

2 Probanden, Material und Methoden

Die Studie wurde in Kooperation mit dem Ministry of Health (MOH), der School of Medicine and Health Science in Tamale, dem Tamale Teaching Hospital, der Regional Health Administration Tamale, dem Bulpeila Health Centre in Tamale sowie dem Institut für Tropenmedizin Berlin durchgeführt.

Die Studienprotokolle wurden von der Ethikkommission der Regional Health Administration in Tamale (Ghana), der Health Research Unit des Ministry of Health in Accra (Ghana) sowie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin geprüft und genehmigt. Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war ein schriftliches Einverständnis der Eltern bzw. Erziehungsberechtigten.

Unter Anleitung und Kontrolle der Verfasserin der vorliegenden Arbeit wurden von ghanaischen Mitarbeitern die 1.100 Kinder der Querschnittstudie (hier: Kontrollgruppe) untersucht. Es wurden soziodemographische Daten, Größe und Gewicht der Kinder dokumentiert, eine Blutentnahme durchgeführt, die Temperatur gemessen und die Milzgröße palpatorisch bestimmt. Folgende Untersuchungen wurden von der Verfasserin selbstständig durchgeführt: die Anfertigung von je zwei mikroskopischen Präparaten, die Ermittlung der Parasitendichte, die Erfassung der Hämoglobinkonzentration, die Aufbereitung der Blutproben für spätere molekularbiologische Untersuchungen (DNA-Stabilisierung), der Nachweis der einzelnen Plasmodienpezies (*P. falciparum*; *P. malariae* und *P. ovale*) mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die anschließende elektrophoretische Auftrennung der speziesspezifischen Amplifikationsprodukte sowie die Darstellung unter UV-Licht und die photographische Dokumentation. Der β -Globingenotyp wurde mittels PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) von der Verfasserin für 500 Kinder bestimmt. Die Ergebnisse der β -Globingenotypanalyse der übrigen 598 Probanden wurden der Verfasserin von den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Tropenmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

Folgende Untersuchungsergebnisse der Patientengruppe wurden der Verfasserin von den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Tropenmedizin Berlin zur Verfügung gestellt: soziodemographische Daten, die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen und Laborparameter zu komplizierter Malaria, die ermittelten Parasitendichten sowie die Ergebnisse der β -Globingenotypanalyse.

2.1 Studiendesign, Studiengebiet und Studienpopulation

Der Einfluss der β -Globingenotypen auf die Infektion mit verschiedenen Plasmodienspezies, auf verschiedene Manifestationen einer *P. falciparum*-Malaria und auf die Ausprägung klinischer Symptome wurden in einer Querschnittstudie mit 1.100 Kindern untersucht. Diese Kinder fungierten zusätzlich als Kontrollgruppe für eine Fall-Kontrollstudie zu komplizierter Malaria. Für diese Studie wurden weitere 290 Kinder mit komplizierter Malaria als Patientengruppe rekrutiert.

Das Studiengebiet der „Northern Region“ Ghanas ist durch Savannenlandschaft geprägt. Das Klima ist tropisch mit einer Trockenzeit (Oktober – März) und einer Regenzeit (April-September). In der Regenzeit beträgt die Niederschlagsmenge 800 – 900 mm pro Jahr, während sie in der Trockenzeit auf etwa 50 mm pro Jahr sinkt (Koram *et al.*, 2000). Die Region gehört zu den hyperendemischen Malariagebieten, in der Malaria ganzjährig übertragen wird und für die Plasmodienspezies (*P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae*) hohe Infektionsprävalenzen vorliegen (Binka *et al.*, 1994; Mockenhaupt *et al.*, 2001). Die Inzidenz einer unkomplizierten Malaria bei Kindern unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen. In Nordghana wurde in der Trockenzeit für *P. falciparum* eine Inzidenz von 4-5 Malariaattacken und in der Regenzeit von 7 Malariaattacken pro Person im Jahr beschrieben (Baird *et al.*, 2002).

Ghana und die „Upper Volta Region“ werden seit langem als Ursprungsregionen von Hämoglobin C angesehen (Livingstone 1976). 20-30 % der Bevölkerung dieser Gebiete sind Merkmalsträger von HbS und/oder HbC (Koram *et al.*, 2000). Mit 1,8 Millionen Einwohnern (Zensus 2000) leben etwa 10% der Bevölkerung Ghanas in der „Northern Region“. Die meisten Bewohner gehören dem Stamm der Moschi-Dagomba und dem Stamm der Gonja an. Die regionale Hauptstadt ist Tamale, eine Stadt mit ca. 350.000 Einwohnern. Das Tamale Teaching Hospital ist als wichtigstes medizinisches Versorgungszentrum für die Bevölkerung der „Northern Region“ zuständig.

2.2 Rekrutierung der Studienpopulation „Northern Region“

Es wurden 1.100 Kinder im Alter zwischen 6 Monaten und 9 Jahren aus 17 verschiedenen Dorfgemeinschaften der Provinzen Tamale (Population: 300.000), Savelugu-Nanton (Pop.: 91.000), Tolon-Kumbungu (Pop.: 135.000), Yendi (Pop.: 133.000), East Gonja (Pop.: 176.000) und West Gonja (Pop.: 141.000) rekrutiert. Die Rekrutierung fand in der Trockenzeit (Anfang Februar bis Mitte März 2002) statt. Alle 17 Dorfgemeinschaften zählen zum Einzugsbereich des Tamale Teaching Hospital. Die Auswahl der Kinder erfolgte

clusterrandomisiert in zwei Schritten („two stage cluster sampling“) unter Einbeziehung der Populationsgröße (Bevölkerungszensus Ghana 2000). Als ein Cluster wurde die Population einer Dorfgemeinschaft definiert. Unter Verwendung einer Liste, in der sämtliche Dorfgemeinschaften des Studiengebietes erfasst waren, wurden mehrere Dorfgemeinschaften in Studienbezirken zusammengefasst. Dörfer, die aufgrund einer mangelhaften Infrastruktur mit dem Fahrzeug nicht erreicht werden konnten, wurden aus dem Stichprobenrahmen ausgeschlossen. In einem ersten Schritt wurden Dorfgemeinschaften, unter Beachtung der geschätzten Population des Studienbezirks, zufällig ausgewählt. In einem zweiten Schritt wurden die einzelnen Haushalte aus den zuvor ausgewählten Dorfgemeinschaften rekrutiert. Die Auswahl des ersten Haushalt erfolgte, indem in der Mitte des Dorfes eine Glasflasche gedreht wurde. Es wurde mit dem Haushalt begonnen, auf den die Flaschenspitze direkt zeigte und der dieser am nächsten lag. Entlang dieser Koordinaten wurde jeder zweite Haushalt erfasst und alle Kinder im Alter von 6 Monaten bis 9 Jahren rekrutiert, bis die erforderliche Gruppengröße von 60-70 Kindern je Dorfgemeinschaft erreicht war. Haushalte, in denen die Kinder zum Zeitpunkt der Rekrutierung nicht anwesend waren, wurden übersprungen. Eine spätere Rekrutierung erfolgte aus logistischen Gründen nicht.

Die ausgewählten Kinder wurde in vier Gruppen unterteilt:

- I. Keine Infektion: kein Nachweis von Plasmodien
- II. Submikroskopische Infektion: kein mikroskopischer Nachweis einer asexuellen Parasitämie, jedoch Nachweis parasitärer DNA durch die PCR
- III. Asymptomatische Infektion: mikroskopischer Nachweis einer asexuellen Parasitämie sowie Nachweis parasitärer DNA durch die PCR ohne Fieber
- IV. Unkomplizierte Malaria: mikroskopischer Nachweis einer asexuellen Parasitämie, Nachweis parasitärer DNA durch die PCR sowie Fieber (Temp. > 37,4°)

2.3 Rekrutierung der Patientengruppe

Die Rekrutierung der Kinder mit komplizierter Malaria fand in der Regenzeit (August bis November 2002) im Tamale Teaching Hospital statt. Insgesamt wurden 290 Kinder mit komplizierter Malaria im Alter von 6 Monaten bis zu 9 Jahren in die Studiengruppe aufgenommen.

Einschlusskriterien

- Kriterien einer komplizierten Malaria (WHO 2000), d.h. das Vorliegen einer asexuellen *P. falciparum*-Parasitämie mit mindestens einem der folgenden Symptome:
 - a) Prostration (Verschlechterung des Allgemeinzustandes)
 - b) schwere Anämie (Hb < 5 g/dl)
 - c) nicht erweckbares Koma (*Blantyre Coma Score*)
 - d) wiederholte generalisierte Konvulsionen (≥ 2 Episoden innerhalb von 24 Stunden)
 - e) Herz-Kreislaufversagen/Schock
 - f) Lungenödem
 - g) spontane Blutungen
 - h) Ikterus
 - i) Nierenversagen mit Oligo- oder Anurie
 - j) Respiratorische Insuffizienz
 - k) Hämoglobinurie

Ausschlusskriterien

- Bluttransfusion innerhalb der letzten 3 Monate
- Kinder mit Begleiterkrankungen wie Typhus, Pneumonie oder bakterieller Meningitis

2.4 Datenerhebung und klinische Untersuchungen

Für jedes Kind wurde in beiden Studiengruppen ein Dokumentationsblatt ausgefüllt. Neben soziodemographischen Daten wurden Größe, Gewicht und, bei erfolgter Bluttransfusion, das Transfusionsdatum dokumentiert. Eine allgemeine Anamnese unter besonderer Berücksichtigung von Fieber wurde erhoben. Die Temperatur wurde mit einem elektronischen Thermometer axillär gemessen. Fieber wurde als eine Temperaturerhöhung $> 37,4^{\circ}\text{C}$ definiert (WHO 2000).

In der Patientengruppe wurden zusätzlich Herzfrequenz (HF/min), Blutdruck (RR systolisch/diastolisch in mm/Hg) und Atemfrequenz (AF/min) bestimmt und dokumentiert. Jedes Kind wurde auf typisch klinische Symptome einer komplizierten Malaria untersucht. Entsprechende Befunde wurden dokumentiert.

Prostration wird definiert als die Unfähigkeit des Kindes, frei zu sitzen (für Säuglinge, die Unfähigkeit, Nahrung aufzunehmen), obwohl es normalerweise dazu in der Lage ist.

Die Tiefe eines komatösen Zustandes wurde mit Hilfe des „Blantyre Coma Score“ bestimmt (Molyneux *et al.*, 1989). In diesem Schema werden Reaktionen auf Ansprechen bzw. auf Schmerzreize in einer Punkteskala erfasst. Anhand dieser Skala werden auftretende Vigilanzstörungen in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt (Tab. 1). Definierendes Symptom einer zerebralen Malaria war ein komatöser Zustand mit einem Gesamtwert ≤ 4 (WHO 2000).

Tabelle 1: Skala nach Blantyre (Molyneux *et al.*, 1989)^A

		Score ^B
motorische Reaktion	lokalisiert Schmerzreize	2
	gezielte Abwehrreaktion auf Schmerzreize ^C	1
	ungezielte Abwehrreaktion oder keine Reaktion auf Schmerzreize ^D	0
verbale Reaktion	adäquates Weinen	2
	wimmern oder inadäquates Weinen	1
	keine Reaktion	0
Augenbewegungen	gerichtet (folgt z.B. einem sich bewegenden Objekt)	1
	ungerichtet	0

^A Die Blantyre coma scale (Molyneux *et al.*, 1989) wurde anhand der Glasgow coma scale (Teasdale & Jennett 1974) modifiziert, um auch bei Kindern angewendet werden zu können, die noch nicht die Fähigkeit entwickelt haben zu sprechen. ^B Der Gesamtscore setzt sich aus der Summe der einzelnen Punktwerte der drei Kategorien zusammen und kann zwischen 0 bis 5 liegen. Ein Score ≤ 2 definiert ein nicht erweckbares Koma. ^C schmerzhafter Stimulus: Reiben der Fingerknöchel über dem Sternum des Patienten; ^D schmerzhafter Stimulus: Druck auf das Nagelbett mit einem horizontal gehalten Kugelschreiber oder Bleistift

Wiederholte generalisierte Konvulsionen lagen bei mehr als zwei Krampfanfällen innerhalb von 24 Stunden vor, wobei zumindest eine von medizinischen Personal beobachtet sein musste. Als Herz-Kreislaufversagen wurde ein Hypotonus (Kinder < 5 Jahre: systolischer Blutdruck < 60 mmHg; Kinder ≥ 5 Jahre systolischer Blutdruck < 80 mmHg) sowie eine Zentralisation des Kreislaufs (kalte Akren und schwache bzw. nicht palpable periphere Pulse) definiert. Ein Lungenödem musste durch ein Röntgenbild bestätigt werden, um als alleiniges Kriterium für eine Rekrutierung zu gelten. Eine respiratorische Insuffizienz lag bei Dyspnoe mit Nasenflügelatmung, thorakalen, jugulären oder epigastrischen Einziehungen bzw. Kussmaul'scher Atmung vor. Als spontane Blutungen galten Blutungen der Schleimhäute, aus dem Gastrointestinaltrakt sowie eine verlängerte Blutung an Venenpunktionsstellen. Kriterien für einen Ikterus waren eine Gelbfärbung der Konjunktiven, der Haut und der Schleimhäute. Oligurie (< 500 ml Urin/d) oder Anurie (< 200 ml Urin/d) wurden als Kriterium für ein akutes Nierenversagen verwendet. Alle Kinder, die an einer unkomplizierten oder komplizierten Malaria erkrankt waren, wurden nach den Richtlinien der WHO mit Artesunate rektal oder oral

(Plasmotrim®; Mepha Pharma) therapiert und supportiv nach Bedarf rehydriert, mit Glukose per os/i.v., Diazepam, Bluttransfusionen etc. behandelt (WHO 2000).

Die Milzgröße wurde palpatorisch bestimmt. Zur Bestimmung des Grades einer Milzvergrößerung wurde die Einteilung nach Hackett angewendet (Gilles & Warrell 1993). Ein Wert ≥ 2 wurde als Splenomegalie definiert.

Tabelle 2: Klassifikation der Milzgröße nach der Methode von Hackett (Gilles & Warrell 1993)

Grad	Beschreibung
0	- normal große Milz, auch unter tiefer Inspiration nicht palpabel
1	- unter tiefer Inspiration ist die Milz am unteren Rippenbogenrand palpabel
2	- die Milz ist auch ohne tiefe Inspiration am unteren Rippenbogenrand palpabel; projiziert sich jedoch nicht unterhalb einer horizontalen Linie, die in der Mitte zwischen unterem Rippenbogenrand und Umbilicus verläuft; die vertikale Messlinie verläuft nach unten, von der linken Mamille ausgehend
3	- der tiefstgelegene Punkt der Milzpalpation liegt unterhalb der horizontalen Linie, die in der Mitte zwischen Rippenbogenrand und Umbilicus verläuft; jedoch nicht unterhalb einer horizontalen Umbilicallinie
4	- der tiefstgelegene Punkt der Milzpalpation liegt unterhalb der horizontalen Umbilicallinie, jedoch nicht unterhalb einer horizontalen Linie, die in der Mitte zwischen Umbilicus und Symphyse verläuft
5	- der tiefstgelegene Punkt der Milzpalpation liegt unterhalb einer horizontalen Linie, die in der Mitte zwischen Umbilicus und Symphyse verläuft

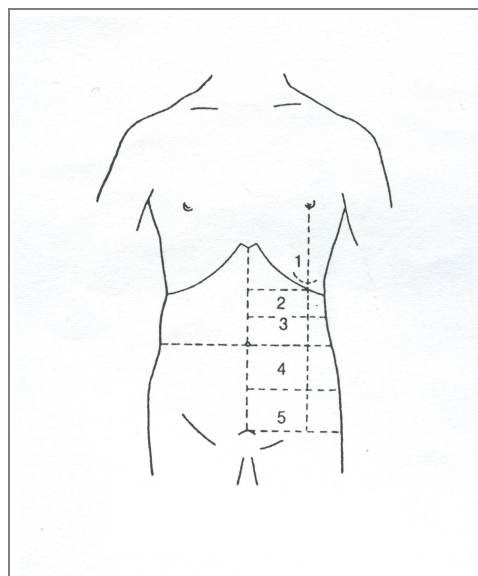


Abbildung 2: Klassifikation der Milzgröße nach der Methode von Hackett (Gilles & Warrell 1993); topographische Referenzlinien der 5 Klassifizierungen einer vergrößerten Milz

2.5 Gewinnung, Lagerung, Aufbereitung und Transport der Blutproben

Jedem Kind wurden 2,7 ml Blut aus der Vena cubitalis entnommen und in EDTA-Röhrchen (S-Monovette® Kalium-EDTA, Sarstedt) gefüllt. Die Blutproben der Kontrollgruppe wurden in Kühlbehältern im Feld maximal 10 Stunden zwischengelagert und dann weiterverarbeitet. Die Blutproben der Patientengruppe wurden ohne Zwischenlagerung sofort untersucht und weiter aufbereitet. Für spätere molekularbiologische Untersuchungen wurde ein Teil des EDTA-Blutes stabilisiert. Je 90 µl Blutsediment wurden zusammen mit 90 µl PBS-Puffer (Phosphat buffered saline) und 180 µl AS-Puffer (DNA-stabilisierender Puffer auf der Basis von Guanidiumhydrochlorid) in Eppendorfröhrchen pipettiert. Derart aufbereitete Proben können ohne Kühlung bis zu drei Monaten gelagert werden. Der Transport von Ghana nach Berlin erfolgte in Kühlbehältern, die Kühlkette wurde während des Transportes nicht unterbrochen.

2.6 Mikroskopische Untersuchungen

Die Parasitendichte wurde mikroskopisch über die Methode des Dicken Tropfens bestimmt. Für jedes Kind wurden zwei mikroskopische Präparate angefertigt. Das erste Präparat (Diagnose einer unkomplizierten oder komplizierten Malaria zum Untersuchungszeitpunkt) wurde mittels Schnellfärbemethode angefertigt und zur Berechnung der groben Parasitendichte verwendet. Das zweite Präparat wurde standardisiert gefärbt.

5 µl EDTA-Blut wurden auf einem Objektträger gleichmäßig verteilt und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Präparate unfixiert in 10% Giemsa (Merck) in Titrisol-Pufferlösung [Titrisol® Pufferlösung nach Weise (Merck), pH 7,2] für 10 min (Schnellfärbemethode) bzw. in 5% Giemsa in Titrisol-Pufferlösung (pH 7,2) für 30 min (Standardmethode) gefärbt, abschließend mit Titrisol-Pufferlösung (pH 7,2) gespült und erneut luftgetrocknet.

Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss) unter einem Ölimmersionsobjektiv mit 1000-facher Vergrößerung. Die Parasitendichte berechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl der asexuellen Parasiten/ Anzahl der Leukozyten multipliziert mit der durchschnittlichen Leukozytendichte. Diese wurde als 8.000 Leukozyten/µl Blut gesetzt.

$$\frac{\text{Anzahl asexueller Parasiten}}{\text{Anzahl der Leukozyten}} \times 8.000 \text{ Leukozyten}/\mu\text{l Blut}$$

Für die Bestimmung der groben Parasitendichte wurden die Anzahl der asexuellen Parasiten auf 40 Leukozyten gezählt und dieses Verhältnis mit 8000 Leukozyten/µl Blut multipliziert. Die

grobe Parasitendichte wurde als wesentliches Kriterium zur Therapie einer unkomplizierten Malaria verwendet. Zu Studienzwecken wurde die Anzahl der Parasiten auf 500 Leukozyten gezählt und die Parasitendichte aus dem Verhältnis der Anzahl der asexuellen Parasiten/ 500 Leukozyten multipliziert mit 8.000 Leukozyten/ μ l Blut berechnet.

Die Parasitendichte wurde in niedrig ($15 \leq 1000$ Parasiten/ μ l) und hoch (> 1000 Parasiten/ μ l) unterteilt. Eine Hyperparasitämie lag bei einer Parasitendichte > 250.000 Parasiten/ μ l vor (WHO 2000).

2.7 Bestimmung der Hämoglobin-, Glukose- und Laktatkonzentration

Die Hämoglobinkonzentration wurde in beiden Studiengruppen mit einem transportablen Hemocue Photometer (Hemocue Angelholm, Schweden) bestimmt. 15 μ l Blut wurden in eine Küvette gezogen und diese in das Gerät eingelegt. Mit der vom Hersteller gelieferten Eichküvette wurde das Gerät täglich kalibriert. Eine moderate Anämie wurde als eine Hämoglobinkonzentration < 11 g/dl und eine schwere Anämie als ein Hb < 5 g/dl definiert (WHO 2000). Um auch geringfügig ausgeprägte Unterschiede einer moderaten Anämie zu erfassen, wurden altersspezifische Grenzwerte (Tab. 3) zur Definition einer Anämie verwendet.

Tabelle 3: Altersabhängige Grenzwerte zur Definition einer moderaten Anämie (Osiki *et al.*, 1998)

Altergruppe in Jahren	Anämie
0,5-< 5	< 11 g/dl
5-< 8	< 11,5 g/dl
8-< 12	< 12 g/dl

Die Glukose- und Laktatkonzentration im Vollblut wurde nur in der Patientengruppe mit einem Vario-Photometer (Diaglobal GmbH) gemessen. Die Messung der Glukosekonzentration erfolgt über die Glukose-Oxidase-Methode (GOD-PAP-Methode), bei der Glukose im Blut zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das entstandene Wasserstoffperoxid oxidiert reduzierte Chromoge (4-Aminophenazon, 2,4 Dichlorphenol) zu einem Farbkomplex (Chinoniminfarbstoff), über dessen Extinktion die Konzentration von Glukose im Blut gemessen werden kann (Barham & Trinder 1972).

Zur Bestimmung der Laktatkonzentration wurde die LOP-PAP-Methode angewendet. Dieses Verfahren beruht auf der Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei wiederum Wasserstoffperoxid entsteht, das, wie bei der GOD-PAP-Methode, reduziertes Chromogen oxidiert. Durch Extinktion des entstandenen Farbkomplexes konnte die Konzentration von Laktat gemessen werden (Clasing 1994). Eine Hypoglykämie liegt bei einer Glukosekonzentration < 40 mg/dl

(2,2 mmol/dl) und eine Hyperlaktatämie bei einer Laktatkonzentration > 5 mmol/l vor (WHO 2000).

2.8 Extraktion genomischer DNA

Für den Nachweis der Plasmodienspezies mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sowie für die Typisierung der β -Globingenotypen mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus PCR-amplifizierter DNA-Fragmente (PCR-RFLP) wurde genomische DNA aus DNA-stabilisierten Blutproben extrahiert. Die Extraktion genomischer DNA aus kernhaltigen Leukozyten beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren in Anwesenheit von Guanidiniumhydrochlorid an Silikamoleküle zu binden. Unter Guanidiniumhydrochlorid und Proteinase K kommt es zur zellulären Lyse und Aufspaltung der Zellkerne. Die jetzt freiliegende DNA bindet an Silikamoleküle. Nach mehreren Waschschritten in alkoholischen Lösungsmitteln wurde die DNA in wässriger Lösung herausgelöst (Gillespie & Hardman 1979). Das Verfahren wurde mit *QIAamp Blood Kits* (Qiagen, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Tab. 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Substanzen und Geräte.

Tabelle 4: Substanzen und Geräte zur Extraktion genomischer DNA

Substanzen
Lyse-Puffer (AL): wässrige Lösung von Guanidiniumhydrochlorid
Proteinase-K: aus <i>Tritirachium album</i> (1,1 g/ml)
reines Ethanol
Waschpuffer (AW 1 & 2): ethanolische Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl
Elutionspuffer (AE): wässrige Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl
Geräte
variable Mikroliterpipette (Gilson)
Zentrifuge (Hettich, Mikro 24-48 R)
Reaktionsgefäße (Sarstedt, 1900 μ l)
Zentrifugationssäule-Silika-Filter; Auffanghülse (Qiagen; Hilden)

Protokoll

200 μ l DNA-stabilisierten Bluts wurde mit 200 μ l Lyse-Puffer (AL) und 25 μ l Proteinase-K versetzt und auf einem Zellvortexgerät vermischt. Die Proben wurden bei 65°C für 20 min inkubiert und anschließend mit 200 μ l reinem Ethanol versetzt. Dieses Gemisch wurde auf eine mit einem Silika-Filter bestückte Zentrifugationssäule mit Auffanghülse gegeben und bei 8000 U/min zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde verworfen. In zwei Waschschrritten wurden jeweils 500 μ l Waschpuffer (AW 1 und AW 2) auf den Silika-Filter gegeben und das

Gemisch anschließend beim ersten Waschschrift für eine Minute bei 8.000 U/min und beim zweiten Waschschrift für drei Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (AE) und einminütigem Zentrifugieren bei 8000 U/min wurden die an den Silika-Filter gebundenen Nukleinsäuren herausgelöst. Durch dieses Verfahren konnte aus 200 µl DNA-stabilisierten Bluts ca. 6 µg genomische DNA mit einer DNA-Konzentration von ca. 50 ng/µl gewonnen werden. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die DNA bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

2.9 Nachweis von Plasmodien mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

Das Verfahren der PCR dient der Vervielfältigung bestimmter Bereiche genomischer DNA, wodurch der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen gelingt. Das Prinzip beruht auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die einzelnen Reaktionsschritte sind in Tab.5 dargestellt.

Tabelle 5: Reaktionsschritte (äußere PCR und innere PCR)

Reaktionsschritt	Temp.(°C)	Reakt.dauer (min)
Initiale Denaturierung	95	5
25 Zyklen jeweils von a-c		
a) Denaturierung (DNA-Doppelstrang wird getrennt)	94	1
b) Primeranlagerung	58	2
c) Extension (DNA-Polymerase synthetisiert neuen Strang)	72	2
abschließende Extension (vollständiges Auffüllen der DNA-Stränge)	72	5
Kühlung	10	

Temp.: Temperatur; Reakt.dauer: Reaktionsdauer

Die Spezifität und vor allem die Sensitivität kann durch die Verwendung geschachtelter Primer, d.h. der erneuten Amplifikation, nicht des ganzen Fragments, sondern eines Teilbereichs, erhöht werden. Dazu setzt man ein spezifisches Primerpaar ein, dessen Sequenzen innerhalb des zuerst amplifizierten Fragments liegen. Das Produkt der ersten Amplifikation (äußere PCR) wird in den zweiten Ansatz, der das innere Primerpaar (innere PCR) enthält, hinein verdünnt (Haqqi *et al.*, 1988). Unspezifische Sequenzen, die eventuell nach der ersten Amplifikation noch als Hintergrund vorhanden sind, werden im zweiten Ansatz bis unter die Nachweisgrenze verdünnt (Engelke *et al.*, 1988). Das folgende Protokoll basiert auf der Erstbeschreibung der PCR durch Saiki *et al.* (1985) und der Plasmodienspeziesspezifischen PCR nach Vorgaben von Snounou *et al.* (1993a; 1993b).

Protokoll

Der Nachweis der Plasmodienspezies *P. falciparum*, *P. malariae* und *P. ovale* erfolgte in zwei Stufen. Im ersten Schritt wurde mittels äußerer PCR ein plasmodiengenuspezifisches DNA-Fragment mit einer Länge von 1200 bp (Basenpaaren) amplifiziert. Dazu wurde ein Reaktionsgemisch (Mastermix siehe Tab. 6 & 7), welches die Primer rPUL 5 und rPUL 6 enthielt, mit jeweils 1 µl genomischer DNA versetzt und in einem Thermozykler (Biometra T 3) amplifiziert. In einem zweiten Schritt diente die entstandene Gensequenz der äußeren PCR als Matrize für die innere PCR der jeweiligen Plasmodienspezies. In das speziesspezifische Reaktionsgemisch (Mastermix), welches je nach Plasmodienspezies die Primer rFAL 1 und rFAL 2 (*P. falciparum*), rMAL 1 und rMAL 2 (*P. malariae*), rOVA 1 oder rOVA 2 (*P. ovale*) enthielt, wurde nach Zugabe von 1 µl äußeren PCR-Produkts das jeweilige speziesspezifische PCR-Produkt im Thermozykler amplifiziert. Zur Überprüfung der Qualität der PCR wurde für jeden Ansatz eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mit amplifiziert.

Tabelle 6: Substanzen und Geräte der äußeren PCR und inneren PCR

Substanzen	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Pharmacia): 5000 U/ml	
dNTP-Gemisch (Ultrapure dNTP-Set, Pharmacia):	- 25 mM Deoxyadenosintriphosphat (dATP) - 25 mM Deoxycytosintriphosphat (dCTP) - 25 mM Deoxythymidintriphosphat (dTTP) - 25 mM Deoxyguanintriphosphat (dTP)
Reaktionspuffer (Pharmacia): 50 mM KCL; 1,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl; pH 9,0	
Primer: äußere PCR: plasmodiengenuspezifisch (MWG biotech)	
	- rPUL 5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3')
	- rPUL 6 (5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CGC-3')
Primer: innere PCR: plasmodienspeziesspezifisch (MWG biotech)	
<i>P. falciparum</i> :	- rFAL 1 (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3')
	- rFAL 2 (5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3')
<i>P. malariae</i> :	- rMAL 1 (5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3')
	- rMAL 2 (5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3')
<i>P. ovale</i> :	- rOVA 1 (5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3')
	- rOVA 2 (5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG-3')
Geräte	
variable Mikroliterpipette (Gilson); Reaktionsgefäße: 1,5 ml (Biozym); Reaktionsständer (Roth)	
PCR-Röhrchen: PCR-Softtubes: 0,5 ml (Biozym)	
Thermozykler T 3 (Biometra)	

Tabelle 7: Mastermix (49 µl) für eine Probe der äußeren PCR und inneren PCR

Substanz	Volumen in µl	Molarität im Ansatz
Aqua bidest.	42,5	
Puffer	5	50 mM KCL; 1,5 mM MgCl ₂
dNTP-Gemisch	0,3	500 µM
Primer 1	0,5	160 µM
Primer 2	0,5	160 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,3	1,5 U/L

Sequenzspezifische Primer 1 und Primer 2 (siehe verwendete Substanzen) wurden je nach gewünschter Amplifikation verwendet.

2.10 Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Moleküle mit der Agarose-Gel-Elektrophorese

Die speziesspezifischen Amplifikationsprodukte (DNA-Fragmente) haben je nach Plasmodienspezies eine unterschiedliche Länge an Basenpaaren (bp), die mittels Elektrophorese aufgetrennt und dargestellt werden können [*P. falciparum* (205 bp), *P. malariae* (144 bp), (*P. ovale* (800 bp)].

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente von 0,5-25 kb Länge zu trennen und zu identifizieren. Agarose (glykosidisch verbundene D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose) dient hierbei als interne Matrix. In dieser wandern DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld, wegen negativ geladener Phosphatgruppen der DNA, zur Anode. Ethiumbromid interkaliert mit DNA-Molekülen und fluoresziert in ultraviolettem Licht. Durch die gleichzeitige Auftrennung standardisierter Proben mit bekannter Basenlänge (Molekulargewichtsmarker) kann die Größe der untersuchten DNA-Sequenzen bestimmt werden. Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sharp *et al.* (1973) durchgeführt.

Protokoll

Die Auftrennung der plasmodienspezifischen PCR-Amplifikate erfolgte in einem 1,6%-igem Agarosegel. Zur Herstellung wurden 0,8 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt. Die entstandene visköse Flüssigkeit wurde auf 50 – 60°C abgekühlt und luftblasenfrei in den Gelträger gefüllt. Nach Aushärtung des Gels wurden je 7 µl des PCR-Produktes mit 0,8 µl Blaumarker vermischt und in die Geltaschen gefüllt. Jede Geltasche wurde zusätzlich mit einem standardisierten

Längenmarker (Gemisch aus 4 µl Molekulargewichtsmarker und 0,8 µl Blaumarker) gefüllt. Mit Hilfe dieser standardisierten Längenmarker konnte die Länge der Basenpaare der einzelnen DNA-Banden bestimmt werden. Das präparierte Gel wurde zur Elektrophorese in eine horizontale Gel-Elektrophoresekammer gelegt und einer Gleichspannung von 80 Volt für 30 min ausgesetzt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Abschließend wurden die DNA-Banden bei langwelligem ultravioletten Licht (310 nm) durch Fluoreszenz am Transilluminator sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert. Eine Übersicht über die verwendeten Substanzen und Geräte zeigt Tab. 8.

Tabelle 8: Substanzen und Geräte bei der Agarose-Gel-Elektrophorese

Substanzen
Agarose (SeaKem LE-agarose) bzw. Nusieve GTG-Agarose (Biozym)
TBE-Puffer: 90 mM Tris-Base (pH 9,0), 90 mM Borsäure, 2 mM Na ₂ EDTA; autoklaviert
Blaumarker: 0,25% Bromphenolblau ; 0,25% Xylen Cyanol FF ; 40% Glycerol
Ethidiumbromid-Lösung (Boehringer Mannheim): 10 mg/ml Ethidiumbromid (1:10 verdünnt)
DNA-Molekulargewichtsmarker: 100 bp DNA-Ladder
Geräte
Gel-Träger (MBT-Brand); Gel-Elektrophoresekammer (Froebel-Labortechnik); Trafo (Biorad); variable Mikroliterpipette; Mikrottestplatte (neolab)
Transilluminator (Froebel-Labortechnik)
Polaroidkamera CU-5 (Nahaufnahmekamera); Polaroidfilme 667 (ISO 3000/36° 30 sec.; Black & White Instant Pack Film)

2.11 Typisierung der β-Globingenotypen mittels PCR und RFLP

Die Typisierung der β-Globingenotypen erfolgte mittels PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). RFLP ist ein Verfahren, mit dem genetische Variationen durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen nachgewiesen werden können.

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an bestimmten Stellen durch Erkennen einer für sie spezifischen Sequenz spalten, wodurch spezifische DNA-Fragmente entstehen. In einem ersten Schritt wird mit der PCR ein spezifisches DNA-Amplifikat erzeugt. In einem zweiten Schritt wird durch Restriktionsverdau mit spezifischen Restriktionsnukleasen die DNA an bestimmten Stellen gespalten. Die unterschiedlich langen Restriktionsfragmente werden nach elektrophoretischer Auftrennung identifiziert und den entsprechenden Genotypen zugeordnet. Die Herstellung des spezifischen DNA-Amplifikates (Methode PCR siehe Kap. 2.9) mit einer Länge von 358 Basenpaaren, welches die genetische Information der einzelnen Hämoglobingenotypen enthält, erfolgte nach einem Protokoll von Saiki *et al.* (1985).

Tabelle 9: Mastermix (49 µl) für eine Probe zur Herstellung eines spezifischen DNA-Amplifikates mit einer Basenpaarlänge von 358 bp

Substanz	Volumen in µl	Molarität im Ansatz
Aqua bidest.	42,25	
Puffer	5	50 mM KCL; 1,5 mM MgCl ₂ ;
dNTP-Gemisch	0,25	4 x 125 µM
Primer SC-1	0,5	25 pMol
Primer SC-2	0,5	25 pMol
Taq-Polymerase	0,5	2,5 U

Tabelle 10: Substanzen und Geräte zur Herstellung eines spezifischen PCR-Amplifikates (358 bp)

Substanzen
H ₂ O: Aqua bidest.
Taq-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> ; 5000 U/ml (Pharmacia)
Reaktionspuffer Taq-DNA-Polymerase (50 mM KCL; 1,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl; pH 9,0)
dNTP-Gemisch (Ultrapure dNTP Set; Pharmacia) :
-25 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP)
-25 mM Desoxycytosintriphosphat (dCTP)
-25 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP)
-25 mM Desoxyguanintriphosphat (dTP)
Primer (MWG biotech): -SC - 1: 5'-AGG AGC AGG GAG GGG AGG A -3'
-SC - 2: 5'-TCC AAG GGT AGA CCA CCA GC -3'
Geräte
PCR-Röhrchen: 0,5 ml PCR-Softtubes (Biozym); variable Mikroliterpipette (Gilson)
Reaktionsgefäße: 1,5 ml (Biozym); Reaktionsständer (Roth)
Thermozykler (Biometra T 3)

Protokoll

Ein Reaktionsgemisch, welches die Primer SC-1 und SC-2 enthielt, wurde mit 1 µl genomischer DNA versetzt und in einem Thermozykler [Biometra T3; siehe Tab. 5 (insgesamt 35 Zyklen von a-c)] amplifiziert. Die entstandenen Amplifikate wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe Kap. 2.10) auf eine gelungene Amplifikation überprüft. Bei erfolgreich amplifizierter DNA wurden unter UV-Licht DNA-Banden mit einer Länge von 358 bp sichtbar. Diese Amplifikate konnten für den Restriktionsverdau weiter verwendet werden. Die Aufspaltung in sequenzspezifische Fragmente erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit zwei Restriktionsenzymen (*Mnl I* und *Dde I*). Mit Hilfe des Restriktionsenzym *Mnl I* wurde das DNA-Amplifikat in drei Restriktionsfragmente mit unterschiedlicher Länge gespalten (Fragment-1: HbAA; Fragment-2: HbCC/HbSS/HbSC; Fragment-3: HbAC/HbAS).

HbAA konnte nach dem ersten Restriktionsverdau mit *Mnl I* direkt nachgewiesen werden. Für HbCC/HbSS/HbSC und für HbAC/HbAS lagen nach dem Verdau mit *Mnl I* Fragmente mit gleicher Basenpaarlänge vor, die eine Differenzierung in die einzelnen Genotypen nicht erlaubten. Um die einzelnen β -Globingenotyp-Sequenzen dieser Fragmente differenzieren zu können, wurde ein zweiter Restriktionsverdau mit *Dde I* durchgeführt. Danach konnte der β -Globingenotyp von HbAA, HbAC, HbCC, HbAS, HbSS und HbSC über die jeweils spezifische Restriktionsfragmentlänge bestimmt werden.

Protokoll: Restriktionsverdau mit Mnl I und Dde I

Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurde ein Reaktionsgemisch (Tab. 11 & 12), welches die Restriktionsendonuklease *Mnl I* (bzw. *Dde I*) enthielt, mit 7 μ l PCR-Produkt versetzt und bei 37°C für 4 – 12 h inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau lagen spezifische Restriktionsfragmente (Tab. 13 & 14) vor. Die unterschiedlich langen Restriktionsfragmente wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht (siehe Kap. 2.10). Anstelle der Seakem LE-Agarose wurde ein 4,5%-iges GTG-Agarosegel verwendet. Dieses Gel gewährleistet eine gute Auftrennung auch kleinster Basenpaarunterschiede zwischen 60 bp und 76 bp, wie sie beim Restriktionsverdau entstehen.

Tabelle 11: Substanzen und Geräte für den Restriktionsverdau mit *Mnl I* und *Dde I*

Substanzen	
Restriktionsenzym <i>Mnl I</i> (5.000 U/ml) bzw. <i>Dde I</i> (10.000 U/ml; New England Biolabs)	
<i>Escherichia coli</i> (E. coli) fungiert als Träger des geklonten <i>Mnl I</i> Gens von <i>Moxarella nonliquefaciens</i> (Sequenzen: -5'...C C T C (N) 7 ...3'; -3'... G G A G (N) 6 ...5')	
10 x NE Buffer 2 für <i>Mnl I</i> bzw. 10 NE Buffer 3 für <i>Dde I</i>	
100 x BSA (bovines Serumalbumin) nur bei <i>Mnl I</i>	
Aqua bidest.	
Geräte	
PCR-Röhrchen: 0,5 ml (PCR Softtubes; Biozym); variable Mikroliterpipette (Gilson)	
Reaktionsgefäße: 1,5 ml (Biozym); Reaktionständer (Roth)	
Thermozykler (Biometra T3)	

Tabelle 12: Reaktionsansätze (18 μ l) für eine Probe für den Restriktionsverdau mit *Mnl I* und *Dde I*

Substanzen für <i>Mnl I</i>	Volumen in μ l	Substanzen für <i>Dde I</i>	Volumen in μ l
<i>Mnl I</i>	0,4 (2 units)	<i>Dde I</i>	0,2 (2 units)
NE Buffer 2	2,5	NE Buffer 3	2,5
BSA (bovines Serumalbumin)	0,25	Aqua bidest.	17,3
Aqua bidest.	14,86		

Tabelle 13: DNA-Fragmentlängen der β -Globingenotypen nach Restriktionsverdau mit *Mnl I*

Genotyp	Basenpaarlänge (bp) der Restriktionsfragmente			
	bp	bp	bp	bp
HbAA	173	109		60
HbCC/HbSS/HbSC	173	109	76	
HbAC/HbAS	173	109	76	60

Tabelle 14: Spaltmuster der Restriktionsfragmente der Genotypen HbCC, HbSS und HbSC nach Restriktionsverdau mit *Dde I*

Genotyp	Basenpaarlänge (bp) der Restriktionsfragmente		
	bp	bp	bp
HbAC/HbCC		201	130
HbSS	331		
HbAS/HbSC	331	201	130

2.12 Statistische Testverfahren

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin und dem Institut für Medizinische Computerwissenschaften der Medizinischen Universität Wien. Die theoretischen Grundlagen basieren auf den Handbüchern „Medizinische Statistik“ (Guggenmoos-Holzmann & Wernecke 1995), „Practical statistics for medical research“ (Altman 1999), „Epidemiologische Methoden“ (Kreienbrock & Schach 2000) und „Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden“ (Sachs 2002). Alle statistischen Berechnungen wurden mit den Programmen SPSS 11.5, Microsoft Excel 2000, SAS und StatXact-5 durchgeführt.

Zur Analyse von Assoziationen zwischen Merkmalswerten wurden verschiedene statistische Verfahren zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden verwendet. Die Nullhypothese wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ unter der Annahme $\alpha = 5\%$ (Fehler 1. Art) formuliert.

Bei nominalen Merkmalswerten wurde die Signifikanz einer Hypothese mit Hilfe des χ^2 -Tests (Chi-Quadrat-Test) untersucht. Bei geeigneten Vergleichen (χ^2 -Test: $p < 0,05$) wurde die odds ratio (Konfidenzintervall 95%) bestimmt (Sachs 2002). War der Stichprobenumfang zu klein, d.h. die Gesamtsumme der 2 x 2 Kontingenztafel betrug weniger als 20 oder lag zwischen

20 und 40, und der kleinste Wert war kleiner als 5, wurde die Signifikanz einer Hypothese mit dem exakten Test nach Fisher getestet.

Um zu untersuchen, ob innerhalb zusammengefasster Gruppen (hier: Altersgruppen) ein Trend in logischer Reihenfolge für bestimmte Merkmalswerte zu verzeichnen war, wurde der Cochran-Armitage-Trend-Test angewendet (Mehta & Patel 1998).

Um zwei nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben miteinander zu vergleichen, wurde der U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon angewendet, bei mehreren nicht normalverteilten, unverbundenen Stichproben, der H-Test nach Kruskal-Wallis.

Um den Einfluss mehrerer Faktoren (Kovariablen) auf die Manifestation einer Malaria zu untersuchen und Verzerrungen durch Störfaktoren und Interaktionen zu berücksichtigen, wurde als multivariates Verfahren die logistische Regression im Einschlussverfahren angewendet. Bei geeigneten Vergleichen wurde die odds ratio der univariaten Analyse unter gleichzeitiger Einbeziehung dieser Kovariablen adjustiert (adjustierte odds ratio). Da einer der Einflussfaktoren (Kovariablen: HbAS) nur in einer Ausprägung (Kontrollgruppe) der binären Zielvariablen (Kontrollgruppe/Patientengruppe) auftrat, versagte das übliche Verfahren der logistischen Regression mit SPSS und SAS (die Likelihood ist in diesem Fall monoton). Bei Vorliegen einer „Quasi- complete Separation“ wurde ein Makro (SAS-Makro) zur Korrektur der ML-Schätzungen der Regressionskoeffizienten integriert (Heinze & Schemper 2002; Heinze & Ploner 2003). Mit Hilfe dieses Korrekturverfahrens (freundlicherweise von Herrn Dr. Mag. G. Heinze, Institut für medizinische Computerwissenschaften, Medizinische Universität Wien zur Verfügung gestellt) ist es möglich, brauchbare Schätzungen der Regressionskoeffizienten zu erreichen.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit Hilfe des χ^2 -Test berechnet. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist ein Begriff aus der Populationsgenetik. G. H. Hardy und W. Weinberg (1908/1909) zeigten unabhängig voneinander, dass sich unter bestimmten Bedingungen die Frequenzen von zwei oder mehreren Genen (Allelen) in einer Population im Gleichgewicht befinden, wenn:

- eine Panmixie vorliegt (alle Paarungen, auch von Trägern verschiedener Genotypen gleich wahrscheinlich und gleich erfolgreich sind)
- eine große Individuenzahl (> 10.000) vorliegt (der zufällige Verlust eines Individuums verändert nicht die Häufigkeit der Allele)
- keine Selektionen, Mutationen und Migrationen innerhalb der Population stattfinden.

- Bei drei Allelen (Allel A (HbA), Allel S (HbS) und Allel C (HbC) mit den Frequenzen p für das Allel A, q für das Allel S und r für das Allel C beträgt die Summe der Allelfrequenzen $p + q + r = 1$. Die Allelfrequenzen wurden mit Hilfe der mathematischen Formel $p^2 + 2pr + q^2 + 2qr + r^2 + 2pq = 1$ aus den beobachteten Genotypfrequenzen $HbAA = p^2$; $HbAC = 2pr$; $HbSS = q^2$; $HbSC = 2qr$; $HbCC = r^2$; $HbAS = 2pq$ ermittelt. Anschließend wurden die beobachteten Genotypfrequenzen mit den erwarteten Prävalenzen auf Assoziationen geprüft.