 (23)	1,8 (11)
	Parasitendichte, n Parasiten/ μ l, \bar{x}_{geom}	7556	7096
	Fieber ^a , %, (n)	4,8 (26)	4,4 (24)
	Fieberanamnese ^b (\leq 48h), %, (n)	17,2 (103)	17,4 (104)
	Hb, g/dl, $\bar{x} \pm SD$	10,15 \pm 1,12	10,32 \pm 1,12*

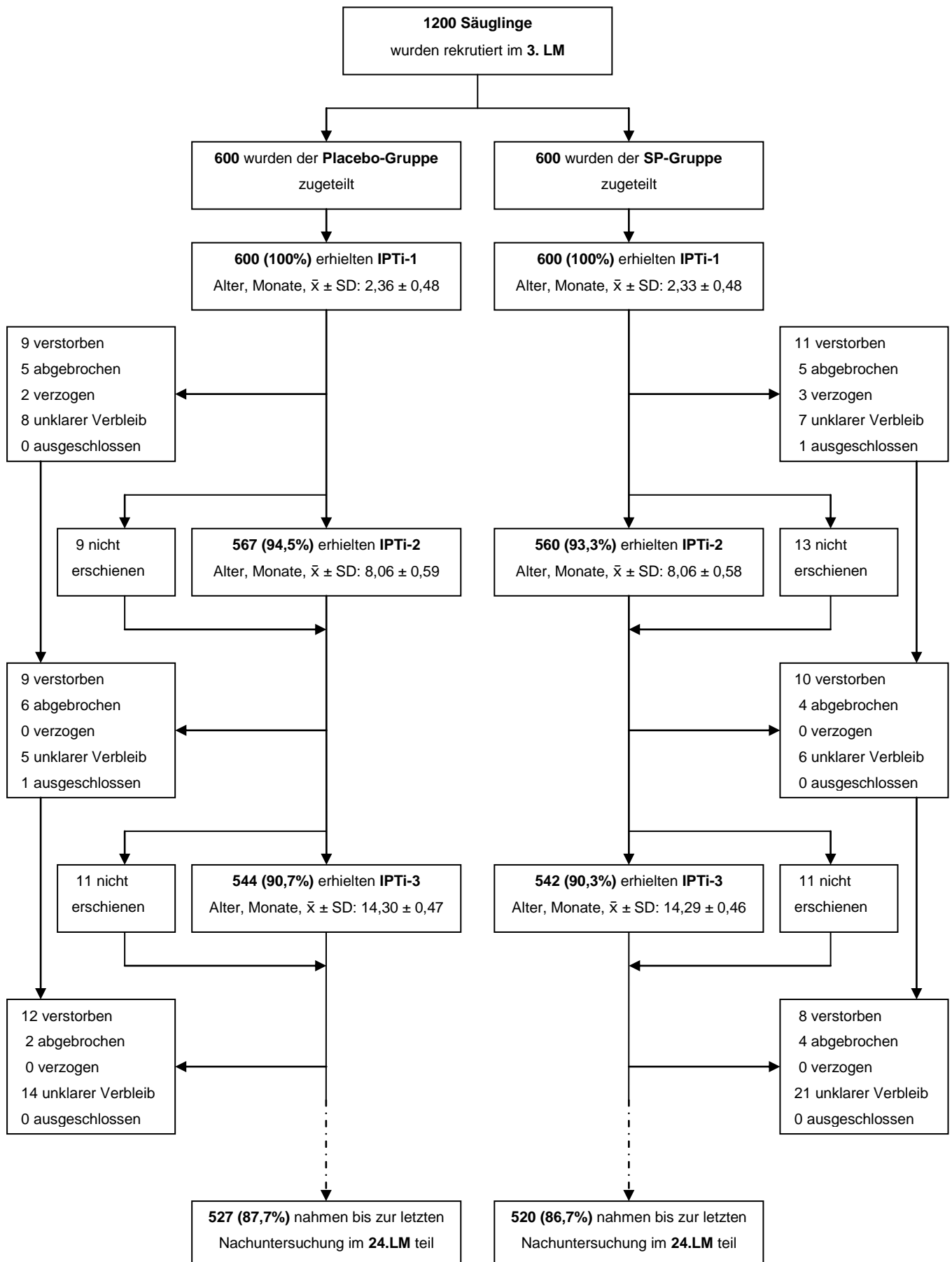
*: P < 0,05;

^a: axilläre Temperaturen \geq 37,5 °C; ^b: spontan berichtetes Fieber in den vergangenen 48 h;

SD: Standardabweichung; \bar{x}_{geom} : delogarithmiertes arithmetisches Mittel \bar{x} der logarithmischen Einzelwerte;

Z-Werte (= [Messwert - Mittelwert der Referenzgruppe]/SD) wurden auf der Grundlage der *World Health Organization Global Database on Child Growth and Malnutrition* berechnet;

Abbildung 2: Studienverlauf Tamale, Placebo- vs. Behandlungs(SP)- Gruppe



3.1.1.2 Afigya Sekyere

Behandlungsgruppe und Placebogruppe der Kohorte Afigya Sekyere entsprachen sich zum Zeitpunkt der Rekrutierung in Umfang und hinsichtlich sämtlicher Kenndaten: Wie Tabelle 12 zeigt, gab es keine signifikanten Unterschiede bei den demographischen, anthropometrischen und klinischen Parametern.

Auch im Verlauf der Studie glichen sich Behandlungs- und Placebogruppe in ihrem Teilnahmeverhalten: Wie Abbildung 3 zeigt, gab es zwischen den Studiengruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bezüglich des Anteils beständiger Studienteilnehmer (IPTi-1: $P = 1$; IPTi-2: $P = 0,858$; IPTi-3: $P = 0,870$; 24. Lebensmonat: $P = 0,823$). Insgesamt konnten 90,0% der Probanden zum Zeitpunkt von IPTi-3 auf die MOI hin untersucht werden und 82,9% nahmen bis ans Ende der Studie teil.

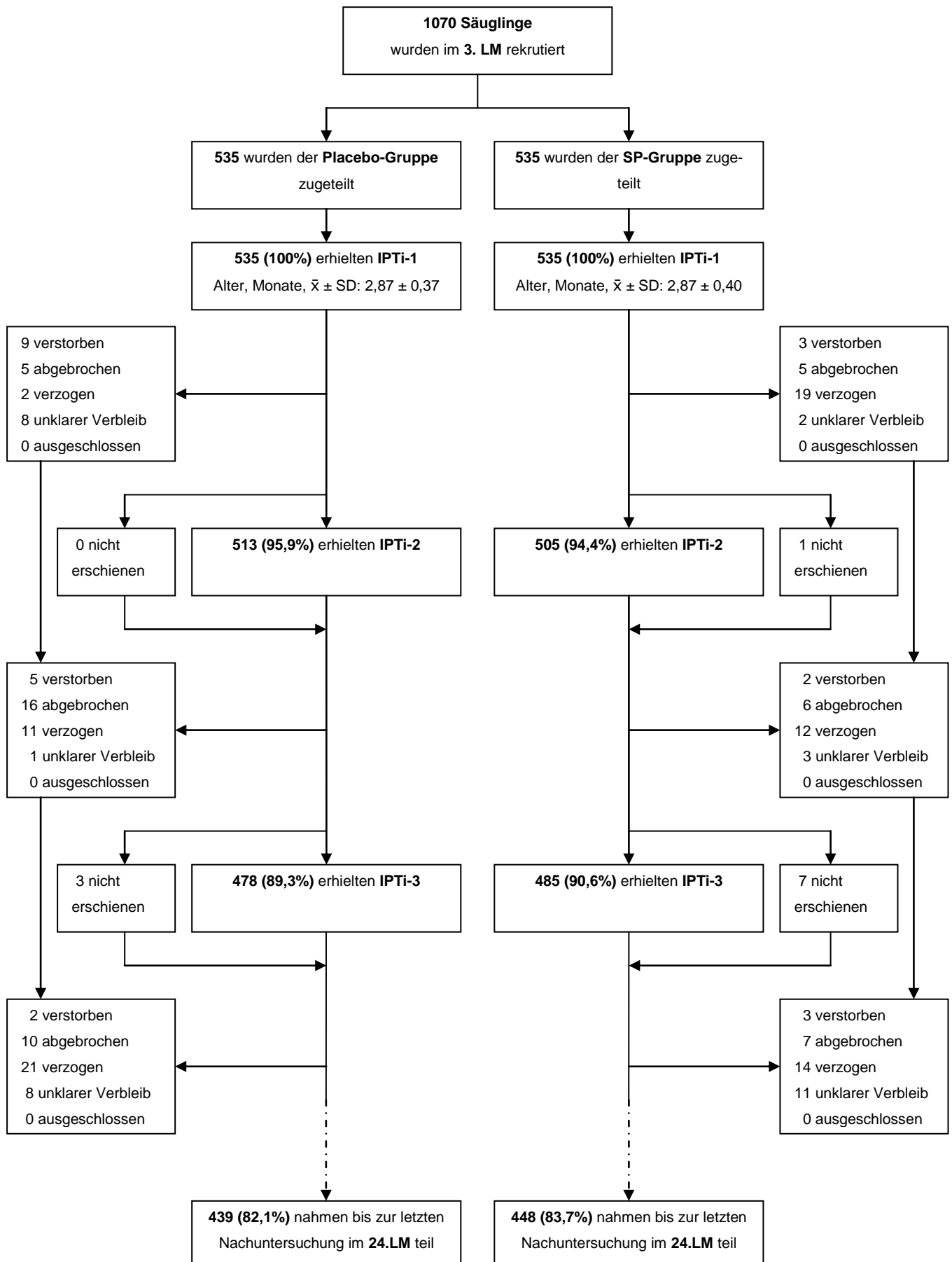
Tabelle 12: Basisdaten Kohorte Afigya Sekyere zum Zeitpunkt der Rekrutierung im 3. Lebensmonat

Parameter		Placebo-Gruppe (n = 535)	SP-Gruppe (n = 535)
Demographische u. anthropometrische Parameter	weibliches Geschlecht, %, (n)	50,8 (272)	49,3 (264)
	Alter bei IPTi-1		
	- Monate, ($\bar{x} \pm SD$)	2,87 \pm 0,37	2,87 \pm 0,40
	Größe-Alter Relation bei IPTi-1		
	- Z-Wert, ($\bar{x} \pm SD$)	0,31 \pm 1,1	0,43 \pm 1,2
Klinische Parameter	<i>P. falciparum</i> Parasitämie, %, (n)	13,5 (72)	16,1 (86)
	Malaria, %, (n)	1,9 (10)	1,5 (8)
	Hb, g/dl, ($\bar{x} \pm SD$)	10,3 \pm 1,3	10,4 \pm 1,4

SD: Standardabweichung;

Z-Werte (= [Messwert - Mittelwert der Referenzgruppe]/SD) wurden auf der Grundlage der *World Health Organization Global Database on Child Growth and Malnutrition* berechnet;

Abbildung 3: Studienverlauf Afigya Sekyere, Placebo- vs. Behandlungs(SP)- Gruppe



3.1.1.3 Die Kohorten im Vergleich

Beim Vergleich der beiden Kohorten zum Zeitpunkt der Rekrutierung, dargestellt in Tabelle 13, ergab sich, dass die Kinder in Tamale im Durchschnitt signifikant jünger waren als die in Afigya Sekyere ($P < 0,001$). Außerdem lag die Prävalenz mikroskopischer *P. falciparum* Parasitämien mit 14,8% in Afigya Sekyere in etwa um das siebenfache über der in Tamale ($P < 0,001$).

Tabelle 13: Basisdaten Kohorten Tamale und Afigya Sekyere zum Zeitpunkt der Rekrutierung im 3. Lebensmonat

	Parameter	Tamale (n = 1200)	Afigya Sekyere (n = 1070)
	Placebo-Gruppe, % (n)	50,0 (600)	50,0 (535)
Demographische u. anthropometrische Parameter	weibliches Geschlecht, % (n)	49,8 (597)	49,9 (534)
	Alter		
	- Monate, ($\bar{x} \pm SD$)	2,35 \pm 0,48	2,87 \pm 0,39*
	Größe-Alter Relation		
	- Z-Wert, ($\bar{x} \pm SD$)	-0,06 \pm 1,76	0,37 \pm 1,2
Klinische Parameter	mikrosk. <i>P. falciparum</i> Parasitämie, %, (n)	2,8 (34)	14,8 (158)*
	Malaria, %, (n)	1,8 (22)	1,7 (18)
	Fieber, %, (n)	4,2 (50)	(keine Angaben)
	Hb, g/dl, ($\bar{x} \pm SD$)	10,2 \pm 1,12	10,4 \pm 1,4

*: $P < 0,05$;

mikrosk.: mikroskopisch; **SD:** Standardabweichung;

Z-Werte (= [Messwert - Mittelwert der Referenzgruppe]/SD) wurden auf der Grundlage der *World Health Organization Global Database on Child Growth and Malnutrition* berechnet;

Im Verlauf der Studie glichen sich die Kohorten Tamale und Afigya Sekyere in ihrem Teilnahmeverhalten. Es ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich des Anteils beständiger Studienteilnehmer. In beiden Kohorten erhielten 100% der Studienteilnehmer IPTi-1, IPTi-2 wurde in Tamale bei 93,9% und in Afigya Sekyere bei 95,1% der Probanden durchgeführt ($P = 0,830$). Im 15. Lebensmonat erhielten in Tamale 90,5% IPTi-3 und wurden zugleich auf die MOI hin untersucht, in Afigya Sekyere waren es 90,0% ($P = 0,794$). In Tamale nahmen 87,3% der Probanden bis

ans Ende der Studie teil, in Afigya Sekyere waren es 82,9% ($P = 0,410$), so dass sich insgesamt der Anteil beständiger Studienteilnehmer auf 85,2% belief.

3.1.2 Basisdaten zum Zeitpunkt der Untersuchung der MOI im 15. Lebensmonat

In Tabelle 14 ist der Vergleich der Kenndaten beider Kohorten im 15. Lebensmonat, zum Zeitpunkt der Untersuchung der MOI, dargestellt: Der Anteil der jeweiligen Studiengruppen (SP/ Placebo) war gleichverteilt ($P = 0,873$), trotz einer im Verlauf der Studien jeweils reduzierten Teilnehmerzahl. Der Zeitpunkt von IPTi-3 bzw. der Erhebung der MOI fiel in Tamale ca. anderthalbmal so häufig wie in Afigya Sekyere in die Regenzeit (jeweils Mai bis Oktober) ($P = 0,001$).

Bezüglich der klinischen Daten ergaben sich Unterschiede auf zumeist signifikantem Niveau. Die Kohorte aus Afigya Sekyere wies in etwa doppelt so häufig Fälle mikroskopischer Parasitämien auf ($P < 0,001$) und eine ca. anderthalbfache Anzahl an Malariafällen ($P = 0,007$), jedoch weniger Fälle milder ($Hb < 11$ g/dl) und schwerer Anämie (Tamale: $Hb < 7$ g/dl, Afigya Sekyere: $< 7,5$ g/dl) ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,009$), bei einem deutlich höheren Hämoglobinwert ($P < 0,001$). Dagegen waren bei der Kohorte Tamale die Parasitendichten grenzwertig erhöht ($P = 0,05$), und Fieber trat dort in etwa doppelt so häufig auf ($P < 0,001$).

Retrospektiv hatten die Probanden in Afigya Sekyere mit einem Anteil von 66% etwa doppelt so häufig eine asymptomatische Parasitämie erlitten ($P < 0,001$), als auch signifikant häufiger eine Malaria ($P = 0,014$). Im Mittel erlitt dort ein Kind 1,2 Malariaepisoden zwischen dem dritten und 15. Lebensmonat, in Tamale hingegen waren es nur $\bar{x} = 0,7$ Episoden.

Wie Abbildung 4 veranschaulicht, war unter den im 15. Lebensmonat mit *P. falciparum* infizierten Kindern (submikroskopische und mikroskopische Fälle) der Anteil der Placebogruppe (Tamale: 51,1%, Afigya Sekyere: 49,0%) und der SP-Gruppe (Tamale: 48,9%, Afigya Sekyere: 51,0%) jeweils ausgeglichen und es ergaben sich bei der Verteilung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten ($P = 0,651$).

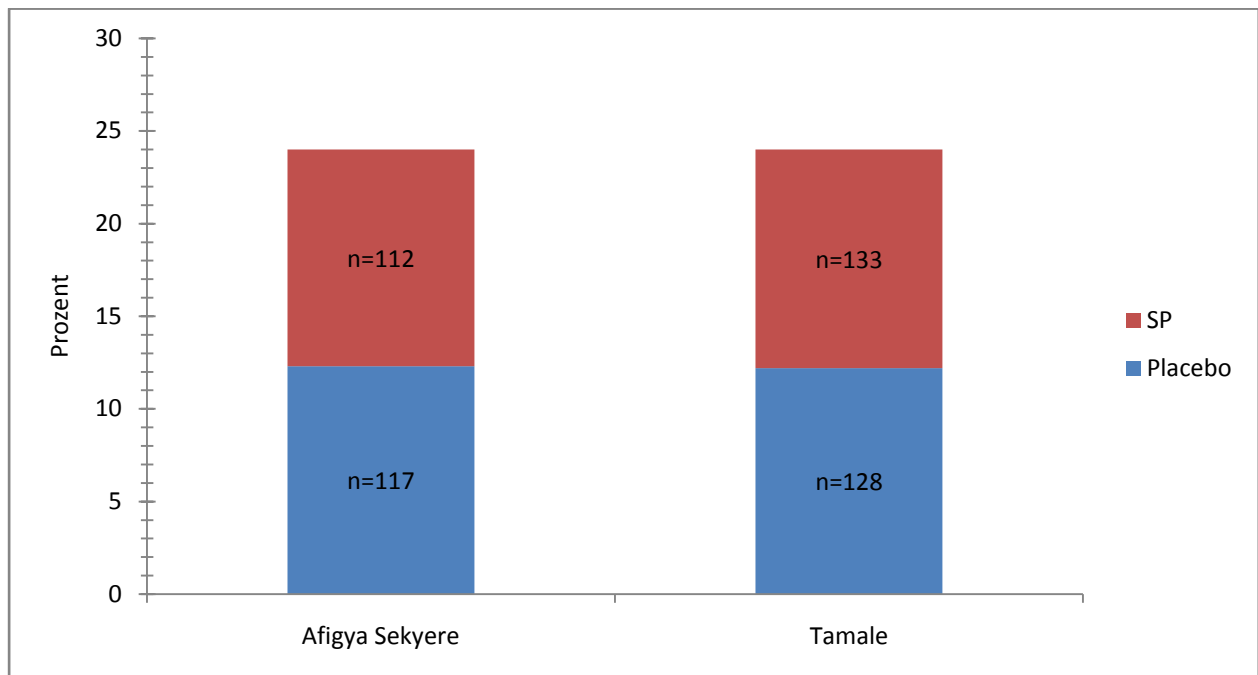
Tabelle 14: Basisdaten Kohorten Tamale und Afigya Sekyere im 15. Lebensmonat

	Parameter	Tamale (n = 1086)	Afigya Sekyere (n = 953)
	Placebo-Gruppe, % (n)	50,1 (544)	50,2 (478)
	weibliches Geschlecht, % (n)	50,2 (545)	49,3 (470)
	IPTi-3/Datenerhebung z. Regenzeit, % (n)	77,9 (935)	47,9 (512)*
Klinische Daten 15. Lebensmonat	<i>P. falciparum</i> Parasitämie, % (n)		
	- mikroskopisch	11,0 (119)	24,0 (229)*
	- submikroskopisch	13,1 (142)	-
	- gesamt	24,0 (261)	24,9% (117)
	Parasitendichte, Parasit./ μ l, \bar{x}_{geom} (95%KI)	2312 (1599-3344)	1455 (1105-1917)
	Malaria, % (n)	7,4 (80)	11,1 (106)*
	Fieber ^a , % (n)	12,8 (139)	6,1 (58)*
	Fieberanamnese ^b (≤ 48 h), % (n)	31,7 (344)	31,8 (303)
	Hämoglobin, g/dl, $\bar{x} \pm SD$	8,9 \pm 1,4	9,9 \pm 1,6*
	Anämie (Hb < 11 g/dl), % (n)	94,0 (1020)	74,4 (709) *
	Anämie (Hb < 7 bzw. 7,5 g/dl), % (n)	8,0 (87)	4,9 (47)*
Klinische Daten retrospektiv, 3.- 15. Lebens- monat	Anteil Probanden mit vorangeg. Episoden		
	- asymptomatische Parasitämie, % (n)	34,0 (369)	66,0 (629)*
	- Malaria, % (n)	50,1 (544)	60,1 (573)*
	Anzahl vorangeg. Episoden pro Proband		
	- asymptom. Parasitämie, \bar{x} (Bereich)	0,4 (0-4)	1,4 (0-9)*
	- Malaria, \bar{x} (Bereich)	0,7 (0-5)	1,2 (0-8)*

*: P < 0,05;

^a: tympanische Temperaturen $\geq 38,2$ °C (Afigya Sekyere) bzw. axillären Temperaturen $\geq 37,5$ °C (Tamale);^b: spontan berichtetes Fieber in den vergangenen 48 h;**SD**: Standardabweichung; **KI**: Konfidenzintervall; \bar{x}_{geom} : delogarithmiertes arithmetisches Mittel \bar{x} der logarithmischen Einzelwerte;

Abbildung 4: Anteil der im 15. Lebensmonat *P. falciparum* Infizierten in Abhängigkeit der Studiengruppe



Für die Abbildung wurden sowohl mikroskopisch als auch submikroskopisch *P. falciparum* positive Proben beachtet.

3.2 Multiplizität der Infektion

3.2.1 Erfolgsquoten bei der Bestimmung der MOI

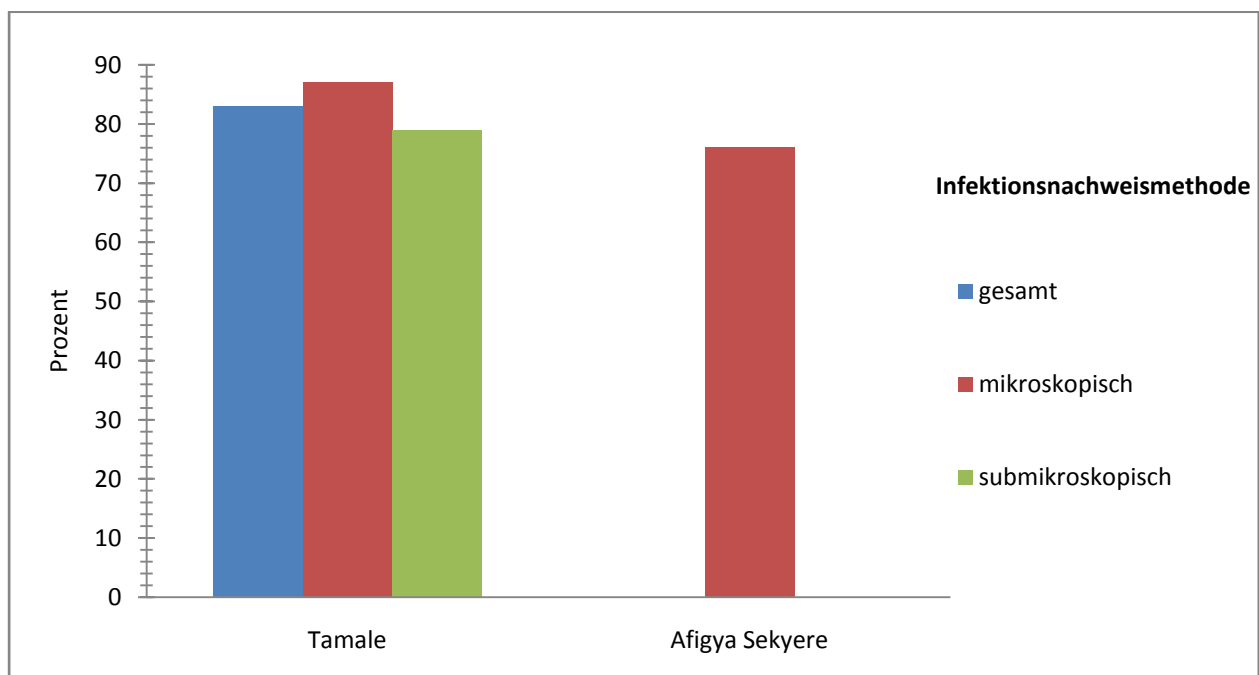
Die Bestimmung der MOI für *P. falciparum* positive Proben erwies sich auch nach aufwendigen Versuchen (wiederholte Genotypisierungsversuche bei Variation der PCR-Reaktionsansätze) als schwierig, von insgesamt 659 zu untersuchenden Proben konnte die MOI bei 526 (Erfolgsquote 80%) ermittelt werden.

Aufgrund logistischer Probleme lagen für die stichprobenhafte Analyse der MOI zum Zeitpunkt der Rekrutierung im dritten Lebensmonat aus Tamale nur 19 von 34 positiv getesteten Proben vor. Von diesen konnte für 15 die MOI bestimmt werden (79%).

Bei der Untersuchung der MOI der Kohorte Tamale im ersten Lebensjahr ergab sich für die 50 *P. falciparum* positiven Stichproben je Untersuchungszeitpunkt, dass im sechsten Lebensmonat bei 40 von 50 (80%) mikroskopisch positiven Proben die MOI ermittelt werden konnte, für den neunten Lebensmonat betrug die Quote 44/50 (88%), für den zwölften 38/50 (76%). Die beschriebenen Unterschiede der Erfolgsquoten waren im Vergleich nicht signifikant (P jeweils > 0,05).

Bei der Untersuchung der MOI beider Kohorten im 15. Lebensmonat für alle *P. falciparum* positiven Proben konnte für die Kohorte Afigya Sekyere von 229 mikroskopisch positiven Proben bei 173 die MOI bestimmt werden (76%). Bei der Kohorte Tamale lagen 119 mikroskopisch positive Proben vor, wovon sich bei 104 die MOI bestimmen ließ (87%). Von den 142 submikroskopisch positiven Proben konnte bei 112 die MOI bestimmt werden (79%). Der Unterschied zwischen dem Anteil erfolgreicher Bestimmungen für die mikroskopisch und submikroskopisch positiven Proben war nicht signifikant ($P = 0,10$). Wie Abbildung 5 illustriert, war dagegen aber der Anteil erfolgreicher Bestimmungen für die Kohorte Afigya Sekyere im Vergleich zu dem der Kohorte Tamale signifikant niedriger, sowohl unter alleiniger Betrachtung der mikroskopisch positiven Proben ($P = 0,009$) als auch aller Proben ($P = 0,049$).

Abbildung 5: Erfolgsquoten (%) bei der Bestimmung der MOI im 15. Lebensmonat in Abhängigkeit des Studienortes

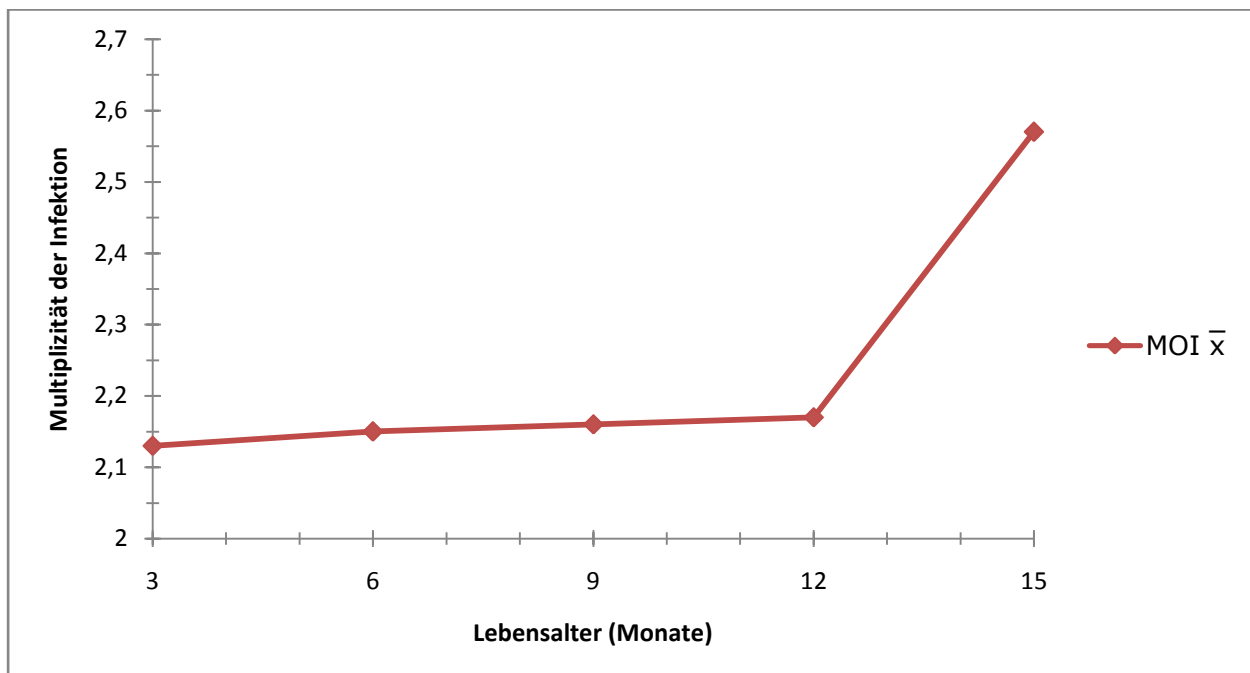


3.2.2 Altersverlauf der MOI in Tamale: Dritter bis 15. Lebensmonat

Die Untersuchung der MOI in Tamale für 19 mikroskopisch *P. falciparum* positive Stichproben aus dem dritten und für je 50 aus dem sechsten, neunten und zwölften Lebensmonat sowie für alle 104 mikroskopisch positiven Proben im 15. Lebensmonat zeigt, dass die MOI im ersten Lebensjahr bei einem Mittelwert \bar{x} von 2,13 – 2,17 relativ kons-

tant lag und erst zu Beginn des zweiten Lebensjahres auf $\bar{x} = 2,57$ anstieg ($p = 0,10$) (siehe Abbildung 6). Der Vergleich der beiden Studiengruppen ergab, dass IPTi zu keinem der Zeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die MOI hatte ($P > 0,5$).

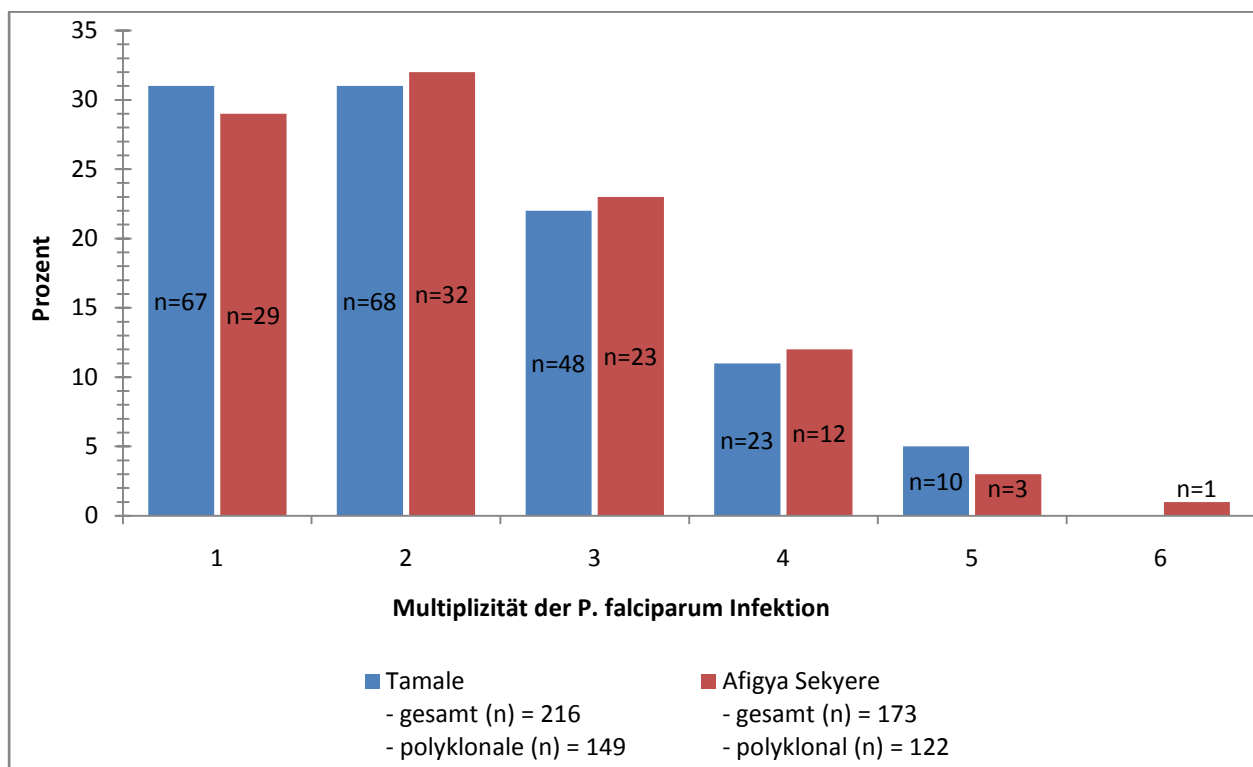
Abbildung 6: Verlauf der Multiplizität der Infektion in Tamale vom dritten bis zum 15. Lebensmonat



3.2.3 MOI im 15. Lebensmonat

Bei der Bestimmung der MOI aller *P. falciparum* positiver Proben im 15. Lebensmonat ergaben sich für die Kohorte Tamale MOI-Werte zwischen 1 und 5 und für die Kohorte Afigya Sekyere zwischen 1 und 6. Abbildung 7 bietet eine Übersicht über die unterschiedlichen MOI-Werte der Proben und gibt deren absolute und relative Häufigkeit in den beiden Kohorten an.

Abbildung 7: Anzahl (n) und Prävalenz von MOI-Werten in Tamale und Afigya Sekyere, 15. Lebensmonat



3.3 Einflussgrößen auf die Multiplizität der Infektion

3.3.1 Studienort

Die Unterschiede zwischen den Kohorten hinsichtlich des MOI-Mittelwertes und des Anteils polyklonaler Infektionen fasst Tabelle 15 zusammen und verdeutlicht, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Studienort und den MOI-Werten bestand.

Tabelle 15: Vergleich von MOI-Mittelwert und Anteil polyklonaler Infektionen zwischen den Studienorten unter Berücksichtigung der Infektionsnachweismethode, 15. Lebensmonat

	MOI $\bar{x} \pm SD$		P	Polyklonale Infektionen (%)		P
	Tamale	Afigya Sekyere		Tamale	Afigya Sekyere	
mikroskopisch	2,57 ± 1,21	2,30 ± 1,15	0,07	78,8	70,5	0,555
gesamt	2,28 ± 1,65		0,89	69,0		0,890

SD: Standardabweichung

gesamt fasst mikroskopisch und submikroskopisch detektierte *P. falciparum* Proben zusammen

3.3.2 Infektionsnachweismethode

Die Differenzen zwischen den Infektionsnachweismethoden bezüglich des MOI-Mittelwertes und des Anteils polyklonaler Infektionen fasst Tabelle 16 nochmals zusammen und verdeutlicht, dass MOI \bar{x} mikroskopischer Proben jeweils signifikant über dem submikroskopischer Proben mit $\bar{x} = 2,02$ lag.

Tabelle 16: Vergleich von MOI-Mittelwert und Anteil polyklonaler Infektionen zwischen den Infektionsnachweismethoden unter Berücksichtigung des Studienorts, 15. Lebensmonat

	MOI $\bar{x} \pm SD$		P	Polyklonale Infektionen (%)		P
	mikroskop.	submikroskop.		mikroskop.	submikroskop.	
gesamt	2,40 \pm 1,17	2,02 \pm 1,08	0,003	52,4	59,8	0,247
Tamale	2,57 \pm 1,21		0,0006	78,8		0,196
Afigya Sekyere	2,30 \pm 1,15		0,041	70,5		0,194

SD: Standardabweichung

gesamt fasst die Proben aus Tamale und Afigya Sekyere zusammen

3.3.3 IPTi

Der in Tabelle 17 aufgeführte Vergleich der beiden Studiengruppen (Placebo/ SP) hinsichtlich der MOI im 15. Lebensmonat ergab, dass IPTi-1 und -2 weder einen Einfluss auf den mittleren MOI-Wert, noch auf den Anteil polyklonaler Infektionen hatten, auch unter Berücksichtigung der Studienorte und der Infektionsnachweismethoden. Der mittlere MOI-Wert war in der Placebo-Gruppe nur tendenziell erhöht, der Anteil polklonaler Infektionen war in beiden Studiengruppen annähernd gleich.

Tabelle 17: Vergleich von MOI-Mittelwert und Anteil polyklonaler Infektionen zwischen den Studiengruppen unter Berücksichtigung von Studienort und Infektionsnachweismethode, 15. Lebensmonat

	MOI $\bar{x} \pm SD$		P	Polyklonale Infektionen (%)		P
	Placebo	SP		Placebo	SP	
beide Kohorten						
- gesamt	2,33 \pm 1,18	2,25 \pm 1,14	0,55	69,7	69,6	0,99
- mikroskopisch	2,38 \pm 1,17	2,42 \pm 1,17	0,78	62,5	57,1	0,56
Tamale						
- gesamt	2,35 \pm 1,23	2,22 \pm 1,11	0,48	68,2	69,8	0,80
- mikroskopisch	2,50 \pm 1,24	2,64 \pm 1,73	0,59	74,1	84,0	0,22
- submikroskopisch	2,20 \pm 1,25	1,84 \pm 1,01	0,17	62,5	57,1	0,56
Afigya Sekyere						
- mikroskopisch	2,31 \pm 1,15	2,29 \pm 1,16	0,92	71,6	69,4	0,75

SD: Standardabweichung

gesamt fasst mikroskopisch und submikroskopisch detektierte *P. falciparum* Proben zusammen

3.3.4 Chloroquin und SP

Pyrimethamin konnte bei einer Nachweisgrenze von 25 ng/ml bei keiner der 202 verfügbaren Proben nachgewiesen werden, Chloroquin bei einer Nachweisgrenze von 10 ng/ml bei 59 Proben (29%), wobei der Median der Konzentration bei $\tilde{x} = 65$ ng/ml (Bereich: 10 - > 800 ng/ml) lag. Wie Tabelle 18 zeigt, war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Chloroquinrückständen und dem Mittelwert der MOI oder dem Anteil polyklonaler Infektionen festzustellen.

Tabelle 18: Vergleich von MOI-Mittelwert und Anteil polyklonaler Infektionen zwischen Proben mit und ohne Chloroquinrückstände, Tamale, 15. Lebensmonat

MOI (\bar{x})		P	Polyklonale Infektionen (%)		P
Chloroquin pos.	Chloroquin neg.		Chloroquin pos.	Chloroquin neg.	
2,17	2,24	0,90	70,7	67,4	0,65

Chloroquin positive Proben (n) = 59

Chloroquin negative Proben (n) = 143;

3.3.5 Parasitendichte

Parasitendichte (\log_{10}) und MOI mikroskopischer Proben korrelierten an beiden Studienorten positiv miteinander. Allerdings war der Zusammenhang nur in Afigya Sekyere auf signifikantem Niveau bei einem Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (r_s) von 0,175 ($P = 0,02$). In Tamale lag r_s bei 0,016 ($P = 0,87$).

3.3.6 Anämie

Für den Zusammenhang von Hb-Konzentration und MOI ergab sich eine negative Korrelation $r_s = -0,126$ auf signifikantem Niveau ($P = 0,01$).

Die Anämieprävalenz unter den Kindern mit polyklonaler Infektion war signifikant höher als die unter den monoklonal infizierten (RR: 1,07; $P = 0,01$). Dieser Zusammenhang bestätigte sich auch bei der Ermittlung der Odds Ratio, adjustiert für Studienort, Intervention, Parasitämie und Malaria (aOR: 2,92; 95%KI: 1,2 - 7,1; $P = 0,02$).

3.4 Einflussgrößen auf die Polyklonalität einer Infektionen

Nach den oben beschriebenen und in den Tabellen 15 bis 17 dargestellten Analysen des Zusammenhangs zwischen polyklonalen Infektionen und den Faktoren Intervention und Studienort wurde für diese und weitere mögliche Einflussfaktoren zusätzlich das Ausmaß und die Richtung der Assoziation mittels der Odds Ratio (OR) bestimmt. Die Untersuchung erfolgte sowohl in uni- als auch in multivariater Analyse und wurde für alle mikroskopisch polyklonalen Infektionen unter Beachtung der Faktoren Intervention, Studienort, Parasitendichte, aktuelle Malariaepisode und vorangegangene Malariaepisode durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Auch bei multivariater Analyse zeigte sich, dass die Interventionen IPTi-1 und -2 keinen Effekt auf die MOI bzw. den Anteil polyklonaler Infektionen hatten. Ebenso wenig ergab sich ein Zusammenhang des Parameters Studienort hinsichtlich polyklonaler Infektionen.

Bezüglich des Einflusses klinischer Parameter auf die MOI ergab sich bei univariater Analyse ein positiver Zusammenhang zwischen polyklonalen Infektionen und der Parasitendichte (\log_{10}) sowie zwischen polyklonalen Infektionen und einer aktuellen Malariaepisode. Ohne Signifikanz blieb in univariater Analyse der Zusammenhang zwischen polyklonalen Infektionen und vorangegangenen Malariaepisoden: Der Anteil polyklonaler Infektionen war bei Kindern mit vorangegangenen Malariaepisoden gegenüber Kindern mit blander Infektionsgeschichte nur grenzwertig erniedrigt.

Bei multivariater Analyse blieb hinsichtlich des Einflusses klinischer Parameter auf den Anteil polyklonaler Infektionen nur der Zusammenhang zu aktueller Malaria bestehen: Kinder mit einer aktuellen Malariaepisode wiesen signifikant häufiger polyklonale Infektionen auf als asymptomatische Kinder.

Tabelle 19: Einflussgrößen auf den Anteil mikroskopisch polyklonaler Infektionen im 15. Lebensmonat

	n	Polyklonale Infektion (%)	Univariate Analyse		Multivariate Analyse*	
			OR (95 KI%)	P	aOR (95 KI%)	P
nicht klinische Größen						
Intervention (IPTi-1,-2)						
- Placebo	142	72,5	1		1	
- SP	135	74,8	1,12 (0,64 - 1,99)	0,67	0,93 (0,52 - 1,64)	0,79
Studienort						
- Tamale	104	78,8	1		1	
- Afigya Sekyere	173	70,5	0,64 (0,35 - 1,18)	0,13	0,53 (0,28 - 1,03)	0,06
klinische Größen						
Parasitendichte (/µl)						
- log ₁₀	277	n. z.	1,48 (1,08 – 2,03)	0,01	1,38 (0,99 - 1,94)	0,06
aktuelle Malaria						
- nein	114	64,0	1		1	
- ja	163	80,4	2,30 (1,29 - 4,11)	0,002	2,35 (1,27 - 4,32)	0,006
vorangeg. Malaria						
- nein	72	81,9	1		1	
- ja	205	70,7 ^a	0,53 (0,26 – 1,09)	0,06	0,51 (0,25 - 1,05) ^b	0,07

* adjustiert für: Intervention, Studienort, aktuelle Malaria, vorangegangene Malaria, Parasitendichte;

OR: Odds Ratio; aOR: adjustierte Odds Ratio; KI: Konfidenzintervall;

n. z.: nicht zutreffend; vorangeg.: vorangegangene

^{a, b}: Anteil polyklonaler Infektionen in Abhängigkeit des Zeitraums seit der letzten Malariaepisode und jeweiliges Ausmaß und Richtung der Assoziation:

< 8 Wochen (n = 65), 76,9%, aOR(95%KI): 0,73 (0,30 - 1,78)

8 - 16 Wochen (n = 62), 72,6%, aOR(95%KI): 0,72 (0,29 - 1,76)

>16 Wochen (n = 78), 64,1%, aOR(95%KI): 0,32 (0,14 – 0,73)

3.5 Einfluss des Infektionsstatus im 15. Lebensmonat auf das prospektive, malariabedingte Morbiditätsrisiko

Mittels Regressionsanalyse wurde die Beziehung des Infektionsstatus (infiziert/ nicht infiziert) im 15. Lebensmonat hinsichtlich des prospektiven Risikos untersucht, in den folgenden neun Monaten eine asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria oder Anämie zu erleiden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 20 bis 22 dargestellt.

In einem weiteren Schritt wurde der Zusammenhang zwischen der Multiplizität einer *P. falciparum* Infektion (mono-/ polyklonal) im 15. Lebensmonat und der genannten, prospektiven Morbiditätsrisiken untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 23 und 24 sowie in Abbildung 8 dargestellt.

Die Analysen erfolgten für die Studienorte jeweils getrennt.

3.5.1 Risikovergleich in Abhängigkeit des Infektionsstatus: Infizierte versus nicht infizierte Kinder

Der Vergleich der Gruppen der infizierten mit denen der nicht infizierten Kinder hinsichtlich der Inzidenzdichten für asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria und Anämie ist in Tabelle 20 dargestellt.

Im 15. Lebensmonat mit *P. falciparum* infizierte Kinder erlitten an beiden Studienorten in den folgenden neun Monaten signifikant häufiger sowohl eine asymptomatische Infektion als auch eine Malaria.

Beim Vergleich der Gruppen stellte sich zudem heraus, dass in Afigya Sekyere infizierte Kinder einem signifikant höheren prospektiven Risiko ausgesetzt waren, eine schwere Malaria (dreifach erhöhte Inzidenz) und eine Anämie (zweifach erhöhte Inzidenz) zu erleiden. Diese Effekte wurden für die Kohorte aus Tamale nicht beobachtet.

Tabelle 20: Vergleich der prospektiven Inzidenzdichten (15.- 24. Lebensmonat) zwischen den im 15. Lebensmonat nicht infizierten und infizierten Kindern

ZIELGRÖßE	nicht Infizierte			Infizierte			IDR (95% KI)	P
	Fälle	PYAR	ID	Fälle	PYAR	ID		
Asymp. Parasitämie								
- Tamale	370	586,1	0,63	177	180,7	0,98	1,56 (1,3 - 1,9)	< 0,0001
- Afigya Sekyere	695	482,9	1,44	339	141,6	2,39	1,70 (1,4 - 2,0)	< 0,0001
Malaria								
- Tamale	842	558,9	1,51	373	169,4	2,20	1,48 (1,3 - 1,7)	< 0,0001
- Afigya Sekyere	698	509,3	1,37	371	149,8	2,48	1,87 (1,6 - 2,3)	< 0,0001
Schwere Malaria								
- Tamale	26	605,9	0,04	15	190,0	0,08	1,85 (0,9 - 3,6)	0,07
- Afigya Sekyere	13	548,9	0,02	14	170,4	0,08	3,47 (1,6 - 7,4)	0,001
Anämie*								
- Tamale	335	585,9	0,57	124	183,4	0,68	1,19 (0,9 - 1,5)	0,18
- Afigya Sekyere	190	538,6	0,35	108	165,0	0,65	1,93 (1,4 - 2,6)	< 0,0001

IDR: Inzidenzdichten Ratio; KI: Konfidenzintervall; PYAR: Person-Years-at-Risk; ID: Inzidenzdichte; **asymp.**: asymptomatisch;

* Tamale Hb < 7g/dl, Afigya Sekyere < 7,5 g/dl;

Gruppenbelegung Tamale: nicht Infizierte (n) = 825, Infizierte (n) = 261;

Gruppenbelegung Afigya Sekyere: nicht Infizierte (n) = 735, Infizierte (n) = 229

3.5.1.1 Risikovergleich infizierte versus nicht infizierte Kinder unter Beachtung von IPTi

Die Analyse der Beziehungen des Infektionsstatus (infiziert/ nicht infiziert) hinsichtlich genannter, prospektiver Morbiditätsrisiken wurde zusätzlich differenziert nach den zwei Studiengruppen (SP/ Placebo) durchgeführt, dargestellt in Tabelle 21.

Dabei blieb an beiden Studienorten unabhängig der Studiengruppe der Effekt bestehen, dass infizierte Kinder signifikant häufiger sowohl eine asymptomatische Infektion als auch eine Malaria erlitten.

Hinsichtlich der Zielgröße schwere Malaria ergab sich, dass in Afigya Sekyere innerhalb der SP-Gruppe infizierte Kinder einem signifikant höheren prospektiven Erkrankungsrisiko ausgesetzt waren. Dieser Effekt bestand nicht innerhalb der Placebo-Gruppe. Für die Kohorte Tamale blieb unabhängig der Studiengruppe der Effekt bestehen, dass infi-

zierte Kinder keinem erhöhten prospektiven Risiko für schwere Malaria ausgesetzt waren.

Bezüglich der Zielgröße Anämie ergab sich, dass in Afigya Sekyere innerhalb der SP-Gruppe infizierte Kinder einem signifikant höheren prospektiven Erkrankungsrisiko ausgesetzt waren. Dieser Effekt bestand nicht innerhalb der Placebo-Gruppe. Konträr verhielt es sich für die Kohorte Tamale: Hier waren innerhalb der Placebo-Gruppe infizierte Kinder einem signifikant höheren prospektiven Risiko ausgesetzt, an Anämie zu erkranken, während dieser Effekt innerhalb der SP-Gruppe nicht bestand.

Tabelle 21: Vergleich der prospektiven Inzidenzdichten (15.- 24. Lebensmonat) zwischen den im 15. Lebensmonat nicht infizierten und infizierten Kindern unter Beachtung von IPTi

ZIELGRÖßE	Placebo			SP		
	ID		IDR (95% KI)	ID		IDR (95%)
	nicht	Infiziert		nicht	infiziert	
Asymp. Parasitämie						
- Tamale	0,68	1,10	1,62 (1,23 - 2,13)[†]	0,58	0,87	1,51 (1,09 - 2,08)[‡]
- Afigya Sekyere	1,41	2,47	1,84 (1,42 - 2,37)[*]	1,47	2,31	1,58 (1,23 - 2,03)[*]
Malaria						
- Tamale	1,55	2,39	1,55 (1,25 - 1,93)[*]	1,46	2,03	1,40 (1,12 - 1,76)[†]
- Afigya Sekyere	1,50	2,12	1,45 (1,11 - 1,90)[†]	1,25	2,87	2,39 (1,86 - 3,07)[*]
Schwere Malaria						
- Tamale	0,03	0,06	2,22 (0,73 - 6,79)	0,06	0,09	1,62 (0,71 - 3,73)
- Afigya Sekyere	0,03	0,07	2,65 (0,89 - 7,87)	0,02	0,10	4,47 (1,55 - 12,88)[‡]
Anämie^a						
- Tamale	0,57	0,82	1,46 (1,05 - 2,04)[‡]	0,58	0,54	0,94 (0,64 - 1,39)
- Afigya Sekyere	0,38	0,49	1,35 (0,87 - 2,07)	0,33	0,83	2,67 (1,73 - 4,12)[‡]

*: P < 0,0005; †: P < 0,005; ‡: P < 0,05;

ID: Inzidenzdichte; IDR: Inzidenzdichten Ratio; KI: Konfidenzintervall; **asympt.**: asymptomatisch infiziert;

^a: Tamale Hb < 7 g/dl, Afigya Sekyere < 7,5 g/dl;

Gruppenbelegung Placebo Tamale: nicht Infizierte (n) = 417, Infizierte (n) = 127;

Gruppenbelegung Placebo Afigya Sekyere: nicht Infizierte (n) = 361, Infizierte (n) = 117;

Gruppenbelegung SP Tamale: nicht Infizierte (n) = 408, Infizierte (n) = 134;

Gruppenbelegung SP Afigya Sekyere: nicht Infizierte (n) = 373, Infizierte (n) = 112;

3.5.1.2 Risikovergleich infizierte versus nicht infizierte Kinder unter Beachtung des Symptomatikstatus

Die Analyse der Beziehung des Infektionsstatus (infiziert/ nicht infiziert) hinsichtlich genannter, prospektiver Morbiditätsrisiken wurde zusätzlich differenziert nach dem sich im 15. Lebensmonat darbietenden Symptomatikstatus (asymptomatisch/ symptomatisch) durchgeführt, dargestellt in Tabelle 22.

Dabei blieb für die Kohorte Afigya Sekyere unabhängig des Symptomatikstatus der Effekt bestehen, dass infizierte Kinder signifikant häufiger eine asymptomatische Parasitämie erlitten. Für die Kohorte Tamale hingegen ergab sich diesbezüglich nur für die symptomatisch infizierten Kinder ein erhöhtes prospektives Risiko.

Hinsichtlich des prospektiven Risikos für Malaria blieb an beiden Studienorten unabhängig des Symptomatikstatus der Effekt bestehen, dass infizierte Kinder signifikant häufiger erkrankten.

Bezüglich der Zielgröße schwere Malaria ergab sich, dass in Tamale nur symptomatisch infizierte Kinder einem höheren prospektiven Risiko ausgesetzt waren. Für die Kohorte in Afigya Sekyere blieb unabhängig des Symptomatikstatus der Effekt bestehen, dass infizierte Kinder signifikant häufiger an schwerer Malaria erkrankten.

Auf die Zielgröße Anämie hatte der Symptomatikstatus keinen Einfluss: Infizierte Kinder erkrankten in Afigya Sekyere generell signifikant häufiger an Anämie, nicht aber in Tamale.

Tabelle 22: Vergleich der prospektiven Inzidenzdichten (15.- 24. Lebensmonat) zwischen den im 15. Lebensmonat nicht infizierten und infizierten Kindern unter Beachtung des Symptomatikstatus

ZIELGRÖßE	Asymptomatisch			Symptomatisch		
	ID		IDR (95% KI)	ID		IDR (95%)
	nicht	infiziert		nicht	infiziert	
Asymp. Parasitämie						
- Tamale	0,63	0,78	1,24 (0,93 - 1,64)	0,63	1,23	1,40 (1,22 - 1,61)*
- Afigya Sekyere	1,44	2,60	1,83 (1,47 - 2,27)*	1,44	2,16	1,25 (1,10 - 1,43)†
Malaria						
- Tamale	1,51	2,14	1,42 (1,17 - 1,74)†	1,51	2,28	1,24 (1,11 - 1,39)*
- Afigya Sekyere	1,37	2,28	1,69 (1,33 - 2,16)*	1,37	2,71	1,44 (1,27 - 1,63)†
Schwere Malaria						
- Tamale	0,04	0,06	1,35 (0,54 - 3,37)	0,04	0,10	1,56 (1,04 - 2,35)‡
- Afigya Sekyere	0,02	0,07	2,80 (1,06 - 7,35)‡	0,02	0,10	2,06 (1,32 - 3,20)†
Anämie^a						
- Tamale	0,57	0,67	1,18 (0,85 - 1,64)	0,57	0,69	1,10 (0,92 - 1,30)
- Afigya Sekyere	0,35	0,69	2,07 (1,40 - 3,06)*	0,02	0,10	2,06 (1,32 - 3,20)†

*: $P < 0,0005$; †: $P < 0,005$; ‡: $P < 0,05$;

ID: Inzidenzdichte; IDR: Inzidenzdichten Ratio; KI: Konfidenzintervall; asymp.: asymptomatisch infiziert;

^a: Tamale Hb < 7 g/dl, Afigya Sekyere < 7,5 g/dl;

Gruppenbelegung asymptomatische Tamale: nicht Infizierte (n) = 825, Infizierte (n) = 142;

Gruppenbelegung asymptomatische Afigya Sekyere: nicht Infizierte (n) = 735, Infizierte (n) = 122;

Gruppenbelegung symptomatische Tamale: nicht Infizierte (n) = 825, Infizierte (n) = 119;

Gruppenbelegung symptomatische Afigya Sekyere: nicht Infizierte (n) = 735, Infizierte (n) = 107;

3.5.2 Risikovergleich in Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion

Im Folgenden wird dargestellt, welche Beziehung zwischen dem Ausmaß der Multiplizität einer *P. falciparum* Infektion (mono-/ polyklonal) im 15. Lebensmonat und dem prospektiven Risiko bestand, in den folgenden neun Monaten eine asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria oder Anämie zu erleiden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 23 und 24 sowie in Abbildung 8 dargestellt.

3.5.2.1 Risikovergleich monoklonal infizierte versus nicht infizierte Kinder

Der Vergleich zwischen den Gruppen der monoklonal infizierten und der der nicht infizierten Kinder hinsichtlich der Inzidenzdichten für asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria und Anämie ist in Tabelle 23 dargestellt.

Kinder mit monoklonalen Infektionen wiesen im Vergleich zu nicht infizierten Kindern an beiden Studienorten erhöhte Inzidenzen für asymptomatische Parasitämien und Malaria auf.

In Tamale war bei monoklonal infizierten Kindern zudem die Inzidenz schwerer Malaria um das dreifache erhöht. Diese Beobachtung ließ sich für die Kohorte Afigya Sekyere nicht wiederholen, da in der Gruppe der monoklonal Infizierten ($n = 51$) keine Fälle schwerer Malaria beobachtet wurden.

Hinsichtlich der Zielgröße Anämie bestand an beiden Studienorten kein Effekt.

3.5.2.2 Risikovergleich polyklonal infizierte versus nicht infizierte Kinder

Der Vergleich zwischen den Gruppen der polyklonal infizierten und der der nicht infizierten Kinder hinsichtlich der Inzidenzdichten für asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria und Anämie ist in Tabelle 23 dargestellt.

Kinder mit polyklonalen Infektionen wiesen im Vergleich zu nicht infizierten Kindern an beiden Studienorten erhöhte Inzidenzen für asymptomatischen Parasitämien und Malaria auf.

In Afigya Sekyere war bei polyklonal infizierten Kindern zudem die Inzidenz für schwerer Malaria und für Anämie signifikant erhöht. Dieser Effekt bestand nicht für die Kohorte Tamale.

3.5.2.3 Risikovergleich monoklonal infizierte versus polyklonal infizierte Kinder

Der Vergleich zwischen den Gruppen der monoklonal infizierten und der der polyklonal infizierten Kinder hinsichtlich der Inzidenzdichten für asymptomatische Parasitämie, Malaria, schwere Malaria und Anämie ist in Tabelle 23 dargestellt.

Hinsichtlich des prospektiven Risikos für eine asymptomatische Parasitämie unterschieden sich an beiden Studienorten monoklonal infizierte Kinder nicht von polyklonal infizierten Kindern.

Bezüglich des Erkrankungsrisikos ergaben sich aber deutliche Differenzen zwischen den zwei Gruppen der Infizierten, allerdings erwiesen sich die Effekte für die beiden Studienorte als konträr: Während in Tamale polyklonal infizierte Kinder im Vergleich zu

monoklonal infizierten signifikant seltener an Malaria erkrankten (Protektive Effektivität 33%) und tendenziell seltener an schwerer Malaria und Anämie, verhielt es sich in Afigya Sekyere entgegengesetzt. Eine polyklonale Infektion erhöhte dort signifikant das prospektive Risiko für Malaria um 77% und steigerte tendenziell die Wahrscheinlichkeit, zukünftig eine Anämie zu erleiden. Risikovergleiche für schwere Malaria konnten für die Kohorte Afigya Sekyere nicht angestellt werden, da in der Gruppe der monoklonal Infizierten (n = 51) keine Fälle schwerer Malaria beobachtet wurden.

Tabelle 23: Vergleich der prospektiven Inzidenzdichten (15.- 24. Lebensmonat) zwischen den im 15. Lebensmonat nicht, mono- und polyklonal infizierten Kindern

ZIELGRÖßE	ID nach Infektionsstaus			Risikovergleiche IDR (95% KI)		
	nicht	mono.	poly.	mono./ nicht	poly./ nicht	poly./ mono.
Asymp. Parasitämie						
- Tamale	0,63	1,03	1,06	1,63 (1,1 - 2,3)[‡]	1,30 (1,1 - 1,5)[*]	1,04 (0,7 - 1,6)
- Afigya Sekyere	1,44	2,52	2,74	1,77 (1,3 - 2,5)[†]	1,41 (1,3 - 1,6)[*]	1,11 (0,8-1,6)
Malaria						
- Tamale	1,51	2,85	1,92	1,92 (1,5 - 2,5)[*]	1,13 (1,0 - 1,3)[‡]	0,67 (0,5 - 0,9)[†]
- Afigya Sekyere	1,37	1,98	3,40	1,45 (1,0 - 2,1)[*]	1,60 (1,4 - 1,8)[*]	1,77 (1,3 - 2,5)[†]
Schwere Malaria						
- Tamale	0,04	0,14	0,06	3,41 (1,3 - 8,7)[‡]	1,13 (0,7 - 1,8)	0,38 (0,1 - 1,2)
- Afigya Sekyere	0,02	0	0,12	-	2,28 (1,5 - 3,4)[*]	-
Anämie^a						
- Tamale	0,57	0,76	0,66	1,36 (0,9 - 2,1)	1,08 (0,9 - 1,3)	0,85 (0,5 - 1,4)
- Afigya Sekyere	0,35	0,57	0,80	1,63 (0,9 - 2,9)	1,54 (1,3 - 1,9)[*]	1,46 (0,8 - 2,7)

*: P < 0,0005; †: P < 0,005; ‡: P < 0,05;

ID: Inzidenzdichte; IDR: Inzidenzdichten Ratio; KI: Konfidenzintervall;

mono.: monoklonal infiziert; poly.: polyklonal infiziert; asymp.: asymptomatisch infiziert

^a: Tamale Hb < 7 g/dl, Afigya Sekyere < 7,5 g/dl;

-: Risikovgl. konnten nicht angestellt werden, da in der Gruppe der monoklonal Infizierten keine Fälle schwerer Malaria auftraten;

Gruppenbelegung Tamale: nicht Infizierte (n) = 825, monoklonal (n) = 67, polyklonal (n) = 149;

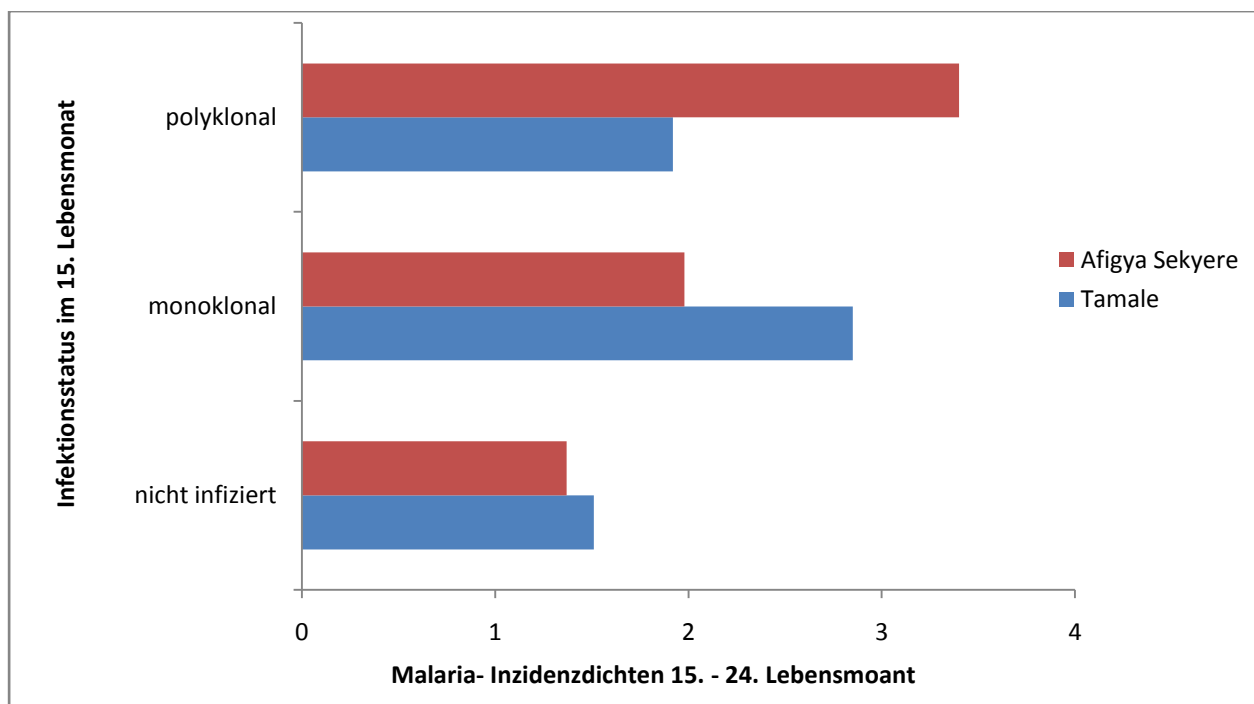
Gruppenbelegung Afigya Sekyere: nicht Infizierte (n) = 735, monoklonal (n) = 51, polyklonal (n) = 122;

Abbildung 8 verdeutlicht die in Abhängigkeit des Infektionsstaus im 15. Lebensmonat unterschiedlichen, prospektiven Malaria- Inzidenzdichten und illustriert die Differenzen zwischen den beiden Kohorten.

An beiden Studienorten gingen Infektionen im 15. Lebensmonat mit einem erhöhten Risiko einher, in den folgenden Monaten an Malaria zu erkranken.

Für die Gruppe der infizierten Kinder aber ergaben sich zwischen den Studienorten konträre Effekte: Während in Afigya Sekyere monoklonale Infektionen mit einer geringeren Inzidenzdichte für Malaria einhergingen, waren es in Tamale die polyklonalen Infektionen.

Abbildung 8: Malaria-Inzidenzdichten 15. - 24. Lebensmonat in Abhängigkeit des Infektionsstatus im 15. Lebensmonat



Die Inzidenzdichte wurde berechnet als die Anzahl aller während der Beobachtungszeit aufgetretenen Fälle von Malariaepisoden, dividiert durch die Summe der Risikozeiten (in Jahre) aller Probanden (vgl. 2.4.3).

3.5.2.4 Risikovergleich monoklonal infizierte versus polyklonal infizierte Kinder unter Beachtung des Symptomatikstatus

Die Analyse der Beziehung der MOI hinsichtlich der genannten prospektiven Morbiditätsrisiken (vgl. 3.5.2.3) wurde zusätzlich differenziert nach dem sich im 15. Lebensmonat darbietenden Symptomatikstatus (asymptomatisch/ symptomatisch) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 dargestellt.

Dabei blieb an beiden Studienorten unabhängig des Symptomatikstatus der Effekt bestehen, dass die MOI keinen Einfluss auf das prospektive Risiko für asymptomatische Parasitämien, schwere Malaria und Anämie hatte.

Hinsichtlich der Zielgröße Malaria aber zeichnete sich ein Einfluss des Symptomatikstatus auf das prospektive Risiko ab: Bei asymptomatisch infizierten Kindern blieb der Effekt polyklonaler Infektionen bestehen und verstärkte sich, wonach in Tamale eine polyklonale Infektion das Krankheitsrisiko minderte, in Afigya Sekyere aber erhöhte. Bei symptomatisch infizierten Kindern blieben diesbezüglich die Tendenzen zwar bestehen, verloren aber an Signifikanz.

Tabelle 24: Vergleich der prospektiven Inzidenzdichten (15.- 24. Lebensmonat) zwischen den im 15. Lebensmonat monoklonal und polyklonal infizierten Kindern unter Beachtung des Symptomatikstatus

ZIELGRÖÙE	Asymptomatisch			Symptomatisch		
	ID		IDR (95% KI)	ID		IDR (95% KI)
	mono.	poly.		mono.	poly.	
Asymp. Parasitämie						
- Tamale	0,97	0,76	0,78 (0,47 - 1,29)	1,14	1,32	1,17 (0,62 - 2,21)
- Afigya Sekyere	2,79	3,16	1,16 (0,77 - 1,73)	2,13	2,44	1,15 (0,60 - 2,17)
Malaria						
- Tamale	2,76	1,79	0,65 (0,47 - 0,89)[‡]	3,03	2,03	0,67 (0,41 - 1,07)
- Afigya Sekyere	1,89	3,55	1,90 (1,17 - 3,08)*	2,10	3,29	1,62 (0,98 - 2,71)
Schwere Malaria						
- Tamale	0,09	0,06	0,68 (0,14 - 3,37)	0,26	0,05	0,19 (0,04 - 1,02)
- Afigya Sekyere	0,00	0,10	-	0,00	0,14	-
Anämie^a						
- Tamale	0,81	0,61	0,73 (0,36 - 1,47)	0,65	0,70	1,07 (0,46 - 2,50)
- Afigya Sekyere	0,60	1,08	2,00 (0,81 - 4,94)	0,51	0,60	1,16 (0,52 - 2,60)

*: $P < 0,0005$; †: $P < 0,005$; ‡: $P < 0,05$;

ID: Inzidenzdichte; IDR: Inzidenzdichten Ratio; KI: Konfidenzintervall;

mono.: monoklonal infiziert; poly.: polyklonal infiziert; asymp.: asymptomatisch infiziert

^a: Tamale Hb < 7 g/dl, Afigya Sekyere < 7,5 g/dl;

-: Risikovgl. konnten nicht angestellt werden, da in der Gruppe der monoklonal Infizierten keine Fälle schwerer Malaria auftraten;

Gruppenbelegung asymptomatische Tamale: monoklonal Infizierte (n) = 45, polyklonal Infizierte (n) = 67;

Gruppenbelegung asymptomatische Afigya Sekyere: monoklonal Infizierte (n) = 30, polyklonal Infizierte (n) = 52;

Gruppenbelegung symptomatische Tamale: monoklonal Infizierte (n) = 22, polyklonal Infizierte (n) = 82;

Gruppenbelegung symptomatische Afigya Sekyere: monoklonal Infizierte (n) = 21, polyklonal Infizierte (n) = 70;

4 Diskussion

Im Folgenden wird erörtert, welchen Einfluss das neuartige Präventionskonzept, die intermittierende präventive Behandlung von Säuglingen (IPTi) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP), auf die Multiplizität der Infektion (MOI) mit *P. falciparum* beim Kleinkind hat. Außerdem wird diskutiert, in welchem Zusammenhang die MOI in diesem Alter mit dem prospektiven Risiko für malariabedingte Morbidität steht, und ob sie das Konzept der Prämunitio bereits erfüllt.

Der Ergebnisanalyse der zwei IPTi-Studien vorangestellt wird eine Methodendiskussion. Abschließend wird IPTi vor dem Hintergrund der hier gewonnenen Erkenntnisse bewertet.

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Studiendesign

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zur Auswirkung von IPTi auf die MOI basieren auf zwei placebokontrollierten, randomisierten und doppelblinden Kohortenstudien. Diese Studienform gilt als Goldstandard in der medizinisch-epidemiologischen Forschung und erlaubt die Prüfung von Hypothesen bei einem höchstmöglichen Maß an Objektivität.

Der Stichprobenumfang von jeweils über 1000 Säuglingen pro Studie erlaubte beim Vergleich von Behandlungs- und Placebogruppe statistisch sichere Aussagen zu fällen, auch unter Beachtung der im Rahmen dieser Studien zu verzeichnenden Stichprobenverluste [64].

Die Form der Kohortenstudie ging mit einem hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand einher, erlaubte aber sichere Aussagen zu Inzidenzen und ermöglichte zudem, Umfang und Präzision der Datenerhebung gut zu steuern.

Die als für hochendemische Malariagebiete repräsentativ ausgewählten Studienorte, Tamale und Afigya Sekyere, zeichneten sich aus mehreren Gründen für die Durchführung der Studie als vorteilhaft aus: An beiden Studienorten ist die medizinische Infrastruktur im regionalen Vergleich befriedigend ausgeprägt. Außerdem ist das Impfprogramm EPI, entlang dessen IPTi stattfand, in der Bevölkerung weit akzeptiert, so dass eine hohe Compliance der Probanden garantiert war. Außerdem bestehen an beiden Orten langjährige Erfahrungen bei der Durchführung von medizinisch-epidemiologischen Studien mit internationaler Kooperation [76, 78, 79, 81, 86-90], so dass einerseits umfangreiche Kenntnisse über die demographischen, sozioökonomischen und epidemiologischen Faktoren vorlagen und andererseits bei der Durchführung auf bestehende Strukturen und Verbindungen zurückgegriffen werden konnte.

4.1.2 Diagnose einer *P. falciparum* Infektion und Bestimmung deren Multiplizität

4.1.2.1 Infektionsnachweismethode

Der Nachweis und die artspezifische Bestimmung einer Plasmodieninfektion erfolgten gemäß des Goldstandards der Malariadiagnostik mikroskopisch unmittelbar vor Ort durch qualifizierte Mikroskopisten. Gesichert wurde eine positive Diagnose und die Bestimmung der Plasmodienart durch eine im Anschluss an die Feldstudien im Labor des IfT Berlin durchgeführte, molekularbiologische Untersuchung mithilfe einer speziellen PCR und Gelelektrophorese (siehe 2.2.2). Für die Kohorte Tamale jedoch erfolgte die molekularbiologische Analyse zusätzlich für alle mikroskopisch negativen Proben zum Zeitpunkt IPTi-3, um mithilfe dieser sensitiveren, aber zeitlich und finanziell aufwendigeren Methode den Umfang der positiven Proben zu erhöhen. So konnten für die Kohorte Afigya Sekyere 229 mikroskopisch positive Infektionen ermittelt werden, für die Kohorte Tamale 119 sowie zusätzlich 142 submikroskopisch positive Proben.

Das Ergebnis lässt deutlich erkennen, dass die Untersuchung mittels PCR sensitiver als die mikroskopische ist, was auch zahlreiche Forschungsarbeiten zur Diagnostik von *P. falciparum* Infektionen bestätigen [84, 91-94]. Folglich wurde bei der späteren Analyse der Ergebnisse zur *P. falciparum* Prävalenz und zur Multiplizität der Infektion den zwei unterschiedlich sensitiven Verfahren Rechnung getragen.

Weiter ist zu beachten, dass die Sensitivität eines jeden Nachweisverfahrens in der Malariadiagnostik primär von der Plasmodiendichte der zu untersuchenden Proben abhängt [94]. Die Dichte aber unterliegt individuell zeitlichen Schwankungen, so dass es sich beim Diagnoseergebnis nur um eine Momentaufnahme handelt [95]. Vorherige Studien zeigten, dass aufgrund der Sequestration *P. falciparum* bei geringster Dichte nicht zu jedem Zeitpunkt im peripheren Blut nachzuweisen ist und für eine sicherere Diagnose mehrere Blutuntersuchungen in zwölf bis 24 stündigen Abständen über zwei bis drei Tage von Nöten sind [96]. Ungeachtet dessen eignen sich die ermittelten Ergebnisse zu Prävalenz und MOI zur weiteren wissenschaftlichen Analyse, da mögliche falsch negative Infektionsbefunde in den Untergruppen gleichverteilt sein sollten.

4.1.2.2 Bestimmung der MOI

Die Bestimmung der Multiplizität der *P. falciparum* Proben erfolgte im Anschluss an die Feldstudien in einem Durchlauf im Labor des IfT Berlin. Auf Grundlage des in zahlreichen Studien bewährten Protokolls nach Snounou et al. [84] wurden mittels PCR und

Gelelektrophorese die Allele der Gene *msp-1* und *msp-2* typisiert (siehe 2.2.2.3). Dabei konnte für insgesamt 20% der zuvor als positiv diagnostizierten Proben die MOI nicht bestimmt werden, weil - auch nach wiederholten Versuchen - entweder nur Allele eines Gens amplifiziert wurden (vgl. Definition 2.2.2.3.3), oder weil kein einziges Allel amplifikat erkennbar vorlag. Die Versagerquote schwankte mit der Zeit der Probengewinnung (dritter bis 15. Lebensmonat), mit der Infektionsnachweismethode (sub-/ mikroskopisch) und mit der Herkunft der Proben (Tamale/ Afigya Sekyere), zeigte sich dabei aber lediglich vom Studienort signifikant abhängig: Für Proben aus Afigya Sekyere lag die Erfolgsquote mit 76% signifikant unter der der Proben aus Tamale mit 87% (vgl. Abbildung 5).

Eine multizentrische Vergleichsstudie zur Genotypisierung von *P. falciparum* Infektionen mittels PCR führt Erfolgsquoten von 80% - 93% auf [91], eine andere Studie zur Methode der Bestimmung der MOI ergab, dass ein Drittel der Genotypisierungsversuche eine Positivrate von unter 91% hat [97]. Damit lag die Erfolgsquote der vorliegenden Arbeit im Durchschnitt, so dass die Ergebnisse repräsentativ und eine zuverlässige Grundlage für eine Analyse sind. Zu bedenken gibt jedoch, dass die Rate erfolgreich analysierter Proben aus Afigya Sekyere signifikant unter der der Proben aus Tamale lag. Eine Studie zur Genotypisierung von *P. falciparum* Infektionen weist daraufhin, dass die Sensitivität bei der Bestimmung der MOI von der Art der Behandlung und Aufbewahrung der Blutproben abhängt, unter anderem vom Puffer und den Lagerungstemperaturen [98]. Zwar schrieb das hier verwendete Studienprotokoll in Anlehnung an bewährte Protokolle [98] eine klare Behandlung der Blutproben nach der Entnahme vor, allerdings können Abweichungen davon nicht ausgeschlossen werden.

Folglich ist bei der späteren Diskussion der Ergebnisse zur Multiplizität der *P. falciparum* Infektionen den differenten Probequalitäten (aus Tamale vermutlich hochwertiger) Beachtung zu schenken.

4.1.2.3 Ermittlung Höhe der MOI

Auch die Höhe der ermittelten MOI unterliegt methodischen Einflussfaktoren. Vorherige Studien zur Bestimmung der MOI weisen auf Probleme der PCR als Genotypisierungstechnik hin. Da es zu einer Konkurrenz um die für die jeweiligen Allelfamilien spezifischen Primer kommt, werden in einer Probe Parasitenunterarten niedriger Dichte in Konkurrenz zu solchen hoher Dichte der gleichen Familie mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit amplifiziert [39, 53, 99]. Andere Studien diskutieren die Grenzen der Gel-

elektrophorese zur Auswertung der PCR-Amplifikate: Allelvarianten, die sich nur um wenige Basenpaare voneinander unterscheiden, können bei der optischen Auswertung als identisch verkannt werden, da die Beschaffenheit des Trägermaterials der Trennschärfe Grenzen setzt [41, 100]. Außerdem erlaubt es die Elektrophorese nicht, durch Punktmutationen neu entstandene Allelvarianten zu detektieren, da diese bei identischer Basenpaarlänge keine unterschiedlichen Laufzeit aufweisen [101].

Um den Einfluss des Trägermaterials möglichst gering zu halten und die Trennschärfe zu optimieren, wurde bei der vorliegenden Arbeit gezielt mit hochauflösendem Agarsegel und langen Elektrophoresezeiten von bis zu über zwei Stunden bei kontinuierlicher Kühlung gearbeitet. Zudem wurde bei der visuellen Auswertung unterstützend Software hinzugezogen.

4.1.3 Gruppierung der MOI-Ergebnisse

Für die statistischen Analysen der MOI wurde die Gruppe der *P. falciparum* positiv Detektierten lediglich in die der monoklonal (MOI = 1) und polyklonal (MOI > 1) Infizierten unterteilt, da eine weitere Ausdifferenzierung zu Gruppengrößen führt, die für valide statistische Rechnungen zu klein wären (vgl. Abbildung 7).

Möglicherweise hätte eine Unterteilung der Gruppe der im 15. Lebensmonat polyklonal Infizierten genauere Erkenntnisse über die Einflussgrößen auf die MOI zugelassen.

Außerdem hätte die exakte Bemessung der Klonalität für die Analyse der MOI als möglichem Indikator für das Ausmaß der sich entwickelnden Semimmunität aufschlussreich sein können. So unterschieden einige vorherige Studien zur Prämunität im Kindesalter zwischen den genauen Werten der MOI. Allerdings kamen sie alle zu dem Erkenntnis, dass sich bezüglich der prognostischen Aussagekraft der MOI letztlich nur signifikante Unterschiede zwischen mono- und polyklonalen Infektionen auftraten [36, 38, 52, 55].

Die bloße Kategorisierung in mono- und polyklonalen Infektionen begründet sich aber auch darin, dass nur dieser Unterschied mittels der hier angewandten PCR-Methode mit angrenzender Sicherheit ausgemacht werden kann. Das Ausmaß polyklonaler Infektionen hingegen bleibt relativ, da MOI als die minimale Anzahl an *P. falciparum* Genotypen pro Isolat definiert ist [37, 39-41] (vgl. 2.2.2.3.3).

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Einflussgrößen auf die Multiplizität der *P. falciparum* Infektion im 15. Lebensmonat

Im Folgenden soll die erste der beiden Teilfrage der vorliegenden Arbeit diskutiert werden: Welche Auswirkung hat IPTi auf die Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum* beim Kleinkind?

Da die Fragestellung auf der Annahme beruht, dass das Ausmaß der MOI (Mittelwert, Polyklonalität) - neben Alter und Genetik - insbesondere von vorangegangenen *P. falciparum* Infektionen abhängt [8, 31, 43, 56, 102, 103], wird zunächst der Einfluss zurückliegender Malariaepisoden auf die MOI im 15. Lebensmonat erörtert, bevor dann schließlich der Einfluss von IPTi als einer Intervention in den Infektionsverlauf diskutiert wird. Anschließend wird der Studienort als Parameter besprochen, der das Infektionsgeschehen multifaktoriell beeinflusst.

4.2.1.1 Vorangegangene Malariaepisoden

Die multivariate Analyse ergab, dass - verglichen mit einer unauffälligen Vorgeschichte - vorausgegangene Malariaepisoden ohne Einfluss auf die Polyklonalität von *P. falciparum* Parasitämien im 15. Lebensmonat blieben (vgl. Tabelle 19). Das Ergebnis entspricht den Beobachtungen vorheriger Studien über Kleinkindern in hochendemischen Malariagebieten [52, 53]. Die Beobachtung deutet daraufhin, dass in diesem Alter das Immunsystem in Folge einer Malariaepisode noch kaum im Stande ist, Parasitämien zu halten. Somit scheint der grundlegende Mechanismus der Prämunitio, Infektionen zu tolerieren anstelle zu eliminieren [31], noch wenig ausgeprägt zu sein.

Die Beobachtung, dass eine vorausgegangene Episode den Anteil polyklonaler Infektionen tendenziell senkt, diese Tendenz aber umso schwächer ausfällt, je länger die letzte Malariaepisode zurückliegt (vgl. Legende Tabelle 19), deutet jedoch daraufhin, dass die Fähigkeit, Infektionen zu halten, im zeitlichen Verlauf progredient zunimmt.

4.2.1.2 Intermittierende präventive Behandlung im ersten Lebensjahr mit SP

Die statistische Analyse zeigte, dass die intermittierende präventive Behandlung mit SP im dritten und neunten Lebensmonat weder eine Auswirkung auf den mittleren MOI-Wert, noch auf den Anteil polyklonaler Infektionen hatte (vgl. Tabelle 17). Der mittlere MOI-Wert mikroskopischer Infektionen in der Behandlungsgruppe lag bei 2,42 gegenüber einem Mittelwert von 2,38 in der Placebogruppe, der Anteil polyklonaler mikroskopi-

scher Infektionen betrug bei der SP-Gruppe 57,1%, bei der Placebogruppe 62,5%, jeweils Differenzen weit über dem Signifikanzniveau. Diese Beobachtungen bestätigten sich auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Infektionsnachweismethoden und Studienorte sowie bei multivariater Analyse (vgl. Tabelle 19). Dass die MOI von IPTi unbeeinflusst blieb, unterstützen zudem die Ergebnisse der Stichprobenuntersuchung der MOI im Verlauf des ersten Lebensjahres für die Kohorte Tamale (vgl. 3.2.2). Somit wird deutlich, dass IPTi-SP die Malariainzidenz im Säuglingsalter zwar an beiden Studienorten senken konnte [67, 68], diese Beeinflussung des Infektionsgeschehens aber ohne Auswirkung auf die Quantität der MOI beim Kleinkind blieb. Eine ähnliche Beobachtung wurde in der Vergangenheit bei einer Studie zu insektizidimprägnierten Moskitonetzen (ITN) bei ein- bis zweijährigen Kindern gemacht [56].

Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass Interventionen, die zu einer Minderung, jedoch nicht (wie bspw. die kontinuierliche Chemoprophylaxe [8]) zu einem Ausschluss von Fällen an *P. falciparum* Infektionen führen, ohne Einfluss auf die MOI bleiben und somit die Entwicklung der Semiimmunität bzw. Prämunität ermöglichen.

4.2.1.3 Eigenbehandlung mit Chloroquin und Pyrimethamin

Aufgrund des Wissen um den möglichen Einfluss chemotherapeutischer Interventionen auf die MOI im Säuglingsalter [8] wurde die Kohorte Tamale auf eigenständig durchgeführte Antimalariatherapien mit den ortsüblichen Medikamenten Chloroquin und Pyrimethamin hin untersucht. Dabei ergab sich kein Zusammenhang zwischen den jeweiligen residualen Medikamentenspiegeln und dem mittleren MOI-Wert bzw. dem Anteil polyklonaler Infektionen (vgl. Tabelle 18).

4.2.1.4 Studienorte

Die statistische Analyse zeigte, dass zwischen den Kohorten keine wesentlichen Unterschiede der MOI-Werte bestanden: Der mittlere MOI-Wert mikroskopischer Infektionen der Kohorte Tamale lag bei 2,57 gegenüber einem Mittelwert von 2,30 der Kohorte Afigya Sekyere, der Anteil polyklonaler mikroskopischer Infektionen betrug innerhalb der Kohorte Tamale 78,8% und in Afigya Sekyere 70,5% (vgl. Tabelle 15). Diese Tendenz ausgeglichener MOI-Werte bestätigte sich auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Infektionsnachweismethoden sowie bei multivariater Analyse unter Beachtung aller weiteren, bekannten Einflussfaktoren auf den Anteil polyklonaler Infektionen (vgl. Tabellen 15 und 19).

Diese Ergebnisse zur MOI - wie auch die zu den beiden anderen Parametern der Semiimmunität (Parasitendichte, Symptomatik) (vgl. Tabelle 14 und Abschnitt 3.3.5) - entsprechen den Beschreibungen vorheriger Studien über den Infektionsstaus von Kindern im zweiten Lebensjahr in hochendemischen Gebieten [31, 52, 53, 55, 99, 104]. Ebenso kann der für die Kohorte Tamale ermittelte Verlauf der MOI über die ersten Lebensmonate hinweg (vgl. Abbildung 6) im Vergleich zu anderen Studien als für Alter und Gebiet konform bestätigt werden [37, 103].

Angesichts der Annahme, dass die Quantität der MOI neben Alter und Genetik insbesondere von der Infektionsgeschichte eines Individuums mit *P. falciparum* abhängt [8, 31, 43, 56, 102, 103], wäre allerdings zu erwarten gewesen, dass der mittlere MOI-Wert und der Anteil polyklonaler Infektionen der Kohorte Afigya Sekyere über denen in Tamale liegen, da sowohl vorherige Studien [74, 79], als auch die Daten der hiesigen IPTi-Studien (vgl. Tabellen 13 und 14) Afigya Sekyere als das endemischere der beiden Studiengebiete ausweisen.

Allerdings stellte sich bei Nachforschungen heraus, dass im Studiengebiet Afigya Sekyere die Malariainzidenzen zwischen den verschiedenen Siedlungen teilweise signifikant voneinander abweichen [90], während Tamale geographisch und endemisch als homogen gilt. Da für die vorliegende Studie aber keine Garantie vorliegt, dass die Probanden über die Dörfer gleich verteilt waren, mag diese Heterogenität der Kohorte Afigya Sekyere dazugeführt haben, dass trotz einer höheren Gesamtinzidenz des Ortes Afigya Sekyere die dortige Kohorte weniger exponiert war als die aus Tamale.

Daneben könnten die - trotz unterschiedlicher Endemizität - zwischen den Studienorten korrespondierenden MOI-Werte auch im saisonalen Zeitpunkt der Datenerfassung begründet liegen: Die Mehrheit der Probanden aus Afigya Sekyere erlebte den 15. Lebensmonat in der Trockenzeit, wohingegen es sich für die Kohorte Tamale genau entgegengesetzt verhielt (vgl. Tabelle 14). Verschiedene Studien aber ergaben, dass das Ausmaß der MOI zwischen den Saisonen stark schwankt, mit Maximalwerten in der Regenzeit [40, 100, 105].

Dass die (leichten) Unterschiede zwischen den Studienorten sich nicht in den MOI-Werten widerspiegeln, kann aber auch auf die vermutlich eingeschränkte Probenqualität aus Afigya Sekyere (vgl. Abbildung 5) zurückzuführen sein.

Festzuhalten bleibt, dass sich zwischen den Kohorten Afigya Sekyere und Tamale keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Quantität der MOI ergaben und somit der

Studienort bei ähnlicher Endemizität (jeweils hochendemisch mit moderaten saisonalen Schwankungen) keinen wesentlichen Einfluss auf die MOI zu haben schien.

4.2.1.5 Schlussfolgerung

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass an beiden Studienorten das neuartige Präventionskonzept der intermittierenden präventiven Behandlung von Säuglingen (mit SP) zwar die Malariainzidenz im ersten Lebensjahr deutlich senkte [67, 68], dabei aber keinen Einfluss auf die Multiplizität einer *P. falciparum* Infektion beim Kleinkind nahm, und sich somit gegenüber anderen Kontrollmaßnahmen im Säuglingsalter (bspw. mittels Impfstoff [35, 72] oder kontinuierlicher Chemoprophylaxe [8]) auszeichnete.

Offen bleibt, in welchem Zusammenhang die Multiplizität der Infektion im 15. Lebensmonat mit dem prospektiven Risiko für nachfolgende Malariaepisoden und Anämien (Monat 15-24) steht. Sollte sich herausstellen, dass auch schon beim Kleinkind - im Sinne der Prämunitationstheorie - sich in Folge einer polyklonalen Infektion die malariabedingte Morbidität erniedrigt, wäre die durch IPTi unbeeinflusst gebliebene MOI als Indikator dafür zu sehen, dass die intermittierende präventive Behandlung von Säuglingen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Semimmunität hat.

4.2.2 Einfluss einer polyklonalen *P. falciparum* Infektionen im 15. Lebensmonat auf das prospektive Risiko malariabedingter Morbidität

4.2.2.1 Infektion versus Nichtinfektion

Bei der Längsschnittuntersuchung ergab sich zunächst, dass die Anwesenheit einer *P. falciparum* Infektionen im 15. Lebensmonat (egal ob mono- oder polyklonaler Art) mit einem erhöhten Malaria- und Anämierisiko in den folgenden neun Monaten einherging (vgl. Tabelle 20). Die Ergebnisse veränderten sich in ihrer Tendenz auch bei Beachtung von IPTi nicht (vgl. Tabelle 21).

Diese Beobachtungen widersprechen zunächst der Prämunitationstheorie.

Vorherige Studien zur MOI im Kindesalter bestätigen jedoch, dass Infektionen in den ersten Lebensjahren ein erhöhtes prospektives Risiko für Malaria und Anämie nach sich ziehen und erst beim älteren Kleinkind protektiv wirken [17, 36, 38, 53, 55, 89]. Diesbezüglich wird angenommen, dass zu Beginn der Semiimmunitätsentwicklung bzw. vor der Etablierung einer Prämunitation *P. falciparum* Infektionen durch die unspezifische Immunantwort radikal eliminiert werden. Die Abwesenheit von *P. falciparum* Infektionen

deutet in diesem Alter also auf ein besonders effektives Immunsystem hin, während Infektionen ein Hinweis darauf sind, dass das Abwehrsystem weniger wirksam und das befallene Individuum folglich für Malaria vulnerabler ist [52, 53]. Hinsichtlich des erhöhten Anämierisikos in Folge von Infektionen wird angenommen, dass es bei exponierten Kindern über die Zeit zum kumulativen Erwerb von Parasiten kommt, was die Anämiewahrscheinlichkeit mit fortlaufender Zeit zwangsläufig erhöht – auch noch nach Einsetzen einer effektiven Prämuniton [89].

Die hiesige Beobachtung erhöhter prospektiver Risiken bei bestehender *P. falciparum* Infektionen könnten allerdings auch methodische bedingt gewesen sein, im Falle dass ein Teil der Probanden dauerhaft nicht exponiert und dem Malariarisiko somit entzogen war. Ein Hinweis darauf könnte die Beobachtung sein, dass asymptomatisch polyklonal infizierte Kinder ebenso wie symptomatisch polyklonal infizierte ein erhöhtes prospektives Risiko davotrugen (vgl. Tabelle 22), obgleich davon ausgegangen wird, dass insbesondere asymptomatische polyklonale Infektionen bereits vor Superinfektionen schützen [35-38, 57].

Die Untersuchung macht deutlich, dass im 15. Lebensmonat polyklonale *P. falciparum* Infektionen noch nicht im Sinne der Prämunitonstheorie vor Superinfektionen schützen, sondern Infektionen vorerst das prospektive Risiko für Malaria und Anämie erhöhen.

Diese Beobachtung lässt die Kohorten in ein frühes, ihrem Alter in holoendemischen Gebieten gemäües Stadium der Semiimmunität einordnen. Kohärent zu dieser Einstufung sind auch andere, im Rahmen dieser Studie ermittelte Zusammenhänge. So wurde beobachtet, dass die MOI alterstypisch bei symptomatischen Infektionen deutlich erhöht ist (vgl. Tabelle 19) [99, 102, 104]. Ebenso altersspezifisch ist die Beobachtung, dass die Zeit seit der letzten Malariaepisode keinen Einfluss auf die MOI hat (vgl. Tabelle 19), das Immunsystem also noch kaum Parasitämien duldet [52, 53]. Andererseits weisen die vorliegenden asymptomatischen Infektionen (vgl. Tabelle 14) daraufhin, dass vereinzelt Parasitämien bereits toleriert werden [54, 55].

Aus den Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob innerhalb der Gruppe der Infizierten das Prämunitionskonzept wirkte und polyklonale im Vergleich zu monoklonalen Infektionen vor Superinfektionen schützten und so das prospektive Risiko für Malaria und Anämie senkten.

4.2.2.2 Polyklonale versus monoklonale Infektion

Für die beiden Studienorte ergaben sich konträre Beziehungen zwischen der MOI und dem prospektiven Risiko malariabedingter Morbidität. Während in Tamale im 15. Lebensmonat polyklonal infizierte Kinder im Vergleich zu monoklonal infizierten in den folgenden neun Monaten signifikant seltener an Malaria erkrankten und tendenziell seltener an schwerer Malaria und Anämie, verhielt es sich in Afigya Sekyere genau entgegengesetzt. Dort erhöhte eine polyklonale Infektion signifikant das prospektive Risiko für Malaria und steigerte die Wahrscheinlichkeit, zukünftig eine Anämie zu erleiden (vgl. Tabelle 23 und Abbildung 8). Bei Beachtung des Symptomatikstatus verstärkten sich für die asymptomatisch infizierten Kinder die Beobachtungen jeweils (vgl. Tabelle 24).

Ogleich sich also die MOI-Werte quantitativ zwischen den Studienorten nicht voneinander unterschieden (vgl. Tabellen 15 und 19), wichen die Qualitäten der MOI als prognostischer Parameter deutlich voneinander ab, und nur für die Kohorte Tamale kam der MOI die Eigenschaft der Prämunitio zu, wonach insbesondere asymptomatische polyklonale Infektionen vor Superinfektionen schützen [35-38, 57].

4.2.2.3 Ergebnisdifferenzen zwischen den Studienorten

Möglicherweise begründen sich die zwischen den Kohorten konträren Verhältnisse von MOI und prospektivem Risiko auf eingeschränkt verwertbaren MOI-Daten, bedingt durch die reduzierte Probenqualität aus Afigya Sekyere (vgl. Abbildung 5).

Wahrscheinlicher aber ist, dass neben der MOI noch andere Faktoren auf das prospektive Erkrankungsrisiko Einfluss nahmen und einen eventuellen Effekt der Multiplizität der Infektion überlagerten. Bspw. lässt die starke Streuung für schwere Malaria (vgl. Tabelle 20) vermuten, dass neben der Höhe der MOI auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Malariainzidenz hatten. So ist z.B. durch vorherige Untersuchungen im Studiengebiet Tamale bekannt, dass defizitäre Varianten der Toll-like-Rezeptoren prädisponierend für schwere Malaria sind [86]. Neben genetischen Faktoren mit Auswirkungen auf die Inzidenzraten [26, 27, 86, 90, 106], sind auch demographische und sozioökonomische Faktoren und Präventionsmaßnahmen als Einflussgrößen bekannt. So haben Kreuels et al. etwa bei ihren Untersuchungen der Kohorte Afigya Sekyere folgende Faktoren mit signifikantem Einfluss auf die Malariainzidenzraten identifiziert können: saisonaler Geburtszeitpunkt, Bildungs- und Beschäftigungsstatus sowie finanzielle Situation der Mutter, Lokalität des Haushaltes, Dorfstruktur, Gebrauch von Moskitonetzen, Vorhandensein von Fensterscheiben [90].

Die jeweilige statistische Schärfe der - zwischen den Kohorten konträren - Ergebnisse lässt aber gewichtigere Einflussfaktoren auf das Verhältnis von MOI und prospektivem Malariarisiko vermuten:

Vorangegangene Studien weisen daraufhin, dass die Qualität der MOI bzw. die Etablierung einer protektiven Prämunitio von den lokalen Transmissionsraten abhängt (bzw. von der Frequenz und Dauer vorausgegangener Infektionen) sowie von der Exposition für polyklonale Infektionen [43]. So ergaben Untersuchungen, dass sich das mit einer polyklonalen Infektion einhergehende prospektive Malariarisiko in Gebieten gleicher bzw. gleich hoher Transmissionsraten mit fortschreitendem Lebensalter ändert. (Wobei das Alter als eine Funktion aus Frequenz und Dauer vorausgegangener Infektionen und der Exposition für polyklonale Infektionen zu sehen ist). Während eine polyklonale Infektion im Vergleich zu einer monoklonalen beim jüngeren Kind noch ein erhöhtes prospektives Risiko für malariabedingte Morbidität bedeutet [52, 55], wirkt diese beim älteren Kind im Sinne der Prämunitiotheorie schützend [8, 36-38, 55, 107].

Diese Beobachtungen deuten im Vergleich mit den Daten der vorliegenden Studie daraufhin, dass die zwischen den Kohorten konträren Verhältnisse von MOI und prospektivem Risiko nicht (wie oben erwägt) methodisch bedingt waren, sondern dass die Kohorte aus Tamale in der Entwicklung der Prämunitio vor der aus Afigya Sekyere lag. Ein weiterer Hinweis für den verlangsamten Progress der Kohorte Afigya Sekyere ist dabei die lediglich für diese Studiengruppe beobachtete, positive Korrelation von MOI und Parasitendichte: ein Verhältnis das sich nur ganz zu Beginn der Entwicklung der Semiimmunität ergibt [8, 99, 103].

Da die beiden Kohorten jeweils Kinder gleichen Alters umfassten und aus Studiengebieten mit ähnlichen Transmissionsraten stammten, muss die Ursache für die verzögerte Entwicklung der Prämunitio in Afigya Sekyere in einer verminderten Frequenz und Dauer vorausgegangener Infektionen und/oder einer geringeren Exposition für polyklonale Infektionen gelegen haben.

Die Ursachen dafür könnten in der Häufigkeit der Nachuntersuchungen und in der medikamentöse Therapie in Afigya Sekyere liegen.

4.2.2.4 Frequenz der Nachuntersuchungen und medikamentöse Malariatherapie

Während die im Anschluss an die Rekrutierung durchgeführten Nachuntersuchungen in Tamale in dreimonatlichen Abständen stattfanden, erfolgten sie in Afigya Sekyere monatlich (vgl. Abbildung 1). Obgleich die Eltern der Probanden an beiden Studienorten

dazu aufgefordert waren, bei jedem Anzeichen einer Erkrankung mit ihrem Kind vorstellig zu werden, ist davon auszugehen, dass in Folge der häufigeren aktiven Untersuchungen in Afigya Sekyere mehr Fälle von Malaria diagnostiziert und behandelt wurden. (Dazu könnte zudem auch die in Tamale im ersten Studienjahr aufgrund von politischen Unruhen verhängte, nächtliche Ausgangssperre geführt haben.)

Eine häufigere Diagnose und Therapie von Malaria führt aber dazu, dass sich die durchschnittliche Dauer der *P. falciparum* Infektionen verkürzt. Außerdem erhöht sich durch die häufigere Untersuchung die Wahrscheinlichkeit von Malariafehldiagnosen beim gleichzeitigen Auftreten einer *P. falciparum* Parasitämie und Fieber anderer Genese (bspw. aufgrund einer viralen oder bakteriellen Infektion), wodurch asymptomatische *P. falciparum* Infektionen als sich etablierende Prämunitationen beseitigt werden.

Neben dem unterschiedlichen Untersuchungstakt könnten auch die verschiedenen medikamentösen Therapien Einfluss auf Qualität und Quantität der Infektionen genommen haben. Während eine diagnostizierte Malaria in Tamale mit Artesunat behandelt wurde, erfolgte die Therapie in Afigya Sekyere mit Artesunat-Amodiaquin. Das blutschizontozide Artesunat aber hat bei einer Halbwertszeit von ca. 0,5 h eine Wirkdauer von nur maximal fünf Tagen, während das Kombinationspräparat Artesunat-Amodiaquin eine Wirkdauer von ca. drei Wochen hat. Somit wirkt Artesunat-Amodiaquin auch prophylaktisch und verringert dadurch sowohl die Frequenz von Infektionen, als auch die Exposition für polyklonale Infektionen.

4.2.2.5 Schlussfolgerung

Innerhalb der Gruppe der im 15. Lebensmonat infizierten Kinder gingen (insbesondere asymptomatische) polyklonale Infektionen mit einem erniedrigten prospektiven Malariarisiko einher. Diese Beobachtung begründet sich auf den Daten der Kohorte aus Tamale, da hier im Vergleich zur Kohorte Afigya Sekyere Störfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden konnten und zudem im Verlauf der Studie weniger in das Infektionsgeschehen eingegriffen wurde. Somit liegen Hinweise vor, dass in hochendemischen Gebieten auch schon beim Kleinkind polyklonale Infektionen gemäß der Prämunitationstheorie vor zukünftigen symptomatischen Infektionen schützen.

Insgesamt aber erniedrigte ein negativer Infektionsstatus das Risiko für zukünftige Infektionen und Erkrankungen, was für Kinder dieses Alters in hochendemischen Gebieten aber typisch ist [17, 36, 38, 53, 55, 89].

4.3 Gesamtfazit

Um die Wirksamkeit der intermittierenden präventiven Behandlung von Säuglingen mit Antimalariamedikamenten zu erforschen, wurde dieses Konzept in den Jahren 2004 – 2009 mit der Unterstützung durch WHO und UNICEF von einer internationalen Arbeitsgemeinschaft, dem IPTi-Konsortium (www.ipti-malaria.org), im Rahmen multizentrischer Studien durchgeführt [108, 109]. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studien konnte die Wirksamkeit von IPTi bezüglich der Reduzierung von Malaria und malariabedingter Anämie nachgewiesen werden, so dass zuletzt eine WHO-Empfehlung für IPTi formuliert wurde [5].

Zwar wurden dabei auch mögliche Reboundeffekte nach Beendigung der Intervention beachtet, die genauen Folgen von IPTi auf die langfristige Entwicklung einer Prämunität und Semiimmunität gegen *P. falciparum* wurden jedoch nicht weiter untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass IPTi-SP (im Gegensatz zu andersartigen Interventionen im Säuglingsalter [8, 35, 72]) in hochendemischen Gebieten keinen Einfluss auf die Multiplizität einer *P. falciparum* Infektion beim 15 Monate alten Kleinkind hat. Zugleich konnte nachgewiesen werden, dass - im Sinne der Prämunitätstheorie – sich in Folge einer polyklonalen Infektion die malariabedingte Morbidität erniedrigt. Somit ist IPTi als Intervention zur Reduzierung der Malariamorbidity im Säuglingsalter also auch unter Beachtung der Folgen für die Entwicklung der Semiimmunität zu befürworten. Weitere derartige Untersuchungen müssen folgen, um diese Beobachtung der vorliegenden Studie zu bestätigen.

4.4 Ausblick: MOI als Parameter zur Evaluierung von Präventionsmaßnahmen

Vor dem Hintergrund der hiesigen Studienergebnisse wird vorgeschlagen, MOI grundsätzlich als Parameter zu verwenden, um Interventionen bei Säuglingen zur Malaria-kontrolle zu bewerten und die Langzeitfolgen für die Entwicklung der Semiimmunität abzuschätzen. Auf diese Weise könnte auch IPTi als Intervention weiter evaluiert und optimiert werden, bspw. hinsichtlich noch offener Fragen zum möglichen Einsatz in saisonalen Endemiegebieten und zum Gebrauch von alternativen Medikamenten in Gebieten hoher SP-Resistenzen [5], oder vor dem Hintergrund andernorts in Folge von IPTi beobachteter anhaltend protektiver Effekte [71] bzw. Rebound-Effekte [65].

Vorherige Studien ergaben, dass neben der MOI auch klinische Symptome (als dem Indikator über das Ausmaß der antitoxischen Immunität) und die Parasitendichte (als

dem Indikator über das Ausmaß antiparasitärer Zytokine) bzw. Zytokine Auskunft über die Entwicklung der Semiimmunität geben und in Zusammenhang mit dem prospektiven Risiko für Malaria zu setzen sind [53, 110, 111]. Allerdings konnte der Einfluss von Zytokinen auf das prospektive Risiko nur in vitro nachgewiesen werden [110, 111], und die Ermittlung von Parasitendichte und klinischen Symptomen unterliegt zahlreichen methodischen Störgrößen [53, 95, 96].

Ein zur MOI alternativer Biomarker, da von ähnlicher Praktikabilität und methodischer Sicherheit, sind Antikörper. In der Vergangenheit wurden IgG-AK gegen verschiedenste parasitäre Oberflächenantigene identifiziert und ihr protektiver Effekt in zahlreichen Studien untersucht. Eine jüngst dazu veröffentlichte Metaanalyse aber ergab, dass nur für bestimmte IgG-AK Korrelationen zur Qualität der erworbenen Immunität auszumachen sind und sich die ermittelten Beziehungen teilweise widersprechen [34]. Aber auch für AK mit eindeutiger prospektiver Aussagekraft (bspw. IgG gegen MSP-3-Ct oder MSP-1₁₉ [112, 113] liegen im Vergleich zur MOI als evidenzbasiertem Parameter noch zu wenige und auf nur wenige Regionen begrenzte Studien vor [34].

Somit bleibt MOI - trotz der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen qualitativen Variabilität – einer von sehr wenigen immunologischen Parametern, um Interventionen im Säuglingsalter hinsichtlich der Entwicklung der Semiimmunität zu bewerten.

5 Zusammenfassung

Vorkehrungen zur Prävention von Malaria im Säuglingsalter laufen Gefahr, die Entwicklung der Semiimmunität und Prämunitation negativ zu beeinflussen und so zu einem Anstieg der malariabedingten Morbidität nach Beendigung der Intervention zu führen [6-8, 60-63]. Prämunitation stellt dabei den Schutz vor Superinfektionen mit *P. falciparum* dar, beruhend auf einer persistierenden, polyklonalen Infektion, die es dem Immunsystem über kreuzreagierende Antikörper erlaubt, neu auftretende Stämme zu kontrollieren bzw. abzuwehren [30-32]. Das Ausmaß der Prämunitation kann annähernd durch die Anzahl differenzierbarer Plasmodien-Genotypen (Multiplizität der Infektion - MOI) im Wirt bemessen werden [8]. Studien haben gezeigt, dass dauerhafte Präventionsmaßnahmen im Kindesalter dazu führen, dass die MOI sinkt und postinterventionell zugleich die Malariainzidenz steigt [8].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des neuartigen Präventionskonzepts, die intermittierende präventive Behandlung von Säuglingen (IPTi) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP), auf die MOI beim Kleinkind zu untersuchen. Außerdem sollte analysiert werden, in welchem Zusammenhang die MOI in diesem Alter mit dem prospektiven Risiko für malariabedingte Morbidität stand.

Grundlage für die Untersuchung waren zwei in den Jahren 2003 bis 2005 durchgeführte placebokontrollierte, randomisierte, doppelblinde IPTi-Studien in Tamale und im Afigya Sekyere District, Ghana, bei denen IPTi die Inzidenz der Malaria im ersten Lebensjahr um 33% bzw. um 21% reduzierte [67, 68]. Insgesamt wurden 2270 Säuglinge eingeschlossen, die im Alter von drei, neun und 15 Monaten eine therapeutische Dosis SP oder Placebo erhielten. Während der Studienzeit vom dritten bis zum 24. Lebensmonat erfolgten Nachuntersuchungen in monatlichen (in Afigya Sekyere) bzw. in dreimonatlichen (Tamale) Abständen. Die MOI wurde im 15. Lebensmonat, sechs Monate nach IPTi-2, ermittelt. Mittels einer Querschnittsanalyse wurden die Einflussgrößen auf die MOI untersucht, und in einer Längsschnittanalyse wurden die MOI und das prospektive Risiko für nachfolgende Malariaepisoden und Anämien (Monat 15-24) miteinander in Beziehung gesetzt.

P. falciparum Infektionen zeigten bei 15 Monate alten Kindern in Tamale mit $\bar{x} = 2,28$ eine im Vergleich zu Afigya Sekyere ($\bar{x} = 2,30$) leicht erniedrigte MOI auf ($P = 0,89$). Ebenfalls leicht erniedrigt war in Tamale mit 69,0% der Anteil polyklonaler Infektionen

gegenüber 70,5% in Afigya Sekyere (aOR = 0,90; 95% KI: 0,6 – 1,4). Bei den Studiengruppen ähnelte sich die MOI: Bei der SP-Gruppe lag der mittlere MOI-Wert bei $\bar{x} = 2,25$ und bei der Placebo-Gruppe bei $\bar{x} = 2,33$ ($P = 0,55$), der Anteil polyklonaler Infektionen belief sich bei der SP-Gruppe auf 69,7% und bei der Placebo-Gruppe auf 69,6% (aOR: 0,94; 95% KI: 0,6 – 1,5). Diese Beobachtungen blieben auch unter multivariater Berücksichtigung anderer Einflussfaktoren bestehen.

Das prospektive Risiko für Malaria war beim Vorliegen einer *P. falciparum* Infektion im 15. Lebensmonat sowohl in Tamale (IDR = 1,48; 95% KI: 1,3 – 1,7), als auch in Afigya Sekyere (IDR = 1,87; 95% KI: 1,6 – 2,3) signifikant erhöht. Das Ausmaß des Risikozuwachses hing jedoch von der Multiplizität der Infektion ab. In Tamale lag das prospektive Malariarisiko polyklonal infizierter Kinder um 33% unter dem monoklonal infizierter (IDR = 0,67; 95% KI: 0,5 – 0,9). In Afigya Sekyere verhielt es sich entgegengesetzt, dort bedeutete eine polyklonale Infektion einen Risikozuwachs für zukünftige Malaria um 77% (IDR = 1,77; 95% KI: 1,3 – 2,5).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IPTi-SP in hochendemischen Gebieten keinen Einfluss auf die Multiplizität einer *P. falciparum* Infektion beim 15 Monate alten Kleinkind hat. Zugleich konnte dargestellt werden, dass - im Sinne der Prämunitioinstheorie - sich in Folge einer polyklonalen Infektion die malariabedingte Morbidität erniedrigt. Der Grund für die entgegengesetzte Beobachtung in Afigya Sekyere erklärt sich möglicherweise über eine studienprotokollbedingte Reduktion tatsächlich stattgehabter Exposition der Kinder für *P. falciparum* Infektionen.

Somit ist IPTi als Intervention zur Reduzierung der Malariamorbidität im Säuglingsalter auch unter Beachtung der Folgen für die Entwicklung der Prämunitio zu befürworten. Weiter wird vor dem Hintergrund der hiesigen Studienergebnisse vorgeschlagen, MOI grundsätzlich als Parameter zu verwenden, um modifizierte IPTi-Konzepte [5] oder andere Interventionen bei Säuglingen zur Malariakontrolle zu bewerten und die Langzeitfolgen für die Entwicklung der Prämunitio abzuschätzen.

6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, World Malaria Report 2008. 2008, WHO: Geneva.
2. Gallup, J.L. and J.D. Sachs, The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. 64(1-2 Suppl): p. 85-96.
3. Mendis, K., et al., From malaria control to eradication: The WHO perspective. *Trop Med Int Health*, 2009. 14(7): p. 802-9.
4. Breman, J.G., M.S. Alilio, and A. Mills, Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg*, 2004. 71(2 Suppl): p. 1-15.
5. World Health Organization, Report of the Technical Consultation on Intermittent Preventive Treatment in Infants (IPTi), Technical Expert Group on Preventive Chemotherapy. 2009, WHO: Geneva. p. 1-11.
6. Greenwood, B.M., et al., Mortality and morbidity from malaria after stopping malaria chemoprophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995. 89(6): p. 629-33.
7. Menendez, C., et al., Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet*, 1997. 350(9081): p. 844-50.
8. Beck, H.P., et al., Effect of iron supplementation and malaria prophylaxis in infants on *Plasmodium falciparum* genotypes and multiplicity of infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 41-5.
9. Lang, W., Löscher, Th., ed. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Vol. 3. 2000, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
10. Clark, I.A. and W.B. Cowden, The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther*, 2003. 99(2): p. 221-60.
11. Schofield, L., et al., Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol*, 1996. 156(5): p. 1886-96.
12. Berendt, A.R., et al., Molecular mechanisms of sequestration in malaria. *Parasitology*, 1994. 108 Suppl: p. S19-28.
13. Miller, L.H., et al., The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002. 415(6872): p. 673-9.

14. Baruch, D.I., et al., Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 1995. 82(1): p. 77-87.
15. Reeder, J.C., et al., The adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(9): p. 5198-202.
16. Dondorp, A.M., et al., Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 1999. 60(5): p. 733-7.
17. Menendez, C., A.F. Fleming, and P.L. Alonso, Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*, 2000. 16(11): p. 469-76.
18. World Health Organization, Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000. 94 Suppl 1: p. S1-90.
19. Rockett, K.A., et al., In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun*, 1992. 60(9): p. 3725-30.
20. Good, M.F., J.A. Berzofsky, and L.H. Miller, The T cell response to the malaria circumsporozoite protein: an immunological approach to vaccine development. *Annu Rev Immunol*, 1988. 6: p. 663-88.
21. Good, M.F. and D.L. Doolan, Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol*, 1999. 11(4): p. 412-9.
22. Bouharoun-Tayoun, H., et al., Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med*, 1990. 172(6): p. 1633-41.
23. Kerr, P.J., L.C. Ranford-Cartwright, and D. Walliker, Proof of intragenic recombination in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 1994. 66(2): p. 241-8.
24. Biggs, B.A., et al., Antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(20): p. 9171-4.
25. Roberts, D.J., et al., Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, 1992. 357(6380): p. 689-92.
26. Roberts, D.J. and T.N. Williams, Haemoglobinopathies and resistance to malaria. *Redox Rep*, 2003. 8(5): p. 304-10.

27. Williams, T.N., Human genetic resistance to malaria. *Adv Exp Med Biol*, 2009. 634: p. 243-53.
28. Druilhe, P. and J.L. Perignon, A hypothesis about the chronicity of malaria infection. *Parasitol Today*, 1997. 13(9): p. 353-7.
29. Rhee, M.S., et al., Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*, 2001. 126(3): p. 503-10.
30. Clark, I.A., F.M. al Yaman, and L.S. Jacobson, The biological basis of malarial disease. *Int J Parasitol*, 1997. 27(10): p. 1237-49.
31. Smith, T., et al., Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 59-64.
32. Sergent, E.D. and L. Parrot, L'immunité, la prémunition et la résistance innée. *Arch Inst Pasteur Alger*, 1935. 13: p. 279-319.
33. Tanner, M., et al., The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 1. General introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 1-2.
34. Fowkes, F.J., et al., The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 7(1): p. e1000218.
35. Beck, H.P., et al., Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis*, 1997. 175(4): p. 921-6.
36. al-Yaman, F., et al., Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997. 91(5): p. 602-5.
37. Farnert, A., et al., Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis*, 1999. 179(4): p. 989-95.
38. Berezky, S., et al., Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. *Microbes Infect*, 2007. 9(1): p. 103-10.
39. Contamin, H., et al., PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(4): p. 944-51.

40. Bendixen, M., et al., Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to transmission intensity and host age: a study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001. 95(2): p. 143-8.
41. Snounou, G., et al., Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93(4): p. 369-74.
42. Rogier, C., D. Commenges, and J.F. Trape, Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. 54(6): p. 613-9.
43. Farnert, A., et al., Transmission-dependent tolerance to multiclonal *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis*, 2009. 200(7): p. 1166-75.
44. World Health Organization, World Malaria Report 2005. 2005, World Health Organization: Geneva.
45. Desowitz, R.S., J. Elm, and M.P. Alpers, *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): p. 988-93.
46. Rasheed, F.N., et al., Relationships between maternal malaria and malarial immune responses in mothers and neonates. *Parasite Immunol*, 1995. 17(1): p. 1-10.
47. Gilles, H.M., The development of Malarial infection in breast-fed Gambian infants. *Ann Trop Med Parasitol*, 1957. 51(1): p. 58-62.
48. Pasvol, G., D.J. Weatherall, and R.J. Wilson, Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 1977. 270(5633): p. 171-3.
49. Sehgal, V.M., W.A. Siddiqui, and M.P. Alpers, A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1989. 83 Suppl: p. 105-6.
50. Achidi, E.A., et al., A longitudinal study of seroreactivities to *Plasmodium falciparum* antigens in Nigerian infants during their first year of life. *Acta Trop*, 1995. 59(2): p. 173-83.
51. Muirhead-Thomson, R.C., The distribution of anopheline mosquito bites among different age groups; a new factor in malaria epidemiology. *Br Med J*, 1951. 1(4715): p. 1114-7.

52. Branch, O.H., et al., *Plasmodium falciparum* genotypes, low complexity of infection, and resistance to subsequent malaria in participants in the Asembo Bay Cohort Project. *Infect Immun*, 2001. 69(12): p. 7783-92.
53. Mayor, A., et al., *Plasmodium falciparum* multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity. *Trop Med Int Health*, 2003. 8(1): p. 3-11.
54. Muller, D.A., et al., Prospective risk of morbidity in relation to multiplicity of infection with *Plasmodium falciparum* in Sao Tome. *Acta Trop*, 2001. 78(2): p. 155-62.
55. Henning, L., et al., A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004. 98(12): p. 687-94.
56. Fraser-Hurt, N., et al., Effect of insecticide-treated bed nets on haemoglobin values, prevalence and multiplicity of infection with *Plasmodium falciparum* in a randomized controlled trial in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 47-51.
57. Robert, F., et al., Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996. 90(6): p. 704-11.
58. Snow, R.W., et al., Severe childhood malaria in two areas of markedly different *falciparum* transmission in east Africa. *Acta Trop*, 1994. 57(4): p. 289-300.
59. Trape, J.F. and C. Rogier, Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today*, 1996. 12(6): p. 236-40.
60. Snow, R.W. and K. Marsh, The consequences of reducing transmission of *Plasmodium falciparum* in Africa. *Adv Parasitol*, 2002. 52: p. 235-64.
61. Saarinen, M., et al., Malaria prophylaxis with proguanil to Namibian refugee children in Angola. *Trop Med Parasitol*, 1988. 39(1): p. 40-2.
62. Bjorkman, A., et al., Monthly antimalarial chemotherapy to children in a holoendemic area of Liberia. *Ann Trop Med Parasitol*, 1986. 80(2): p. 155-67.
63. Oyediran, A.B., et al., Severe morbidity among children in a trial malaria chemoprophylaxis with pyrimethamine or chloroquine in Ibarapa, Nigeria. *Afr J Med Med Sci*, 1993. 22(1): p. 55-63.
64. Schellenberg, D., et al., Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in Tanzanian infants: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001. 357(9267): p. 1471-7.

65. Chandramohan, D., et al., Cluster randomised trial of intermittent preventive treatment for malaria in infants in area of high, seasonal transmission in Ghana. *BMJ*, 2005. 331(7519): p. 727-33.
66. Macete, E., et al., Intermittent preventive treatment for malaria control administered at the time of routine vaccinations in Mozambican infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis*, 2006. 194(3): p. 276-85.
67. Kobbe, R., et al., A randomized controlled trial of extended intermittent preventive antimalarial treatment in infants. *Clin Infect Dis*, 2007. 45(1): p. 16-25.
68. Mockenhaupt, F.P., et al., Intermittent preventive treatment in infants as a means of malaria control: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in northern Ghana. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. 51(9): p. 3273-81.
69. Grobusch, M.P., et al., Intermittent preventive treatment against malaria in infants in Gabon--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis*, 2007. 196(11): p. 1595-602.
70. Aponte, J.J., et al., Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*, 2009. 374(9700): p. 1533-42.
71. Schellenberg, D., et al., Intermittent preventive antimalarial treatment for Tanzanian infants: follow-up to age 2 years of a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2005. 365(9469): p. 1481-3.
72. Haywood, M., et al., Reduction in the mean number of *Plasmodium falciparum* genotypes in Gambian children immunized with the malaria vaccine SPf66. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 65-8.
73. World Medical Association, Declaration of Helsinki 5th rev. 2000.
74. Ehrhardt, S., et al., Malaria, anemia, and malnutrition in african children--defining intervention priorities. *J Infect Dis*, 2006. 194(1): p. 108-14.
75. Dzisi, S.Y., Childhood malaria in the Bulpeila subdistrict of Tamale, northern Ghana: a study on knowledge, perceptions and attitudes, and sociodemographic factors among care givers, in *Charité - University Medicine Berlin*. 2002, Humboldt University: Berlin.
76. Mockenhaupt, F.P., et al., Chloroquine-treatment failure in northern Ghana: roles of *pfprt* T76 and *pfmdr1* Y86. *Ann Trop Med Parasitol*, 2005. 99(8): p. 723-32.

77. Mockenhaupt, F.P., et al., A randomized, placebo-controlled, double-blind trial on sulfadoxine-pyrimethamine alone or combined with artesunate or amodiaquine in uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health*, 2005. 10(6): p. 512-20.
78. Mockenhaupt, F.P., et al., Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg*, 2004. 71(2): p. 167-72.
79. Kobbe, R., et al., Seasonal variation and high multiplicity of first *Plasmodium falciparum* infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Trop Med Int Health*, 2006. 11(5): p. 613-9.
80. Noguchi Memorial Institute for Medical Research, Ghana Demographic and Health Survey, 2003., S. Service, Editor. 2004: Accra.
81. Marks, F., et al., High prevalence of markers for sulfadoxine and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in the absence of drug pressure in the Ashanti region of Ghana. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(3): p. 1101-5.
82. Carter, J.Y., et al., Reduction of the efficacy of antifolate antimalarial therapy by folic acid supplementation. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. 73(1): p. 166-70.
83. Ghana Health Service, Standard treatment guidelines. 2004. 5th ed.
84. Snounou, G., et al., High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 1993. 61(2): p. 315-20.
85. Witte, A.M., 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(4): p. 521-5.
86. Mockenhaupt, F.P., et al., Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *J Commun Dis*, 2006. 38(3): p. 230-45.
87. Mockenhaupt, F.P., et al., Concurrence of *Plasmodium falciparum* dhfr and crt mutations in northern Ghana. *Malar J*, 2005. 4: p. 42.
88. Mockenhaupt, F.P., et al., Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *J Infect Dis*, 2004. 190(5): p. 1006-9.
89. Mockenhaupt, F.P., et al., *Plasmodium falciparum* multiplicity correlates with anaemia in symptomatic malaria. *Trop Med Int Health*, 2003. 8(10): p. 857-9.
90. Kreuels, B., et al., Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogeneous area with high endemicity. *J Infect Dis*, 2008. 197(1): p. 85-93.

91. Farnert, A., et al., Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001. 95(2): p. 225-32.
92. Bottius, E., 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): p. 15-9.
93. Johnston, S.P., et al., PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(3): p. 1087-9.
94. Coleman, R.E., et al., Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J*, 2006. 5: p. 121.
95. O'Meara, W.P., W.E. Collins, and F.E. McKenzie, Parasite prevalence: a static measure of dynamic infections. *Am J Trop Med Hyg*, 2007. 77(2): p. 246-9.
96. Farnert, A., et al., Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 1997. 56(5): p. 538-47.
97. Collins, W.J., et al., The use of genotyping in antimalarial clinical trials: a systematic review of published studies from 1995-2005. *Malar J*, 2006. 5: p. 122.
98. Farnert, A., et al., Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93(1): p. 50-3.
99. Felger, I., et al., Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 29-34.
100. Konate, L., et al., Variation of *Plasmodium falciparum msp1* block 2 and *msp2* allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 21-8.
101. Snounou, G. and H.P. Beck, The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today*, 1998. 14(11): p. 462-7.
102. Vafa, M., et al., Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J*, 2008. 7: p. 17.

103. Smith, T., et al., Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999. 93 Suppl 1: p. 15-20.
104. Ofosu-Okyere, A., et al., Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transition into the high transmission season. *Parasitology*, 2001. 123(Pt 2): p. 113-23.
105. Franks, S., et al., Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis*, 2001. 183(5): p. 796-804.
106. Mockenhaupt, F.P., et al., Limited influence of haemoglobin variants on *Plasmodium falciparum* *msp1* and *msp2* alleles in symptomatic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004. 98(5): p. 302-10.
107. Contamin, H., et al., Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. 54(6): p. 632-43.
108. Egan, A., J. Crawley, and D. Schellenberg, Intermittent preventive treatment for malaria control in infants: moving towards evidence-based policy and public health action. *Trop Med Int Health*, 2005. 10(9): p. 815-7.
109. Schellenberg, D., B. Cisse, and C. Menendez, The IPTi Consortium: research for policy and action. *Trends Parasitol*, 2006. 22(7): p. 296-300.
110. Mayengue, P.I., et al., The multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections is associated with acquired immunity to asexual blood stage antigens. *Microbes Infect*, 2009. 11(1): p. 108-14.
111. Doodoo, D., et al., Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 2002. 185(7): p. 971-9.
112. Nebie, I., et al., Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun*, 2008. 76(2): p. 759-66.
113. Doodoo, D., et al., Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malar J*, 2008. 7: p. 142.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

\bar{x}_{geom}	geometrischer Mittelwert
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AG	Antigen
AK	Antikörper
aOR	adjustierte Odds Ratio
BMBF	Bundesministeriums für Bildung und Forschung
BMZ	Bundesministeriums für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
d.h.	das heißt
DAAD	Deutscher Akademischer Austauschdienst
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGTP	Deoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DP	Dapson-Pyrimethamin
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPI	Expanded Programme on Immunisation
et al.	et alii/ et aliae
g	Gramm
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

h	Stunde
H ₀	Nullhypothese
H _A	Alternativhypothese
Hb	Hämoglobin
HbC	Hämoglobin C
HbF	Fetales Hämoglobin
HbS	Hämoglobin S
ICAM-1	Intercellular Adhesion Moelcule
ID	Inzidenzdichte
IDR	Inzidenzdichten Ratio
IFN- γ	Interferon- γ
IFT	Instituts für Tropenmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
insb.	insbesondere
IPTi	Intermittent Preventive Treatment in Infants
ITN	Insecticide Treated Nets
ITT	Intention-to-treat
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
LM	Lebensmonat
log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHCI	Major Histocompatibility Complex I
MHCII	Major Histocompatibility Complex II
ml	Mikroliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of Infection

MPS	Monozyten-Phagozyten-System
MSP	Merozoite Surface Proteins
n	Anzahl
neg.	negativ
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
OR	Odds Ratio
P	p-Wert
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Protektive Effektivität
PfEMP-1	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein-1
pos.	positiv
PYAR	Person-Years-at-Risk
r_s	Rangkorrelationskoeffizient
s.	siehe
SD	standard deviation/ Standardabweichung
snoRNA	Small Nucleolar Ribonucleic Acid
SP	Sulfadoxin- Pyrimethamin
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Taq-Polymerase	Thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UNICEF	United Nations Children's Fund
V	Volt

v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.2 Erklärung

Ich, Ulrike C. Buchholz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Der Einfluss intermittierender präventiver Behandlung von Säuglingen mit Sulfadoxin-Pyrimethamin auf die Multiplizität der Infektion mit *Plasmodium falciparum* und deren Bedeutung als immunologischer Parameter beim Kleinkind“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 26. Juli 2010

Ulrike C. Buchholz

7.3 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. F. P. Mockenhaupt danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für seine zuverlässige und kompetente Begleitung meiner Arbeit.

Frau Dipl. Ern.-Wiss. I. Danquah und Herrn Dr. rer. nat. E. Dietz danke ich für ihre freundliche und hilfreiche Unterstützung bei den statistischen Fragen.

Frau B. Jacob, Frau S. Röwer und Frau A. Tomschegg danke ich für die gute Einführung in die Laborarbeiten und die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. J. May und Herrn Dr. med. R. Kobbe am BNI Hamburg danke ich für die Kooperation bei der Erstellung der Datensätze.

Ich danke den Kindern aus Afigya Sekyere und Tamale sowie deren Eltern, die durch ihre Teilnahme die Studie ermöglicht haben.

Dr. med. D. Lange, Dr. med. D. McCluskey und Dr. med. P. McKeown danke ich für ihre Bestätigung und Begleitung auf meinem Weg, Ärztin zu werden. Den Ärzten K. Kikwaya und V. Mochache danke ich für den realistischen Einblick, den sie mir jeweils in die sogenannte Tropenmedizin gewährt haben. Dr. med. P. Chiliade danke ich ebenso wie Prof. Dr. med. M. Mathai für ihre eindrücklichen Lehren über Gesundheitspolitik.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihre Begleitung, vor allem in den letzten Monaten der Arbeit. Insbesondere danke ich meinen Eltern, Marie-Luise und Christian, die mir mein Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben, sowie meinen Geschwistern, Katrin und Thomas, für ihre Freundschaft und Unterstützung.

Mein größter Dank gilt Elisabeth und Florian für ihre unersetzliche Freundschaft an allen Tagen.

7.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.