

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studiengruppen

Im Studienzeitraum von August bis November 2002 konnten insgesamt 290 Kinder (155 Mädchen (53,4%), 135 Jungen (46,6%)) mit schwerer Malaria rekrutiert werden (Fallgruppe). Für diese Studienpopulation beträgt der Altersmedian 24 Monate. Dabei besitzt die Altersverteilung eine Spannweite (SW) von 6 bis 102 Monaten. Aufgrund des merkmalsbezogenen Matching (siehe Abschnitt 2.2.2, Seite 19) bei der Auswahl beider Kontrollgruppen sind alle Gruppen identisch hinsichtlich Geschlechter- und Altersklassenverteilung.

Bei der Betrachtung klinischer Parameter weist die Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 (Kinder mit asymptomatischer Parasitämie) eine wesentlich höhere Parasitendichte (GMPD) auf (29.512/ μ l; $p < < 0,0005$, siehe Tabelle 3.1). Der Mittelwert der Körpertemperatur (KT) und des Hämoglobinwertes (Hb) beträgt bei Kindern mit schwerer Malaria 38,6°C bzw. 4,9 g/dl.

	FG ($n=290$)	KG 1 ($n=290$)	KG 2 ($n=290$)
GMPD in $/\mu$ l [95% KI]; p-Wert	29.512 [21.904–39.763]; $<<0,0005$	1.732 [1.385–2.166]	–
KT (\pm SA) in °C	38,6°C ($\pm 1,1$)	– ^a	– ^a
Hb (SW) in g/dl	4,9 (1,5–13,4)	– ^b	– ^b

Tabelle 3.1: Charakterisierung der Studiengruppen.

FG = Fallgruppe, KG 1 = Kontrollen mit Parasitämie, KG 2 = Kontrollen ohne Parasitämie, GMPD = *Geometric mean parasite density*, KI = Konfidenzintervall, KT = Mittelwert der Körpertemperatur, SA = Standardabweichung, Hb = Mittelwert für Hämoglobin, SW = Spannweite, ^a = Einschlusskriterium: kein Fieber ($KT \leq 37,5^\circ\text{C}$), ^b = Einschlusskriterium: keine schwere Anämie ($\text{Hb} > 5 \text{ g/dl}$)

3.1.1 Klinische Manifestation der schweren Malaria

Im Rahmen der klinischen Untersuchung zur Diagnosestellung der schweren Malaria wurden die klinischen Definitionskriterien laut WHO Definition 2000 [15] für jeden Patienten der Fallgruppe erfasst. Dabei präsentieren 48% der Erkrankten ein einziges diagnosesicheres Kriterium, bei 52% der Kinder hingegen sind zwei, drei oder vier Kriterien erfüllt. Bei etwa einem Viertel der Kinder (26%) ist die schwere Anämie die einzige Manifestation einer schweren Malaria. Wie in Tabelle 3.2 gezeigt, manifestiert sich die schwere Malaria im Studiengebiet in über der Hälfte der Fälle als schwere Anämie (55%), gefolgt von Prostration (33%), Atemschwäche (23%), Multiple Anfällen (20%) sowie Bewusstseinsverlust (19%). Dabei zeigt die Häufigkeitsverteilung für das Auftreten einzelner dieser Symptome altersabhängige Trends. So präsentieren ältere Kinder seltener eine schwere Anämie als dia-

	Gesamt	Altersgruppen		
		< 2 Jahre	2–4 Jahre	> 4 Jahre
Anzahl	290	99	129	62
Diagnosekriterium				
Prostration	33,4 (97)	26,3 (26)	34,9 (45)	41,9 (26) ^{†*}
Bewusstseinsverlust	19,3 (56)	14,1 (14)	20,9 (27)	24,2 (15)
Atemschwäche	22,8 (66)	30,3 (30)	17,8 (23) [†]	21,0 (13)
Multiple Anfälle	20,3 (59)	17,2 (17)	20,9 (27)	24,2 (15)
Kreislaufkollaps	3,4 (10)	4,0 (4)	2,4 (3)	4,8 (3)
Lungenödem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Blutungsneigung	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gelbsucht	11,7 (34)	2,0 (2)	12,4 (16) [†]	25,8 (16) ^{†*}
Hämoglobinurie	2,8 (8)	(0) 0	3,1 (4)	6,5 (4) ^{†*}
Schwere Anämie	55,2 (160)	77,8 (77)	47,3 (61) [†]	35,8 (22) ^{†*}
klinische Kriterien				
zerebrale Malaria	16,9 (49)	11,1 (11)	19,4 (25)	21,0 (13)
Hyperparasitämie (>/250.000 μ l)	22,1 (64)	15,2 (15)	22,5 (29)	32,3 (20) ^{†*}
Hypoglykämie (<2,2mmol/l)	16,9 (49)	10,1 (10)	19,4 (25)	22,6 (14) ^{†*}
Hyperlaktatämie (\geq 5mmol/l)	39,3 (114)	42,4 (42)	32,6 (42)	48,4 (30)
Hyperpyrexie (>40°C)	8,1 (23)	8,2 (8)	9,6 (12)	4,9 (3)

Tabelle 3.2: Symptome und klinische Bedingungen der schweren Malaria.

Proportionalangaben in %, in Klammern absolute Anzahl. [†] = signifikanter Unterschied zu Altersgruppe < 2 Jahre (p < 0,05).

* = signifikanter Trend mit den Altersgruppen (χ^2_{trend} -Test, p < 0,05).

gnosesicherndes Kriterium als jüngere Patienten. Gegensätzliche Trends werden hingegen für die Kriterien Prostration, Gelbsucht und Hämoglobinurie beobachtet.

Von 285 Kindern, die über einen Zeitraum von 78 Stunden beobachtet wurden, endet die Erkrankung in 32 Fällen letal (11,2%). Die Anwendung der multiplen logistischen Regressionsanalyse ergibt vier unabhängige Prädilektionsfaktoren für den fatalen Ausgang einer schweren Malaria — Bewusstseinsverlust, Kreislaufkollaps, Hypoglykämie und Malnutrition (siehe Tabelle 3.3).

Für die ausführliche Darstellung und Diskussion der Untersuchungsergebnisse zur Manifestation und Verlauf der schweren Malaria wird auf den bereits veröffentlichten Artikel verwiesen [96].

	letal in %	Univariate Analyse	Multivariate Analyse	
		OR [95% KI]; p	a) OR [95% KI]; p	b) OR [95% KI]; p
Diagnosekriterium				
Prostration	8,2	0,6 [0,2–1,5]; 0,25	–	–
Bewusstseinsverlust	37,0	10,7 [4,5–25,9]; <0,0001	7,9 [3,0–20,8]; <0,0001	8,1 [3,1–21,1]; <0,0001
Atemschwäche	20,0	2,6 [1,2–6,1]; 0,01	1,2 [0,4–3,1]; 0,77	–
Multiple Anfälle	12,1	1,1 [0,4–2,9]; 0,82	–	–
Kreislaufkollaps	77,8	31,5 [6,1–354]; <0,0001	27,0 [4,0–183,4]; 0,0007	31,4 [4,7–207]; 0,0003
Gelbsucht	8,8	0,7 [0,1–2,6]; 0,78	–	–
Hämoglobinurie	12,5	1,1 [0,0–9,3]; 1,0	–	–
Schwere Anämie	10,1	0,8 [0,4–1,7]; 0,51	–	–
klinische Kriterien				
zerebrale Malaria	36,2	8,4 [3,6–20,1]; 0,0001	–*	–*
Hyperparasitämie	18,8	2,3 [1,0–5,4]; 0,03	0,9 [0,3–2,7]; 0,87	–
Hypoglykämie	35,4	8,1 [3,4–19,3]; <0,0001	2,5 [0,91–6,94]; 0,08	2,9 [1,1–7,7]; 0,03
Hyperlaktatämie	19,5	3,9 [1,7–9,3]; 0,0003	2,0 [0,8–5,1]; 0,16	–
Hyperpyrexie	4,3	0,4 [0,0–2,5]; 0,48	–	–
Malnutrition ^a	16,0	2,2 [1,0–5,1]; 0,03	2,7 [1,1–6,9]; 0,04	2,8 [1,1–7,0]; 0,03

Tabelle 3.3: Prädiktoren für Letalität bei Kindern mit schwerer Malaria.

Odds Ratio (OR) der Multivariaten Analyse sind nach Alter und Geschlecht angepasst. ^a = definiert als ein weight-for-age score (WAZ) <-2 basierend auf Referenzdaten des *National Center for Health Statistics* (Hyattsville, MD), * = Wurde statt dem weiter gefassten Symptom Bewusstseinsverlust die enger gefasste Diagnose zerebrale Malaria in das logistische Regressionsmodell gegeben, ergab sich für a) OR: 5,0; 95%KI: 2,1–14,5; p = 0,005 und b) OR: 5,4; 95%KI: 2,1–14,3; p = 0,0006.

3.2 Die SNPs, der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit und die schwere Malaria

3.2.1 Die SNPs *iNOS-954G*→*C* und *iNOS-1173C*→*T*

Die molekulargenetische Untersuchung der Blutproben ergibt in der Fallgruppe für den Polymorphismus *iNOS-954G*→*C* eine Allelfrequenz von 8,6%. In circa 83% der Fälle liegt der Wildtyp (G/G) vor. Etwa ein Sechstel der Kinder mit schwerer Malaria sind heterozygote Genträger (G/C), bei 2 Patienten (0,7%) hingegen liegt der Polymorphismus in homozygoter Form (C/C) vor (siehe Tabelle 3.4 a)).

a)

<i>iNOS-954</i>	FG		KG 1		KG 2		Odds Ratio [95% KI]; p-Wert	
	(n=290)		(n=290)		(n=290)		FG vs KG 1	FG vs KG 2
G/G	242	(83,4%)	238	(82,2%)	241	(83,1%)	– ^a	– ^a
G/C	46	(15,9%)	49	(16,9%)	46	(15,9%)	0,9 [0,6-1,4]; 0,7	1,0 [0,6-1,6]; 1,0
C/C	2	(0,7%)	3	(1,0%)	3	(1,0%)	0,7 [0,1-3,9]; 0,6	0,7 [0,1-4,0]; 0,7
Allelfrequenz	50	(8,6%)	55	(9,5%)	52	(9,0%)	0,9 [0,6-1,4]; 0,6	0,9 [0,6-1,4]; 0,8

b)

<i>iNOS-1173</i>	FG		KG 1		KG 2		Odds Ratio [95% KI]; p-Wert	
	(n=290)		(n=290)		(n=290)		FG vs KG 1	FG vs KG 2
C/C	260	(89,7%)	251	(86,6%)	265	(91,4%)	– ^a	– ^a
C/T	30	(10,3%)	39	(13,4%)	25	(4,3%)	0,7 [0,4-1,3]; 0,3	1,2 [0,7-2,2]; 0,5
T/T	0		0		0			
Allelfrequenz	30	(5,2%)	39	(6,7%)	25	(4,3%)	0,8 [0,5-1,3]; 0,3	1,2 [0,7-2,2]; 0,5

Tabelle 3.4: Genotyp- und Allelhäufigkeiten für a) *iNOS-954* b) und *iNOS-1173*.

FG = Fallgruppe, KG 1 = Kontrollen mit Parasitämie, KG 2 = Kontrollen ohne Parasitämie, KI = Konfidenzintervall, *iNOS-954G/G* = Wildtyp, *iNOS-954G/C* = Polymorphismus heterozygot, *iNOS-954C/C* = Polymorphismus homozygot, *iNOS-1173C/C* = Wildtyp, *iNOS-1173C/T* = Polymorphismus heterozygot, *iNOS-1173T/T* = Polymorphismus homozygot, ^a = Genotyphäufigkeit des Wildtyps (GG bzw. CC) diente als Referenzwert für die jeweilige Berechnung der Odds Ratio

Hinsichtlich des Polymorphismus *iNOS*-1173C→T beträgt die Allelfrequenz in der Fallgruppe 5,2%. Da in der Untersuchungsgruppe keine homozygoten Genträger (T/T) für *iNOS*-1173C→T identifiziert werden konnten, liegt die Häufigkeit der Heterozygoten bei der zweifachen Allelhäufigkeit (10,3%). Bei etwa neun von zehn Patienten liegt der Wildtyp (C/C) vor (siehe Tabelle 3.4 b), Seite 40).

Betrachtet man nun die gesamte Untersuchungspopulation (FG, KG 1, KG 2), befinden sich die Allele im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beschreibt eine Population bei der die Allelhäufigkeiten bei vollständiger und zufälliger Durchmischung (Panmixie) ohne Berücksichtigung von Selektion, Mutation und Migration konstant sind. Für *iNOS*-954G→C beträgt die errechnete Heterozygotenhäufigkeit 143 (142,83) Individuen, die errechnete Homozygotenhäufigkeit 7 (7,08) Individuen bei einer Gesamtrekrutierungszahl von 870 (drei Gruppen mit $n = 290$) und einer Allelfrequenz von 9%. Diese Werte stimmen weitestgehend mit den beobachteten Genotyphäufigkeiten überein (G/C: 141, C/C: 8). Dagegen ergibt die Berechnung der *Hardy-Weinberg-Gleichung* für den Polymorphismus *iNOS*-1173C→T bei gleicher Rekrutierungszahl und einer Allelfrequenz von 5% eine absolute Häufigkeit heterozygoter Genträger von 89 (88,92) sowie homozygoter Genträger von 2 (1,69). Tatsächlich hatten im Rahmen der Studie 94 Kinder den Genotyp C/T. Homozygote Genträger für *iNOS*-1173C→T (T/T) konnten nicht identifiziert werden.

Die Tabelle 3.4 (Seite 40) zeigt ebenfalls die Ergebnisse aus dem *4-Felder- χ^2 -Tests* bei dem Vergleich der Genotyp- und Allelhäufigkeiten beider SNPs der Fallgruppe mit den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe mit asymptomatischer Parasitämie (FG vs KG 1) sowie ohne Parasitämie (FG vs KG 2). Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Verteilung sowohl des *iNOS*-954G→C Polymorphismus als auch des *iNOS*-1173C→T Polymorphismus, das heißt es kann kein Schutz oder eine Risikosteigerung in Abhängigkeit von iNOS-Varianten hinsichtlich der Malaria beobachtet werden.

3.2.2 Der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit

Wie in Abbildung 3.1 gezeigt, weist der -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit im Untersuchungsgebiet von Tamale und Umgebung eine bimodale Verteilung von 6 bis 17 CCTTT-Kopien mit einem Tiefpunkt bei 11 Kopien auf. Weiterhin fallen beim Vergleich der Verteilung in den jeweiligen Studiengruppen (FG, KG 1, KG 2) keine nennenswerten Abweichungen auf.

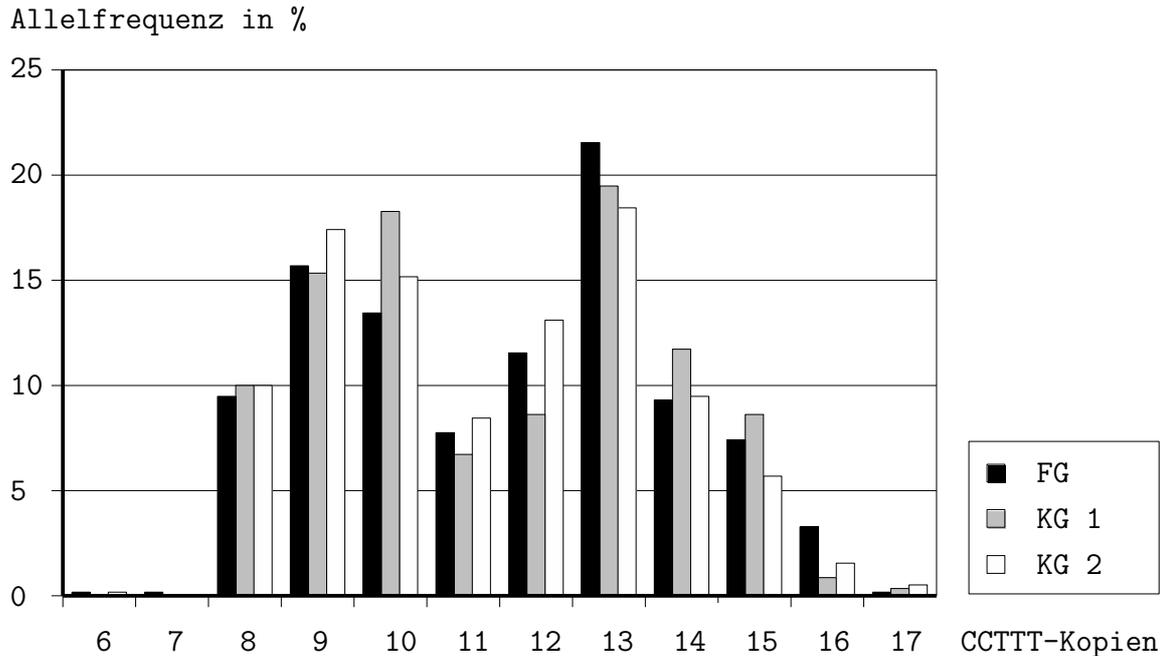


Abbildung 3.1: Verteilung der CCTTT-Kopienanzahl des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten. Histogramm der CCTTT_(n) Verteilung (580 Allele pro Studiengruppe): FG = Fallgruppe, KG 1 = Kontrollen mit Parasitämie, KG 2 = Kontrollen ohne Parasitämie

Lediglich CCTTT₍₁₆₎ tritt in der Fallgruppe signifikant häufiger auf ($p = 0,004$), während CCTTT₍₁₀₎ seltener als in der Kontrollgruppe mit Parasitämie zu finden ist ($p = 0,01$). Diese Unterschiede konnten hingegen bei einem Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Parasitämie nicht beobachtet werden ($p = 0,5$ bzw. $p = 0,4$ in Tabelle 3.5 a), Seite 43).

Um eine Aussage treffen zu können, inwieweit das Vorliegen von größeren bzw. kleineren CCTTT_(n)-Kopienallelen den Krankheitsverlauf der Malaria beeinflusst, wurden einzelne Gruppen gebildet (siehe Tabelle 3.5 b), Seite 43). Hier tauchen homozygot hohe Kopienzahlen von ≥ 13 Kopien in der Fallgruppe am häufigsten, weniger häufig bei parasitärischen Kontrollen und am seltensten bei Kindern ohne Parasitämie auf ($p_{trend} = 0,03$). Hinsichtlich kleiner Kopienzahlen des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten ($n < 11$) können keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen beobachtet werden.

a)

Anzahl MS Allelfrequenz	FG (n=290)	KG 1 (n=290)	KG 2 (n=290)	Odds Ratio [95% KI]; p-Wert	
				FG vs KG 1	FG vs KG 2
CCTTT ₍₆₎	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)	OR n.d.; 1,0	1,0 [0,01-78,8]; 1,0
CCTTT ₍₇₎	1 (0,2%)	0	0	OR n.d.; 1,0	OR n.d.; 1,0
CCTTT ₍₈₎	55 (9,5%)	58 (10,0%)	58 (10,0%)	0,9 [0,6-1,4]; 0,8	0,9 [0,6-1,4]; 0,8
CCTTT ₍₉₎	91 (15,7%)	89 (15,3%)	101 (17,4%)	1,0 [0,7-1,5]; 0,9	1,0 [0,6-1,2]; 0,4
CCTTT ₍₁₀₎	78 (13,4%)	106 (18,3%)	88 (15,2%)	0,6 [0,4-0,9]; 0,01	0,8 [0,6-1,2]; 0,4
CCTTT ₍₁₁₎	45 (7,8%)	39 (6,7%)	49 (8,4%)	1,2 [0,7-1,9]; 0,6	0,9 [0,6-1,4]; 0,7
CCTTT ₍₁₂₎	67 (11,6%)	50 (8,6%)	76 (13,1%)	1,4 [0,9-1,2]; 0,09	0,9 [0,6-1,3]; 0,4
CCTTT ₍₁₃₎	125 (21,6%)	113 (19,5%)	107 (18,4%)	1,1 [0,9-1,5]; 0,4	1,2 [0,9-1,6]; 0,2
CCTTT ₍₁₄₎	54 (9,3%)	68 (11,7%)	55 (9,5%)	0,8 [0,5-1,1]; 0,2	1,0 [0,6-1,5]; 1,0
CCTTT ₍₁₅₎	43 (7,4%)	50 (8,6%)	33 (5,7%)	0,8 [0,5-1,3]; 0,5	1,4 [0,8-2,3]; 0,3
CCTTT ₍₁₆₎	19 (6,6%)	5 (1,7%)	9 (3,1%)	4,0 [1,4-12,4]; 0,004	2,2 [0,9-5,3]; 0,5
CCTTT ₍₁₇₎	1 (0,2%)	2 (0,3%)	3 (0,5%)	0,5 [0,01-9,6]; 1,0	0,3 [0,01-4,2]; 0,6

b)

Anzahl MS CCTTT _(n)	FG (n=290)	KG 1 (n=290)	KG 2 (n=290)	Odds Ratio [95% KI]; p-Wert	
				FG vs KG 1	FG vs KG 2
$n < 11^\dagger$	47 (16,2%)	52 (17,9%)	53 (18,3%)	0,9 [0,6-1,4]; 0,6	0,9 [0,6-1,4]; 0,6
$n \geq 13^\dagger$	57* (9,8%)	49* (8,4%)	38* (6,6%)	1,2 [0,8-1,9]; 0,4	1,6 [1,0-2,6]; 0,03

Tabelle 3.5: Allelhäufigkeiten für a) die jeweiligen Kopienzahlen CCTTT_(n) und b) Genotyphäufigkeiten für Untergruppen mit bestimmten Kopienzahlen des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten b).

FG = Fallgruppe, KG 1 = Kontrollen mit Parasitämie, KG 2 = Kontrollen ohne Parasitämie, n. s. = nicht signifikant, KI = Konfidenzintervall, n.d. = nicht definiert, † = für beide Allele gilt jeweils diese Bedingung, * = $\chi^2_{trend} = 4,5$; p = 0,03

3.3 Identifizierung von *iNOS*-Haplotypen

Nach der Auswertung der Häufigkeitsverteilungen der drei untersuchten Polymorphismen wurden diese Varianten mit den Kopienanzahlen des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten in Beziehung gesetzt. Dabei fällt auf, dass mehr als 90% aller Kinder (FG: 90% (43/48), KG 1: 96% (50/52), KG 2: 94% (46/49)) mit dem Genotyp -954G→C (heterozygot bzw. homozygot) auf mindestens einem Allel genau 8 Mikrosatellitenkopien besitzen. Die Assoziation von *iNOS*-954G→C und CCTTT₍₈₎ wird ebenfalls aus der Abbildung 3.2a) ersichtlich, in der die Häufigkeitsverteilungen der Allele des Mikrosatelliten bezogen auf die Kinder mit -954G→C (Wildtyp für -1173C→T) für jede Studiengruppe getrennt dargestellt sind.

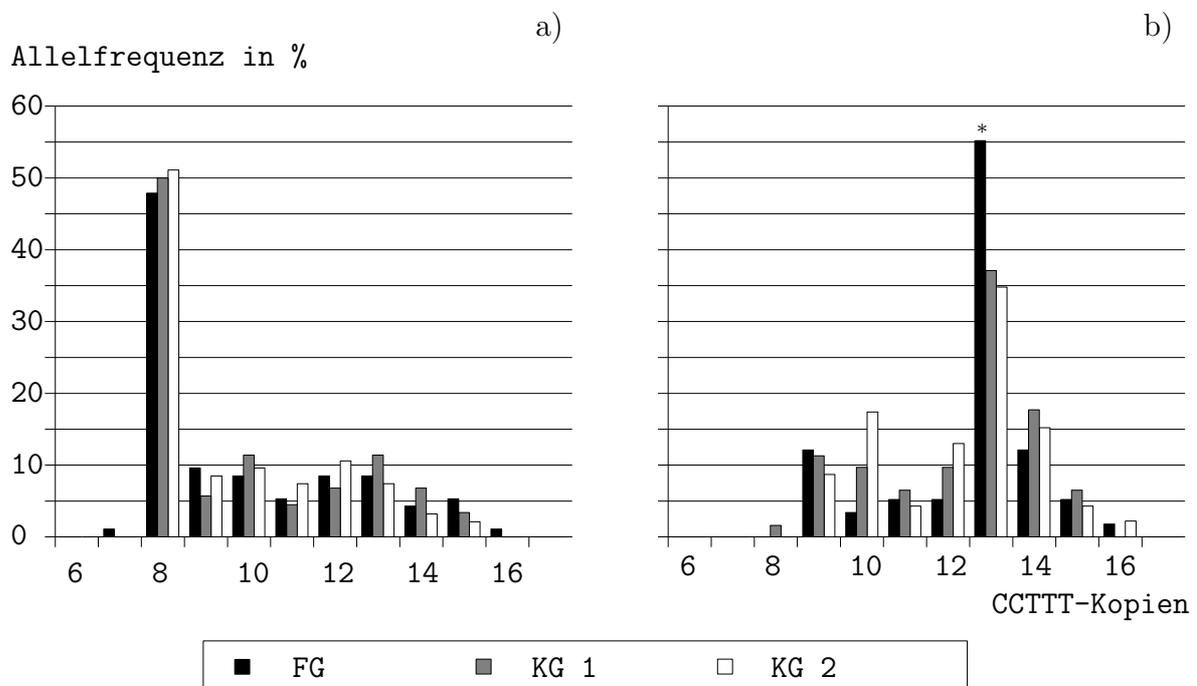


Abbildung 3.2: Verteilung der CCTTT-Kopienanzahl des -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatelliten für a) *iNOS*-954G→C und b) *iNOS*-1173C→T.

Histogramm der CCTTT_(n) Verteilung für -954G→C und -1173C→T: FG = Fallgruppe, KG 1 = Kontrollen mit Parasitämie, KG 2 = Kontrollen ohne Parasitämie, * = bei Probanden mit -1173C→T kommt CCTTT₍₁₃₎ verglichen mit KG 1 und KG 2 in der FG signifikant häufiger vor: $\chi^2_{trend} = 4,7$; $p_{trend} = 0,03$ (Referenz: Probanden mit -1173C→T/CCTTT_(≠13))

Analog zu $iNOS-954G \rightarrow C$ existiert auch für $iNOS-1173C \rightarrow T$ eine Assoziation mit einer bestimmten Kopienzahl n des Mikrosatelliten: in der Gruppe der Fälle mit schwerer Malaria zeigen 87% (FG: 26/30) der Allelträger für $-1173C \rightarrow T$ auf der Genregion des Mikrosatelliten 13 Kopien. Diese Kopplung beträgt in den beiden Kontrollgruppen lediglich 67% (KG 1: 26/39; $p = 0,06$ für FG vs KG 1) bzw. 68% (KG 2: 17/25; $p = 0,1$ für FG vs KG 2). Vergleicht man die Fallgruppe mit beiden Kontrollgruppen ist der Unterschied signifikant ($p = 0,046$ für FG vs KG 1+KG 2, $p_{trend} = 0,03$, siehe Abbildung 3.2b, Seite 44).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Allelen mit engen räumlichen Beziehungen wird mit dem Begriff Verteilungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium*) bezeichnet. Die zwei beobachteten Verteilungsungleichgewichte führen zu der Hypothese, dass sowohl für $iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$ als auch für $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$ Haplotypen existieren. Zusätzlich wird diese Annahme durch die Tatsache unterstützt, dass 7 von 10 Kindern, die heterozygote Genträger für $iNOS-954G \rightarrow C$ sowie für $iNOS-1173C \rightarrow T$ sind, einen entsprechenden Genotyp für den Mikrosatelliten präsentieren: $CCTTT_{(8)}/CCTTT_{(13)}$.

3.4 Haplotypen und die schwere Malaria

Ausgehend von der Hypothese der Existenz von Haplotypen (siehe Abschnitt 3.3) wurden die entsprechenden Genotypen $iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$ sowie $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$ auf ihren Einfluss auf die Malaria hin geprüft (siehe Tabelle 3.6).

Haplotypen ^a	FG	KG 1	KG 2	Odds Ratio [95% KI]; p-Wert	
	($n=290$)	($n=290$)	($n=290$)	FG vs KG 1	FG vs KG 2
$-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$	43 (14,8%)	50 (17,2%)	46 (15,9%)	0,7 [0,5-1,3]; 0,5	1,0 [0,6-1,5]; 0,8
$-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$	26 (9,0%)	26 (9,0%)	17 (5,9%)	1,0 [0,6-1,8]; 1,0	1,6 [0,8-3,0]; 0,2

Tabelle 3.6: Genotyphäufigkeiten für die Haplotypen $iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$ und $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$.

FG = Fallgruppe, KG 1 = Kontrollen mit Parasitämie, KG 2 = Kontrollen ohne Parasitämie, KI = Konfidenzintervall, ^a = Bedingung: Homozygotie oder Heterozygotie für beide Polymorphismen

Dabei ist bei dem Vergleich der Genotypfrequenzen weder für $iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$ noch für $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$ ein signifikanter Unterschied zwischen Fallgruppe und Kontrollgruppen nachweisbar. Wie bereits in Abbildung 3.2b) (Seite 44) gezeigt, existiert für die Kinder mit $-1173C \rightarrow T$ ohne Parasitämie (KG 2) über eine asymptomatische Parasitämie (KG 1) bis hin zur schweren Malaria (FG) ein steigender Trend auch ein Allel für 13 CCTTT-Kopien zu besitzen ($p = 0,03$). Dieser ist jedoch nicht durch Haplotypen bedingt, sondern wird aufgrund des gesteigerten Einfluss homozygoter Genträger für $CCTTT_{(13)}$ bei der Betrachtung von Allelfrequenzen (statt Genotypen) erklärt. Erwartungsgemäß existiert in den Untersuchungsgruppen auch ein entsprechender Trend für den $-2,5$ kb $CCTTT_{(n)}$ Mikrosatelliten auf beiden Allelen 13 Kopien — d. h. Homozygotie — zu präsentieren (KG 2: (0/23), KG 1: 3/31), FG: (7/29), $\chi^2_{trend} = 6,4$; $p = 0,01$).

3.5 Polymorphismen bzw. Haplotyten und klinische Manifestation der schweren Malaria

Schließlich wurden sowohl die einzelnen Polymorphismen $iNOS-954G \rightarrow C$, $iNOS-1173C \rightarrow T$, -2,5 kb CCTTT_(n) Mikrosatellit als auch die Haplotyten $iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$ und $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$ auf ihren Einfluß auf den Verlauf innerhalb der Gruppe schwere Malaria untersucht. Dabei wurden als Parameter zum einen die definierenden Kriterien (Prostration, Bewusstseinsverlust, Atemschwäche, Multiple Anfälle, Kreislaufkollaps, Gelbsucht, Hämoglobinurie, Schwere Anämie), zum anderen weitere klinische Bedingungen (zerebrale Malaria, Hyperparasitämie, Hypoglykämie, Hyperlaktatämie, Hyperpyrexie) sowie die Letalität gewählt. Die Verteilung dieser Parameter in den Untergruppen der Probanden mit schwerer Malaria ist in Tabelle 3.8 (Seite 48) dargestellt. Im Folgenden werden vorrangig die signifikanten Assoziationen zwischen $iNOS$ -Promotorvarianten und Verlaufsparemtern vorgestellt.

Hinsichtlich des Kriteriums Hyperparasitämie fand sich in der Fallgruppe (FG) lediglich der Haplotyp $iNOS-954G \rightarrow C/CCTTT_{(8)}$ als signifikant seltener (Odds Ratio: 0,18; 95% Konfidenzintervall: 0,04–0,8; $p = 0,03$)

Die Letalität in der Fallgruppe mit verschiedenen $iNOS$ -Konstellationen ist in Tabelle 3.7 aufgeführt.

<i>iNOS</i>-Variante Häufigkeit in % (absolut)	Bezugsgruppe Häufigkeit in % (absolut)	Signifikanz
<i>iNOS-1173C</i>→T 17,2% (5/29)	Wildtyp 10,5% (27/256)	$p = 0,3$
CCTTT_(13;13), CCTTT_(13;≠13) Homozygote und Heterozygote 18,2% (2/11), 12,1% (12/99)	CCTTT_(≠13;≠13) 10,3% (18/175)	$p = 0,7$
<i>iNOS-1173C</i>→T/CCTTT₍₁₃₎ 20,8% (5/24)	übrige Fälle 10,3% (27/261)	$p = 0,1$

Tabelle 3.7: Sterberaten für ausgewählte $iNOS$ -Genotypen in der Fallgruppe.

SNPs	-954G→C				-1173C→T			
	G/G	G/C	C/C	AF	C/C	C/T	T/T	AF
Gesamt (<i>n</i> =290)	242	46	2	8,6	260	30	0	5,2
Untergruppen mit Diagnosekriterien:								
Prostration (<i>n</i> =97)	81	15	1	8,8	88	11	0	5,7
Bewusstseinsverlust (<i>n</i> =56)	45	11	0	9,8	52	4	0	3,6
Atemschwäche (<i>n</i> =66)	56	10	0	7,6	57	9	0	6,8
Multiple Anfälle (<i>n</i> =59)	52	7	0	5,9	53	6	0	5,1
Kreislaufkollaps (<i>n</i> =10)	6	4	0	20,0	10	0	0	0,0
Gelbsucht (<i>n</i> =34)	28	5	1	10,3	32	2	0	2,9
Hämoglobinurie (<i>n</i> =8)	6	2	0	12,5	7	1	0	6,3
Schwere Anämie (<i>n</i> =160)	133	26	1	8,8	147	13	0	4,1
Untergruppen mit anderen klin. Bedingungen:								
zerebrale Malaria (<i>n</i> =49)	40	9	0	9,2	45	4	0	4,1
Hyperparasitämie (<i>n</i> =64)	59	4	1	4,7	58	6	0	4,7
Hypoglykämie (<i>n</i> =49)	40	8	1	10,2	48	1	0	1,0
Hyperlaktatämie (<i>n</i> =114)	93	20	1	9,6	103	11	0	4,8
Hyperpyrexie (<i>n</i> =23)	20	3	0	6,5	22	1	0	2,2
Letalität (<i>n</i> =32)	24	8	0	12,5	27	5	0	7,8
Mikrosatellit								
	CCTTT₍₈₎				CCTTT₍₁₃₎			
	x/x	x/8	8/8	AF	y/y	y/13	13/13	AF
Gesamt (<i>n</i> =290)	238	49	3	9,5	178	99	13	21,6
Untergruppen mit Diagnosekriterien:								
Prostration (<i>n</i> =97)	79	16	2	10,3	63	34	6	23,7
Bewusstseinsverlust (<i>n</i> =56)	45	11	0	9,8	41	15	0	13,4
Atemschwäche (<i>n</i> =66)	54	12	0	9,1	48	18	7	24,2
Multiple Anfälle (<i>n</i> =59)	48	11	0	9,3	38	21	2	21,2
Kreislaufkollaps (<i>n</i> =10)	5	5	0	25,0	6	4	0	20,0
Gelbsucht (<i>n</i> =34)	27	6	1	11,8	22	12	0	17,6
Hämoglobinurie (<i>n</i> =8)	6	2	0	12,5	3	5	0	31,3
Schwere Anämie (<i>n</i> =160)	132	27	1	9,1	103	49	8	20,3
Untergruppen mit anderen klin. Bedingungen:								
zerebrale Malaria (<i>n</i> =49)	40	9	0	9,2	36	13	0	13,3
Hyperparasitämie (<i>n</i> =64)	55	8	1	7,8	38	24	2	21,9
Hypoglykämie (<i>n</i> =49)	39	8	2	12,2	32	16	1	18,4
Hyperlaktatämie (<i>n</i> =114)	91	22	1	10,5	69	41	4	21,5
Hyperpyrexie (<i>n</i> =23)	19	4	0	8,7	18	5	0	10,9
Letalität (<i>n</i> =32)	18	12	2	25,0	18	12	2	25,0
Haplotypen								
	-954G→C/CCTTT₍₈₎			-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎				
	wt/wt	wt/ht	ht/ht	wt/wt	wt/ht	ht/ht		
Gesamt (<i>n</i> =290)	247	41	2	264	26	0		
Untergruppen mit Diagnosekriterien:								
Prostration (<i>n</i> =97)	83	13	1	88	9	0		
Bewusstseinsverlust (<i>n</i> =56)	47	9	0	52	4	0		
Atemschwäche (<i>n</i> =66)	57	9	0	57	9	0		
Multiple Anfälle (<i>n</i> =59)	52	7	0	54	5	0		
Kreislaufkollaps (<i>n</i> =10)	7	3	0	10	0	0		
Gelbsucht (<i>n</i> =34)	27	6	1	33	1	0		
Hämoglobinurie (<i>n</i> =8)	6	2	0	7	1	0		
Schwere Anämie (<i>n</i> =160)	135	24	1	149	11	0		
Untergruppen mit anderen klin. Bedingungen:								
zerebrale Malaria (<i>n</i> =49)	42	7	0	45	4	0		
Hyperparasitämie (<i>n</i> =64)	60	3	1	59	5	0		
Hypoglykämie (<i>n</i> =49)	42	6	1	48	1	0		
Hyperlaktatämie (<i>n</i> =114)	95	18	1	104	10	0		
Hyperpyrexie (<i>n</i> =23)	20	3	0	22	1	0		
Letalität (<i>n</i> =32)	27	5	0	27	5	0		

Tabelle 3.8: Symptome und klinische Bedingungen der schweren Malaria für verschiedene genetische Variationen in der *iNOS*-Promotorregion.

Die Tabelle zeigt die Symptomverteilungen für die beiden SNPs *iNOS*-954G→C und *iNOS*-1173C→T, für CCTTT₍₈₎ und CCTTT₍₁₃₎ sowie für die Haplotypen *iNOS*-954G→C/CCTTT₍₈₎ und *iNOS*-1173C→T/CCTTT₍₁₃₎. AF = Allelfrequenz in Prozent, x = beliebige Anzahl an CCTTT-Mikrosatellitenkopien außer 8, y außer 13, wt = Wildtyp, ht = Haplotyp

Weiterhin wurden die erhobenen Daten unter Berücksichtigung der bereits ermittelten unabhängigen Risikofaktoren für den fatalen Ausgang einer schweren Malaria (Bewusstseinsverlust, Kreislaufkollaps, Hypoglykämie, Malnutrition [96], siehe Abschnitt 3.1.1, Seite 38) auf eine Assoziation zwischen den jeweiligen Genotypen und der Malaria-bedingten Letalität hin geprüft (siehe Tabelle 3.9). So zeigte sich erst nach multivariater Adjustierung für diese Prädiktoren ein 6-fach erhöhtes bei Vorliegen des Haplotyps $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$.

	letal in %	Univariate Analyse OR [95% KI]; p-Wert	Multivariate Analyse OR [95% KI]; p-Wert
Risikofaktoren			
Bewusstseinsverlust			
nicht vorhanden	5,5	1	1
vorhanden	37,0	10,7 [4,5–25,9]; <0,0001	8,6 [3,2–23,2]; < 0,0001
Kreislaufkollaps			
nicht vorhanden	9,1	1	1
vorhanden	77,8	31,5 [6,1–354]; <0,0001	35,8 [5,4–237,2]; 0,0002
Hypoglykämie			
nicht vorhanden	6,3	1	1
vorhanden	35,4	8,1 [3,4–19,3]; <0,0001	3,7 [1,3–10,5]; 0,01
Malnutrition			
nicht vorhanden	7,8	1	1
vorhanden	16,0	2,2 [1,0–5,1]; 0,03	2,8 [1,1–7,0]; 0,03
$iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$			
nicht vorhanden	10,3	1	1
vorhanden	20,8	2,3 [0,6–7,0]; 0,17	6,1 [1,6–24,1]; 0,009

Tabelle 3.9: Logistische Regressionsanalyse für Letalitätsprädiktoren und den Haplotyp $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$.

Ergebnisse aus der logistischen Regressionsanalyse für $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$: Risiken nehmen auf die Referenz aller Genotypen $\neq iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$ Bezug. Odds Ratio (OR) der Multivariaten Analyse sind nach Alter und Geschlecht angepasst. KI = Konfidenzintervall

Wie der Haplotyp $iNOS-1173C \rightarrow T/CCTTT_{(13)}$ geht auch der *SNP* $iNOS-1173C \rightarrow T$ allein mit einem erhöhtem Risiko für den tödlichen Ausgang einer schweren Malaria einher (OR: 4,8; 95% KI: 1,3–17,8; $p = 0,02$). Für homozygote Genträger $CCTTT_{(13)}$ ist dieses Risiko etwa 8-fach höher als das der Referenzgruppe (OR: 8,0; 95% KI: 1,3–49,8; $p = 0,03$), hingegen zeigt die logistische Regression diese Assoziation für heterozygote Genträger des $CCTTT_{(13)}$ -Kopienallels nicht (OR: 1,6; 95% KI: 0,6–4,2; $p = 0,4$).