

4 Diskussion

4.1 Kritische Diskussion des Studiendesigns und der angewandten Methoden

4.1.1 Studiengebiet, -aufbau und -design

Die vorliegenden Ergebnisse wurden im Rahmen einer Querschnittsstudie bzw. einer unverbundenen Fall-Kontrollstudie erhoben. Um den Einfluss von HbS und HbC auf unterschiedliche Manifestationen einer *P. falciparum*-Infektion untersuchen zu können, wurde die Kontrollgruppe in einem zweiten Schritt in drei repräsentative Untergruppen unterteilt. Zusammen mit der Patientengruppe wurden insgesamt vier Kategorien gebildet (keine Infektion/ submikroskopische Infektion/ asymptomatische Infektion/ komplizierte Malaria). In einigen Untergruppen war der Stichprobenumfang zu gering, um für jedes Merkmal Assoziationen berechnen zu können.

Querschnittsstudien bieten die Möglichkeit bei repräsentativer Zufallsauswahl der Studienpopulation von dieser auf eine Zielpopulation zu schließen und die Bedeutung von Risikofaktoren zu ermitteln. Das Studiendesign zeichnet sich durch geringe Kosten und eine kurze Studiendauer aus. So konnte trotz limitierter finanzieller Ressourcen und einer schlecht entwickelten Infrastruktur im Studiengebiet eine große Anzahl von Probanden (Kontrollgruppe: $n = 1.100$) innerhalb eines kurzen Zeitraumes untersucht werden. Andererseits sind Querschnittsstudien zum Kausalitätsnachweis von Risikofaktoren nur bedingt geeignet und deshalb eher ein Instrument der deskriptiven Epidemiologie. Für die simultane Untersuchung mehrerer Risikofaktoren einer Erkrankung ist das Design einer Fall-Kontrollstudie besser geeignet, da die Exposition im Nachhinein festgestellt wird und mehrere Risikofaktoren gleichzeitig bestimmt werden können (Kreienbrock & Schach 2000).

Querschnittsstudien sind für Erkrankungen mit kurzer Dauer nicht der geeignete Studientyp. Dies könnte in der vorliegenden Arbeit z.B. zum Unterschätzen der tatsächlichen Prävalenz einer unkomplizierten (siehe Kapitel 4.2.1) und komplizierten Malaria geführt haben. Auch der Verlauf einer *P. falciparum*-Infektion konnte mit Hilfe dieses Studientyps nicht beurteilt werden. Dazu wäre eine Kohortenstudie geeignet gewesen. Diese war jedoch aus ethischen Gründen nicht Mittel der Wahl.

Die Anfälligkeit gegenüber systematischen Fehlern (bias) ist bei Querschnittsstudien groß. So könnten ein Selektions-Bias (Verzerrung durch [nicht zufällige] Auswahl), ein Informations-Bias

(Verzerrung durch fehlerhafte Information) oder eine Confounding-Bias (Verzerrung durch die mangelhafte Berücksichtigung von Störgrößen) aufgetreten sein. Bei der Rekrutierung der Kontrollgruppe könnte es z. B. durch den nicht beabsichtigten Einschluss von Kindern der Stammesältesten oder Kindern naher Verwandter, der versehentlichen Rekrutierung älterer Kinder (> 9 Jahre) durch fehlende Geburtsurkunden, aber auch durch die Abwesenheit einzelner Kinder zum Zeitpunkt der Rekrutierung (Krankenhausaufenthalt, Schulbesuch, Feldarbeit, Marktbesuch etc.) zu einer Auswahlverzerrung gekommen sein. Das Risiko einer Informationsverzerrung ist in der vorliegenden Studie eher gering einzuschätzen, da der Nachweis der wichtigsten Variablen (Bestimmung der einzelnen Plasmodienspezies, Analyse der β -Globingenotypen etc.) mittels standardisierter Verfahren erfolgte. Lediglich die Erfassung des Alters könnte hier von Bedeutung sein, da für einen Großteil der Kinder keine schriftliche Dokumentation des Geburtsdatums vorlag. Als Confounder könnten soziodemographische und sozioökonomische Einflüsse, wie z.B. die Verwendung von Moskitonetzen (Muller *et al.*, 2006), Zugang zur medizinischen Versorgung, Selbstmedikation mit Chlorochin, Ernährungszustand, Wohnverhältnisse etc. (el Samani *et al.*, 1987; Kofoed *et al.*, 2004; Mensah & Kumaranayake 2004), die in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurden, von Bedeutung sein.

Einen Nachteil der Fall-Kontrollstudien stellt häufig die schlechte Vergleichbarkeit beider Studiengruppen dar (Altman 1999). In der vorliegenden Arbeit stammen beide Studiengruppen aus der gleichen Grundgesamtheit. Das Krankenhaus in Tamale, wo die Patientengruppe rekrutiert wurde, ist als medizinisches Versorgungszentrum für die Bevölkerung der gesamten nördlichen Region zuständig. Trotzdem waren die beiden Studiengruppen nicht homogen. So lag zwar für beide Studiengruppen eine Gleichverteilung der Geschlechter vor, Alters- und Wohnstruktur, d. h. die Verteilung zwischen urbanen und ländlichen Gebieten, unterschieden sich jedoch signifikant, wofür multivariat adjustiert wurde.

Kinder der Patientengruppe waren signifikant jünger als Kinder der Kontrollgruppe. Dieser Altersunterschied ist darauf zurückzuführen, dass sich eine komplizierte Malaria vorwiegend bei jüngeren Kindern (≤ 5 Jahre) manifestiert (WHO 2000). In der Kontrollgruppe stammten die meisten Kinder aus ländlichen Regionen (89,1%). Dagegen kam in der Patientengruppe die Mehrzahl der Kinder aus urbanen Gebieten (67,5%). Es ist bekannt, dass sozioökonomische Faktoren zu den Hauptdeterminanten einer komplizierten Malaria zählen (Carne *et al.*, 2000). Obwohl in der vorliegenden Studie der Einfluss sozioökonomischer Faktoren nicht berücksichtigt wurde, ist anzunehmen, dass diese Faktoren einen wesentlichen Einfluss darauf ausübten, welche Kinder mit einer komplizierten Malaria überhaupt im Krankenhaus in Tamale vorstellig wurden. Häufig sind Familien in urbanen Gebieten finanziell besser gestellt als

Familien in ländlichen Regionen. Der Bildungsstand der Eltern liegt meist höher, die Entfernung zum Krankenhaus ist kürzer und eine bessere Infrastruktur ermöglicht einen schnelleren Zugang zu medizinischen Versorgungszentren.

Obwohl mit einer Studienpopulation von 1100 Kindern in der Kontrollgruppe und 290 Kindern in der Patientengruppe eine relativ großes Studienkollektiv vorlag, konnten in dieser Arbeit nur für die heterozygoten Formen von Hämoglobin S und C statistisch relevante Aussagen getroffen werden. Aufgrund des geringen Bevölkerungsanteils homozygoter Genträger von Hämoglobin S und C sowie Genträger der Mischform SC im Studiengebiet war in dieser Studie der Stichprobenumfang zu gering, um Assoziationen für diese Genotypen berechnen zu können. Somit konnte für die Genotypen HbCC, HbSS und HbSC die Auswertung größtenteils nur deskriptiv erfolgen.

4.1.2 Definition einer Anämie und Bestimmung der Milzgröße

Um auch geringfügig ausgeprägte Unterschiede einer moderaten Anämie zu erfassen, wurden altersspezifische Grenzwerte (Tab. 3) verwendet (Osiki *et al.*, 1998). Diese Referenzwerte entstammen der europäischen Population und berücksichtigen eventuelle Abweichungen bei Menschen aus afrikanischen Populationen nicht. Standardisierte, altersabhängige Grenzwerte der Hämoglobinkonzentration zur Definition einer Anämie afrikanischer Kinder gibt es bis heute nicht. Häufig weichen jedoch die Durchschnittswerte hämatologischer Parameter innerhalb ethnischer Gruppen, auch nach Ausschluss von Eisenmangel und Hämoglobinopathien, erheblich voneinander ab (Dallman *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1996). Derartige ethnische Unterschiede wurden bisher bei der Definition einer Anämie nicht berücksichtigt. Um die Prävalenz einer Anämie adäquat bestimmen zu können, wäre es somit erforderlich, für afrikanische Populationen und für die einzelnen ethnischen Gruppen spezifische Normwerte zu definieren. In Ermangelung dieser wurden altersspezifische Referenzwerte der europäischen Bevölkerung verwendet.

Die Größe der Milz wurde manuell durch Palpation und Perkussion anhand einer Einteilung nach Hackett (Gilles & Warrell 1993) bestimmt. Diese Methode wird in den meisten epidemiologischen Studien in endemischen Malariagebieten angewendet. Jedoch ist die subjektive Bestimmung der Milzgröße durch Palpation und Perkussion ungenau (Sullivan & Williams 1976). Eine vergrößerte Milz kann bei der Palpation durch eine atypische Lage oder durch einen tiefen unteren Rippenbogen übersehen werden (Burchard *et al.*, 2001). Die präzisere Größenbestimmung durch eine Sonographie konnte in dieser Studie aus logistischen Gründen nicht genutzt werden.

4.1.3 Mikroskopische Untersuchungen und Nachweis der Plasmodienspezies mit der PCR

Der sensitivste und spezifischste Nachweis von Plasmodien im peripheren Blut erfolgt heute durch die PCR. Die Sensitivität der speziesspezifischen PCR hängt entscheidend vom Design der Primer ab und unterscheidet sich innerhalb der einzelnen Genloci (Contamin *et al.*, 1995). Durch die Verwendung geschachtelter Primer konnte in dieser Arbeit die Sensitivität maßgeblich erhöht werden. Bei der Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide wird eine hohe Sensitivität erreicht, die Mengen bis zu 0,01 pg DNA im peripheren Blut nachweisen kann (Tirasophon *et al.*, 1991). Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben den Nachweis von parasitärer DNA bei einer Parasitendichte von ca. 2,5-20 P/ μ l (Snounou *et al.*, 1993; May *et al.*, 1999). Bei der mikroskopischen Beurteilung des Dicken Tropfen liegt die untere Nachweisgrenze bei ca. 10-20 Parasiten/ μ l Blut (Clendennen *et al.*, 1995).

Die hohe Sensitivität und Spezifität sowie die Schnelligkeit und einfache Durchführung machen die Anwendung der PCR für große epidemiologische Studien besonders attraktiv (Tirasophon *et al.*, 1994). So können auch submikroskopische Infektionen, d.h. Infektionen mit sehr niedrigen Parasitendichten unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze, gut erfasst werden.

Ein weiterer Vorteil der PCR gegenüber der konventionellen Mikroskopie liegt in der präzisen Aufdeckung von Mischinfektionen. Simultane Infektionen von zwei oder mehr Plasmodienspezies treten häufig auf (Richie 1988). Obwohl simultane Infektionen mit mehreren Plasmodienspezies seit langem in der Literatur erwähnt werden, lagen bis zur Anwendung von speziesspezifischen PCR-Methoden nur wenige detaillierte epidemiologische Berichte zur Prävalenz von Mischinfektionen vor (Snounou *et al.*, 1993; May *et al.*, 1999).

4.1.4 Typisierung der β -Globingenotypen durch PCR und RFLP

Die Kopplung von PCR und RFLP kam erstmals in der pränatalen Diagnostik der Sichelzellanämie zu Anwendung. Im Gegensatz zu Southern blotting und Hybridisierung zeichnen sich diese Methoden durch eine schnellere und einfachere Durchführung sowie eine höhere Sensitivität aus (Saiki *et al.*, 1985). Die Standardisierung dieser Methoden ermöglichte eine Ausweitung der Diagnostik auf weitere genetische Erkrankungen.

Die Auftrennung der spezifischen DNA-Fragmente zur Differenzierung der einzelnen Globingenotypen erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese in Anwesenheit niedriger Ethiumbromidkonzentration [modifiziertes Protokoll nach Sharp *et al.* (1973)]. Gegenüber

Methoden, wie der Zentrifugation und der Polyacrylamid-Elektrophorese, bietet dieses Verfahren mehrere Vorteile. Mit der Ethiumbromid-Agarose-Gel-Elektrophorese werden aufwendige Färbemethoden vermieden. Es können DNA-Fragmente von weniger als 7×10^6 Dalton präzise ohne zeitaufwendige autoradiographische Techniken aufgetrennt werden. Somit lassen sich schon minimale DNA-Mengen bis zu 0,05 µg DNA direkt im Gel als fluoreszierende Banden mittels UV-Licht darstellen (Sharp *et al.*, 1973). Durch eine veränderte Zusammensetzung des Gels oder eine veränderte Laufzeit kann der zu untersuchende Molekülgrößenbereich der DNA erweitert oder reduziert werden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente der einzelnen Globingenotypen erfolgte in der vorliegenden Arbeit in einem 4,5%-igen GTG-Agarose-Gel mit einer Laufzeit von 70 min. Dies gewährleistete eine gute Auftrennung auch kleinster Basenpaarunterschiede zwischen 60 bp und 76 bp, wie sie beim Restriktionsverdau entstehen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Infektionen durch *P. falciparum* und Merkmalsträger mit HbS und HbC sind in der Savanne Nordghanas häufig (Edington & Lehmann 1954; Binka *et al.*, 1994; Koram *et al.*, 2000; Koram *et al.*, 2003). Dabei wird HbC häufiger als HbS vorgefunden (Thompson 1963; Ringelmann *et al.*, 1976; Agarwal *et al.*, 2000). Bisher wurde für HbC ein Schutz vor der schweren Verlaufsform in Regionen beschrieben, in denen sich als Komplikation häufig eine zerebrale Malaria manifestiert (Agarwal *et al.*, 2000; Modiano *et al.*, 2001). In hyperendemischen Malariagebieten, wie in Nordghana, steht dagegen als Komplikation eine schwere Anämie im Vordergrund (Koram *et al.*, 2000; Kurtzhals *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von HbS und HbC auf die Infektionsprävalenz von *P. falciparum*, *P. malariae* und *P. ovale*, auf die Parasitendichte und auf klinische Symptome, wie Anämie und Splenomegalie, in der Population Nordghanas untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, ob HbS und HbC auch den Verlauf einer *P. falciparum*-Infektion beeinflussen, d.h. das Infektions-, Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko vermindern können.

Als Schwerpunkt dieser Arbeit wurde geklärt, ob neben Merkmalsträgern mit HbAS auch homo- und heterozygote Merkmalsträger mit HbC vor einer komplizierten Malaria geschützt sind. Weiterhin interessierte, ob klinische Symptome der schweren Verlaufsform durch diese Hämoglobinopathien beeinflusst werden.

Die wichtigsten Ergebnisse sind im Folgenden kurz dargestellt:

- In der Studienpopulation „Northern Region“ wurde die Prävalenz einer *P. falciparum*-Infektion und die Parasitendichte durch HbC nicht beeinflusst. Für Kinder mit HbSS reduzierte sich das Risiko einer *P. falciparum*-Infektion um 80%. Für Kinder mit HbAS und HbSS wurden signifikant niedrigere Parasitendichten beobachtet.
- Für Kinder mit HbC konnte ein höheres Risiko für *P. ovale*-Infektionen nachgewiesen werden. Dieses war für HbCC gegenüber HbAC fünfmal so hoch. Für Kinder mit HbCC wurde eine höhere Prävalenz für *P. malariae*-Infektionen ohne signifikante Unterschiede beobachtet. Das Risiko einer *P. malariae*- und *P. ovale*-Infektion wurde durch HbS nicht beeinflusst.
- Die Prävalenz einer submikroskopischen Infektion wurde weder durch HbS noch durch HbC vermindert. Das Risiko einer asymptomatischen Infektion gegenüber nicht infizierten Kindern reduzierte sich nur für Kinder mit HbSS.
- HbAS und HbAC beeinflussten die Hämoglobinkonzentration nicht. Kinder mit HbAC wiesen eine höhere Splenomegalie auf. Die Unterschiede waren im Vergleich zu Kindern mit HbAA jedoch nicht signifikant. Eine Splenomegalie trat bei Kindern mit HbAS nicht häufiger als bei Kindern mit HbAA auf.
- Für Kinder mit HbAS und HbAC wurde ein Schutz vor einer komplizierten Malaria ermittelt. Das Risiko für Kinder mit HbAS reduzierte sich um 98%, für Kinder mit HbAC um 35%.
- Ein Einfluss von HbAC und HbSS auf klinische Symptome einer komplizierten Malaria wurde nicht beobachtet. Die Letalität einer komplizierten Malaria wurde weder durch HbAC noch durch HbSS beeinflusst.

4.2.1 Epidemiologie der Malaria in der Savanne Nordghanas

In hyperendemischen Malariagebieten, zu denen auch die Savanne im Norden Ghanas zählt, liegen für *P. falciparum* ganzjährig hohe Transmissionsraten vor (Binka *et al.*, 1994; Koram *et al.*, 2000; Baird *et al.*, 2002). Auch in der vorliegenden Studie, die in der Trockenzeit durchgeführt wurde, wiesen dreiviertel der Kinder eine Infektion mit *P. falciparum* auf. 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).

Die in unserer Studienpopulation ermittelte Prävalenz der Infektion durch *P. falciparum*, *P. malariae* und *P. ovale* stimmt mit anderen epidemiologischen Studien in der Savanne Nordghanas weitgehend überein (Binka *et al.*, 1994; Koram *et al.*, 2000; Mockenhaupt *et al.*, 2001; Koram *et al.*, 2003). In der Studie von Binka *et al.* (1994) wurde für *P. falciparum* eine Infektionsprävalenz von 70,6%, für *P. malariae* von 16,9% und für *P. ovale* von 7,9% angegeben. Dort beziehen sich die Prävalenzen auf ein ganzes Jahr, d. h. Unterschiede zwischen Perioden niedriger und hoher Transmission wurden nicht berücksichtigt. Infektionen durch *P. malariae* und *P. ovale* sind vorwiegend in der Trockenzeit zu finden (Molineaux *et al.*, 1980). Bei 57% der Kinder wurde mikroskopisch eine asexuelle Parasitämie nachgewiesen. Dies ist vergleichbar mit anderen epidemiologischen Studien der Region (Binka *et al.*, 1994; Koram *et al.*, 2000), in denen für die Trockenzeit eine Infektionsprävalenz von 53 – 54% beobachtet wurde. In der Regenzeit erhöhte sich diese auf 70%-84%. Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals die Bedeutung saisonaler Schwankungen. Generell wäre es sinnvoll, zukünftige Studien, die den Einfluss bestimmter Faktoren auf eine klinische *P. falciparum*-Malaria untersuchen, in der Regenzeit durchzuführen. In dieser Zeit ist von höheren Prävalenzen einer Parasitämie und einer Zunahme symptomatischer *P. falciparum*-Infektionen auszugehen.

Altersabhängige Prävalenz einer P. falciparum-Infektion und der Parasitendichte

Die Prävalenz einer Plasmodieninfektion und die Höhe der Parasitendichte sind altersabhängig. In der hier dargestellten Arbeit nahm die Prävalenz aller drei Plasmodienspezies bis zum 9. Lebensjahr signifikant zu. Dies stimmt mit anderen epidemiologischen Angaben in Afrika überein (Marsh *et al.*, 1989; Hogg *et al.*, 1991; Binka *et al.*, 1994; Hogg 1996; May *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang zwischen Alter und Höhe der Parasitendichte konnte weder in unserer Studie noch bei Binka *et al.* (1994) beobachtet werden. In den Untersuchungen von Hogg *et al.* (1991) und Marsh *et al.* (1989) nahm dagegen die Parasitendichte ab dem 3. bis 4. Lebensjahr ab. Abhängig von der Transmission wird mit zunehmendem Alter eine Immunität erworben, die auch als Semiimmunität bezeichnet wird. In Gambia wurde für Kinder von 1-11 Jahren mit zunehmendem Alter ein Anstieg der Antikörpertiter gegen parasitäre Neoantigene infizierter Erythrozyten ermittelt, der mit einer abnehmenden Parasitendichte korrelierte (Marsh *et al.*, 1989). Es entwickelt sich zuerst eine Immunität, die die parasitäre Proliferation kontrolliert und Schutz vor einer klinischen Malaria bietet. Die Fähigkeit, eine Infektion zu verhindern, entwickelt sich erst später, d. h. ab dem 10. bis 12. Lebensjahr (Hogg *et al.*, 1991). Somit nimmt die Prävalenz einer *P. falciparum*-Infektion, wie es z. B. für ein hochendemisches Gebiet in Gambia beschrieben wurde, erst in dieser Altersklasse wieder ab (Marsh *et al.*, 1989).

Submikroskopische und asymptomatische Infektionen

Submikroskopische- und asymptomatische Infektionen treten in hyperendemischen Gebieten häufig auf (Bottius *et al.*, 1996; May *et al.*, 1999). In Senegal wurden bei zwei Dritteln der Probanden ohne Parasitämie submikroskopische Infektionen diagnostiziert (Bottius *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass mehr als 90% der Bevölkerung in diesen holoendemischen Gebiet chronisch mit niedriggradigen Parasitendichten infiziert sind. Auch in der vorliegenden Studie wiesen mehr als die Hälfte der Kinder (53,8%) asymptomatische Infektionen und 18,6% submikroskopische Infektionen auf. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen epidemiologischen Ergebnissen (Bottius *et al.*, 1996; Hogh 1996; May *et al.*, 1999). In einem holoendemischen Malariagebiet in Nigeria konnte bei 19,6% der Kinder eine submikroskopische *P. falciparum*-Infektionen nachgewiesen werden. Bei 23,9% der Kinder wurden niedrige Parasitendichten, mit einem oder weniger als einem Parasiten pro Blickfeld, bestimmt (May *et al.*, 1999).

Auch in Gebieten mit instabiler Transmission sind zu Zeiten hoher Übertragung submikroskopische und asymptomatische Infektionen häufig (Elhassan *et al.*, 1995; Roper *et al.*, 1996). In einer Region im Sudan wurde unabhängig von der Jahreszeit für submikroskopische Infektionen eine Prävalenz von 20% beschrieben (Roper *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse widersprechen der These, dass submikroskopische Infektionen einer gerade abgelaufenen Infektion entsprechen könnten. Dieser Annahme zufolge wären keine kompletten Parasiten mehr vorhanden, sondern nur noch Teile parasitärer DNA oder Antigene. In einer tierexperimentellen Studie konnte 48 Stunden nach Inokulation abgetöteter Parasiten in Mäuse kein Nachweis von Parasiten erbracht werden (Jarra & Snounou 1998).

Unkomplizierte Malaria

Im Gegensatz zu submikroskopischen- und asymptomatischen Infektionen trat in unserer Studienpopulation eine unkomplizierte Malaria mit 2,8% nur selten auf. In holoendemischen Gebieten kommt es durch die kontinuierliche Infektion mit polyklonalen Stämmen von *P. falciparum* bei einer erneuten Infektion zu einer abgemilderten klinischen Symptomatik. Es entwickeln sich eher mild verlaufende chronische Infektionen (Bottius *et al.*, 1996; Farnert *et al.*, 1999). In der vorliegenden Studie wurde kein Zusammenhang zwischen Fieber und einer Infektion mit *P. falciparum* oder Fieber und Parasitendichte beobachtet. Eine fehlende Assoziation zwischen einer *P. falciparum*-Infektion und Fieber wurde auch in anderen hyperendemischen Malariagebieten beobachtet (Sowunmi 1995; Rogier *et al.*, 1996; Bouvier

et al., 1997; Gbadegesin *et al.*, 1997). Sowohl die Parasitendichte als auch Fieber können in Abhängigkeit von der Tageszeit Schwankungen unterliegen (Farnert *et al.*, 1997; Delley *et al.*, 2000). Eventuell trat Fieber nicht während unserer Untersuchung auf, möglicherweise jedoch zu einem späteren Zeitpunkt. Die Kinder wurden zumeist morgens untersucht. Fieber, aber auch höhere Parasitendichten werden dagegen häufiger um die Mittagszeit beobachtet (Delley *et al.*, 2000).

Für das Auftreten von Fieber könnte auch ein altersabhängiger Schwellenwert der Parasitendichte verantwortlich sein (Rogier *et al.*, 1996). In einer Kohortenstudie in Südghana wurden für die Entwicklung von Fieber bei Säuglingen ein Schwellenwert von 100 Parasiten/ μ l und bei Kindern ab einem Jahr von 3.500 Parasiten/ μ l angegeben (McGuinness *et al.*, 1998). In der vorliegenden Studie lag der Median der Parasitendichte mit 589,2 Parasiten/ μ l unter dem beschriebenen Schwellenwert für Kinder ab einem Jahr. Weiter könnte die Einnahme von Chloroquin, die unter der Bevölkerung der Nordghanas sehr verbreitet ist, eine klinische Symptomatik verhindern bzw. mildern. Eine vollständige parasitäre Elimination findet jedoch, bedingt durch eine nicht standardisierte Einnahme und die verbreitete Chloroquinresistenz in dieser Region, selten statt (Mockenhaupt *et al.*, 2001; Ehrhardt *et al.*, 2002).

Mischinfektionen

Mischinfektionen sind in Gebieten mit stabiler Malariatransmission häufig zu beobachten. Dabei sind Infektionen mit *P. malariae* oder *P. ovale* fast ausschließlich in Kombination mit einer *P. falciparum*-Infektion vorzufinden. Auch in der vorliegenden Studie wies ein Großteil der Kinder Mischinfektionen auf. Infektionen mit *P. falciparum* und *P. malariae* waren mit 8,4% häufiger anzutreffen als Infektionen mit *P. falciparum* und *P. ovale* (2,9%) oder Dreifachinfektionen (2,4%). In einem hyperendemischen Gebiet der Elfenbeinküste wurden bei 21% der Probanden Mischinfektionen (Black *et al.*, 1994) beobachtet. In einem holoendemischen Malariagebiet in Nigeria wurden Dreifachinfektionen mit 11,7% häufiger diagnostiziert als in der vorliegenden Studie (May *et al.*, 1999).

4.2.2 Klinische Symptome

Die Prävalenz einer Anämie bei Kindern schwankt in endemischen Malariagebieten Afrikas zwischen 31-90% (Bradley-Moore *et al.*, 1985; Premji *et al.*, 1995). In unserer Studienpopulation waren 72% der Kinder anämisch. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien (Slutsker *et al.*, 1994; Schellenberg *et al.*, 1999; Menendez *et al.*, 2000;

Kahigwa *et al.*, 2002) nahm auch in der vorliegenden Studie das Risiko für eine Anämie mit zunehmendem Alter ab. Eine schwere Anämie wurde nur bei einem Kind mit einer homozygoten Sichelzellerkrankung und einer zusätzlichen submikroskopischen *P. falciparum*-Infektion diagnostiziert. In der Trockenzeit sind schwere malariaassoziierte Anämien eher selten. In einer anderen Untersuchung in Nordghana nahm die Prävalenz einer schweren Anämie (Hb < 5 g/dl) in der Regenzeit (22%) gegenüber der Trockenzeit (1,4%) zu (Koram *et al.*, 2000).

In endemischen Malariagebieten wird eine Anämie hauptsächlich durch Infektionen mit *P. falciparum* verursacht (Menendez *et al.*, 2000; Murphy & Breman 2001). Auch in der vorliegenden Studie gingen isolierte *P. falciparum*-Infektionen mit einem zweifach erhöhten Anämierisiko einher. Submikroskopische Infektionen und niedrige Parasitendichten (< 1000 Parasiten/ μ l) erhöhten das Anämierisiko nicht. Bei Parasitendichten > 1000 Parasiten/ μ l nahm das Risiko einer Anämie um das 1,6-fache zu.

Als Hauptursachen einer Anämie durch *P. falciparum*-Infektionen werden eine gesteigerte Hämolyse und eine unzureichende Erythropoese angenommen (Menendez *et al.*, 2000; Weatherall *et al.*, 2002). Ein Abfall der Erythrozytenzahl kommt unter anderem durch die Ruptur infizierter Erythrozyten (Phillips *et al.*, 1986; Phillips & Pasvol 1992), die verstärkte Phagozytose infizierter- und nicht infizierter Erythrozyten (Phillips & Pasvol 1992; Slutsker *et al.*, 1994; Bojang *et al.*, 1997) und komplementvermittelte autoimmunologische Prozesse (Facer *et al.*, 1979; Facer 1980; Facer 1980; Abdalla & Weatherall 1982) zustande. Die inadäquate Erythropoese ist auf eine unterdrückte Erythropoetinsynthese, wahrscheinlich durch TNF- α (Clark & Chaudhri 1988), und eine erythrozytäre Hyperplasie mit Dyserythropoese (Abdalla 1990) zurückzuführen. Eine Überproduktion an Zytokinen wie TNF- α , INF- γ und Stickstoffoxid (NO) fördert die Knochenmarksdepression, die Dyserythropoese und die Erythrozytenphagozytose (Clark & Chaudhri 1988; Anstey *et al.*, 1999).

In unserer Untersuchung erhöhten auch Mischinfektionen das Risiko einer Anämie. So wiesen Kinder mit Infektionen durch *P. falciparum* und *P. malariae* ein zweifaches Risiko für eine Anämie auf. Dreifachinfektionen gingen mit einem zehnfachen Anämierisiko einher. Dies liegt im Trend mit Beobachtungen in Nigeria. Dort nahm das Risiko einer Anämie mit der Anzahl der Plasmodienspezies signifikant zu (May *et al.*, 2000).

Weiterhin ist die Milz durch die Entfernung infizierter Erythrozyten aus der Blutzirkulation entscheidend an der Manifestation einer Anämie beteiligt (Angus *et al.*, 1997). In der vorliegenden Studie ging eine Splenomegalie mit einem 1,6-fachen Risiko für eine Anämie einher. Zudem wiesen Kinder in ländlichen Gebieten ein 1,8-fach höheres Risiko auf. Dafür sind neben der höheren Transmissionsraten in ländlichen Regionen (Coene 1993; Koram *et al.*, 1995)

vermutlich sozioökonomische Faktoren, wie das Einkommen, der Bildungsstand der Eltern und darüber vermittelt das Gesundheitsverhalten, der Ernährungsstatus, die Verwendung von Moskitonetzen etc. verantwortlich (Koram *et al.*, 1995; Kahigwa *et al.*, 2002).

Weitere Ursachen einer Anämie wie Eisen- (Stoltzfus 2001), Vitamin B 12- (Said *et al.*, 1975) und Proteinmangel durch Unter- und Fehlernährung (Biemba *et al.*, 2000) sollten berücksichtigt werden. Auch die in diesen Gebieten häufig vorkommenden hereditären Anämien (Fleming & Werblinska 1982; Mockenhaupt *et al.*, 2000), HIV-Infektionen sowie parasitären Erkrankungen, wie z.B. Hakenwurmerkrankungen (Stoltzfus *et al.*, 2000) sollten als weitere Ursachen nicht unterschätzt werden.

41% der Kinder wiesen in der vorliegenden Arbeit eine vergrößerte Milz auf. Bei 48% der Kinder mit asexueller Parasitämie konnte eine Splenomegalie beobachtet werden. Dieser Prozentsatz liegt deutlich unter dem Erwarteten in hyperendemischen Gebieten, stimmt jedoch mit den Ergebnissen aus anderen Studiengebieten mit stabiler Transmission überein. Auch in einem holoendemischen Studiengebiet in Nigeria lag die Splenomegalierate mit 20% niedriger als erwartet (May *et al.*, 1999).

Das Ausmaß einer Splenomegalie war von der Höhe der Parasitendichte abhängig. Dies ist vergleichbar mit Beobachtungen in Nigeria (May *et al.*, 1999). Neben isolierten *P. falciparum*-Infektionen erhöhten Mischinfektionen das Splenomegalierisiko beträchtlich. Dabei wurde für Infektionen mit *P. falciparum* und *P. malariae* (4,4-fach) ein mehr als doppelt so hohes Risiko als für Dreifachinfektionen (2,1-fach) und isolierte *P. falciparum*-Infektionen beobachtet. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie in Nigeria. Dort gingen Infektionen mit *P. falciparum* und *P. malariae* mit einem 5,9-fachen und Dreifachinfektionen mit einem ein 2,5-fachen Splenomegalierisiko einher (May *et al.*, 1999).

4.2.3 Patienten mit komplizierter Malaria

Zerebrale Malaria und schwere Anämie sind die häufigsten Komplikationen der schweren Verlaufsform (WHO 2000). In hyperendemischen Malariagebieten mit stabiler Transmission steht als klinische Manifestation einer komplizierten Malaria häufig eine schwere Anämie im Vordergrund (Greenwood 1997; Marsh & Snow 1999; WHO 2000). Eine zerebrale Malaria tritt dagegen häufiger in Gebieten mit moderaten bzw. niedrigen Transmissionsraten und instabiler Transmission auf (Marsh & Snow 1999). Auch in unserem Studiengebiet wurde eine schwere Anämie mit 54% häufiger als eine zerebrale Malaria (19%) diagnostiziert. Von einer schweren Anämie waren mit 76,2% am häufigsten Kinder unter zwei Jahren betroffen. Das Anämierisiko

nahm mit zunehmendem Alter signifikant ab (Tab. 30). In einem hyperendemischen Gebiet in Sambia lag die Mortalität der zerebralen Malaria deutlich über der einer schweren Anämie. Jedoch waren 9,5% der stationären Aufnahmen auf eine schwere malariaassoziierte Anämie zurückzuführen und nur 4,6% auf eine zerebrale Malaria (Biemba *et al.*, 2000). Dies unterstreicht, dass die zerebrale Malaria wegen der hohen Mortalität eine gefürchtete Komplikation darstellt. In unserer Patientengruppe verstarben 11 % der Kinder an den Folgen einer komplizierten Malaria (Tab. 30). In einer klinischen Studie derselben Patientengruppe erhöhte eine schwere Anämie als alleiniges Symptom einer komplizierten Malaria die Letalität nicht, eine zerebrale Malaria ging dagegen mit einem achtfach höheren Risiko, an einer schweren Malaria zu versterben, einher (Mockenhaupt *et al.*, 2004). Dennoch nehmen schwere Anämien aufgrund ihrer hohen Prävalenz in hyperendemischen Malariagebieten einen hohen Stellenwert ein.

Als weitere typische Symptome und Kriterien einer komplizierten Malaria im Kindesalter wurden bei unseren Patienten eine Hyperlaktatämie, eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes (Prostration), eine Hyperparasitämie, Ateminsuffizienz und generalisierte Konvulsionen beobachtet.

4.2.4 Hämoglobin S (HbS) und Hämoglobin C (HbC)

4.2.4.1 Prävalenz von HbS und HbC in der Savanne Nordghanas

In der ghanaischen Bevölkerung wurden schon 1954 für HbAS (10,5%) und HbAC (17%) ähnlich hohe Prävalenzen, wie in der vorliegenden Arbeit (Tab. 17), beschrieben (Edington & Lehmann 1954). Auch die Prävalenzen in zwei weiteren Studien in der Savanne Nordghanas [HbA (66,2-69,6%), HbC und/oder HbS (26,9-29,7%)] (Koram *et al.*, 2000) sowie in Burkina Faso [HbAA (66,4%); HbAC (21,7%); HbCC (1,6%); HbAS (9,5%); HbSS (0,03%); HbSC (0,6%)] (Modiano *et al.*, 2001) stimmen mit denen unserer Untersuchung weitgehend überein. Die Prävalenz von HbC (HbAC + HbCC = 21,5%) lag auch in der hier dargestellten Arbeit über der von HbS (HbAS + HbSS = 8,7%). Es ist seit langem bekannt, dass in bestimmten Regionen Westafrikas (Ghana, Elfenbeinküste, Burkina Faso, Mali) HbC häufiger als HbS auftritt (Thompson 1963; Ringelmann *et al.*, 1976; Agarwal *et al.*, 2000).

4.2.4.2 Einfluss von HbS und HbC auf milde Manifestationen einer *P. falciparum*-Infektion und auf klinische Symptome

Der Einfluss von HbS und HbC auf submikroskopische oder asymptomatische Infektionen wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnten nur eingeschränkt Aussagen getroffen werden, da der Stichprobenumfang in den einzelnen Untergruppen gering war. Ein schützender Effekt der β -Globingenotypen auf submikroskopische oder asymptomatische Infektionen ließ sich nicht nachweisen (Tab. 20-22).

Einfluss von HbS und HbC auf eine Anämie und Splenomegalie

Die Hb-Konzentration wurde in unseren Untersuchungen weder durch HbAS noch durch HbAC beeinflusst (Tab. 24). Dies deckt sich für HbAC mit den Ergebnissen einer Studie in Mali (Diallo *et al.*, 2004). Das überrascht nicht, denn heterozygote HbS- und HbC-Merkmalsträger sind normalerweise nicht anämisch (Kleihauer *et al.*, 1996; Lukens 1999). Für HbSS und HbSC wurden dagegen signifikant niedrigere Hb-Konzentrationen beobachtet. Analog dazu waren alle Kinder mit HbSS und HbCC anämisch. Nur 71% der Kinder mit HbAA wiesen eine Anämie auf (Tab. 24). Die Unterschiede zu HbAA waren, wahrscheinlich aufgrund der geringen Fallzahl, nicht signifikant. Bei homozygoten HbS- und HbC-Merkmalsträgern sind hämolytische Anämien bekannt. Diese sind bei HbS stärker ausgeprägt als bei HbC, wo eher eine leichte hämolytische Anämie im Vordergrund steht (Kleihauer *et al.*, 1996; Lukens 1999).

Wenn Individuen mit HbAS oder HbAC vor einer *P. falciparum*-Malaria geschützt sind, wäre es möglich, dass diese Merkmalsträger auch seltener eine malariaassoziierte Anämie entwickeln. In einer Studie in Nigeria wurde bei Kindern mit α -Thalassämie ein Schutz vor dem Absinken der Hb-Konzentration durch *P. falciparum* beobachtet (Mockenhaupt *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie in Ghana über Malaria in der Schwangerschaft wurde für die α -Thalassämie ein protektiver Effekt auf eine malariaassoziierte Anämie nachgewiesen. Ein Einfluss von HbAS oder HbAC auf eine solche Anämie wurde, wie in dieser und einer Studie in Mali (Diallo *et al.*, 2004), auch dort nicht beobachtet (Mockenhaupt *et al.*, 2000).

Die Splenomegalierate wurde durch HbAS in der vorliegenden Arbeit nicht beeinflusst (Tab. 27). In einer anderen Studie in Südghana wurden ähnliche Untersuchungen durchgeführt (Burchard *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppe vermutete, dass die Prävalenz einer Splenomegalie bei heterozygoten HbS-Merkmalsträgern niedriger liegen müsste. Sie begründeten ihre Hypothese damit, dass heterozygote HbS-Merkmalsträger seltener klinische Malariaattacken erleiden und besser vor einer komplizierten Malaria geschützt sind (Hill *et al.*, 1991; Lell *et al.*, 1999). Zusätzlich könnte die Größe der Milz durch Milzinfarkte, die auch sehr selten bei

heterozygoten HbS-Merkmalsträgern auftreten, reduziert werden (O'Brien *et al.*, 1972; Castro & Winter 1978; Buch *et al.*, 1982). Diese Hypothese hat sich weder in der Arbeit von Burchard *et al.* (2001) noch in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

In unseren Untersuchungen wurde bei Kindern mit HbAC eine Splenomegalie häufiger jedoch ohne signifikante Unterschiede beobachtet (Tab.27). Eine höhere Splenomegalierate wurde auch für Kinder mit α -Thalassämie beschrieben. Diese wiesen auch häufiger Malariaattacken durch Infektionen mit *P. vivax* auf (Williams *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass die frühzeitige Infektion mit *P. vivax* über kreuzspezifische Immunmechanismen im Sinne einer natürlichen Impfung gegen *P. falciparum* wirken könnte. In der vorliegenden Studie waren Kinder mit HbC häufiger mit *P. ovale* infiziert. Auch *P. malariae*-Infektionen traten bei Kindern mit HbC häufiger auf. Die Unterschiede waren hier jedoch nicht signifikant. Die frühzeitige Infektion mit benignen Malariaerregern könnte zu einer beschleunigten Immunitätsentwicklung bzw. einer effizienteren Immunantwort führen (Kap. 4.2.4.4). Dies könnte in der höheren Splenomegalierate bei Kindern mit HbAC zum Ausdruck kommen. In einer weiteren Studie gingen höhere malariaspezifische Antikörpertiter mit einer höheren Splenomegalierate einher (Brabin *et al.*, 1990). Es wäre sinnvoll, in nachfolgenden Studien zu untersuchen, ob bei Kindern mit HbC höhere Antikörpertiter gegen malariaspezifische Antigene mit einer höheren Splenomegalierate korrelieren.

4.2.4.3 Einfluss von HbS und HbC auf die Prävalenz der Infektion mit *P. malariae* und *P. ovale*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz einer Infektion mit *P. malariae* und *P. ovale* durch HbS nicht beeinflusst (Tab. 18). Diese Beobachtung deckt sich mit zwei älteren Studien (Colbourne & Edington 1956; Power 1975). Gegensätzlich dazu erhöhte sich für heterozygote HbS-Merkmalsträger in Senegal das Risiko klinischer Malariaattacken durch *P. ovale* um das zweifache (Faye *et al.*, 2002). Davon waren fast ausschließlich jüngere Kinder betroffen. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass HbAS-Merkmalsträger ein höheres Risiko für *P. ovale*-Infektionen besitzen. Dies konnte in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden.

Vergleichbar mit dem höheren Risiko für *P. ovale*-Infektionen bei Kindern mit HbAS in Senegal konnte in der vorliegenden Arbeit für Kinder mit HbC ein höheres Risiko für *P. ovale*-Infektionen ermittelt werden. Dieses lag für Kinder mit HbCC (11-fach) noch höher als für Kinder mit HbAC (2-fach). Zusätzlich wurde für Kinder mit HbCC eine höhere Infektionsprävalenz für *P. malariae*-Infektionen, jedoch ohne signifikante Unterschiede beobachtet (Tab. 18). Die fehlende Signifikanz könnte auf die niedrige Fallzahl von HbCC (n=3)

in der Kontrollgruppe zurückzuführen sein. In einer älteren Studie in Nigeria wiesen Individuen mit HbAC ein höheres Infektionsrisiko für *P. malariae* auf (Storey *et al.*, 1979). Für Kinder mit α -Thalassämie wurde in einer Studie im Südwestpazifik ein höheres Risiko für *P. vivax*-Infektionen bestimmt (Williams *et al.*, 1996). In einer Untersuchung bei Schwangeren mit einer α -Thalassämie wurde der mildere klinische Verlauf einer *P. falciparum*-Infektion unter anderem mit einer erhöhten Anfälligkeit für *P. malariae*-Infektionen erklärt (Mockenhaupt *et al.*, 2001).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Infektionen mit *P. malariae* und *P. ovale* fast ausschließlich in Kombination mit einer *P. falciparum*-Infektion beobachtet. Der Verlauf einer Plasmodieninfektion scheint durch das gleichzeitige Vorliegen weiterer Plasmodienspezies beeinflusst zu werden (Yoeli & Sklarsh 1970; Richie 1988; Snounou *et al.*, 1992). Interaktionen zwischen den einzelnen Plasmodienspezies, wie kreuzspezifische Immunmechanismen (Maitland *et al.*, 1996) oder natürliche Resistenzen (Butcher & Clark 1990) könnten dafür verantwortlich sein. Richie (1988) folgerte aus den Ergebnissen mehrerer Studien, dass eine Plasmodienspezies die Proliferation einer anderen bis unter die Nachweisgrenze hemmen kann. Wenn, wie vermutet, zum Beispiel *P. malariae* durch kreuzspezifische Immunmechanismen eine effiziente Immunantwort gegen *P. falciparum* oder gegen seine pyrogenen Substanzen im Wirtsorganismus aufbauen kann (Black *et al.*, 1994), könnte dieser Mechanismus bei Kindern, die vor einer Infektion mit *P. falciparum* mit *P. malariae* infiziert waren, zu einer reduzierten *P. falciparum*-Parasitämie und zu einem milderem Verlauf führen. In einem mathematischen Modell nahm die Höhe der *P. falciparum*-Parasitämie bei einer vorangegangenen *P. malariae*-Infektion um ca. 50% ab (Mason *et al.*, 1999).

In einer Studie in der Elfenbeinküste wiesen Kinder mit symptomatischen *P. falciparum*-Infektionen im Vergleich zu asymptomatisch infizierten Kindern seltener Mischinfektionen auf (Black *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe führte die geringere klinische Symptomatik bei Mischinfektionen auf eine Drosselung der Zytokinkaskade durch Antikörperinteraktionen mit Malariatoxinen und auf eine Toleranzinduktion bei verlängerter Zytokinexposition zurück. Es könnte auch sein, dass die geringere klinische Symptomatik bei Mischinfektionen durch eine konstante parasitäre Exposition bei ständiger Reinfektion oder durch Prämunitio zustande kommt. Möglicherweise könnte zum Beispiel *P. malariae*, ein Erreger, der zu lang andauernden subklinischen Infektionen führen kann, für die Aufrechterhaltung einer gedrosselten Zytokinkaskade verantwortlich sein (Black *et al.*, 1994).

Die frühzeitige Infektion mit *P. ovale* oder *P. malariae* könnte im Sinne einer Impfung über kreuzspezifische Immunmechanismen zu einer Abregulierung der inflammatorischen

Zytokinkaskade führen. Dadurch könnte der Verlauf einer *P. falciparum*-Infektion bei Individuen mit HbC mildernd beeinflusst werden.

4.2.4.4 Prävalenz von HbS und HbC bei Kindern mit komplizierter Malaria

In unserer Patientengruppe wurde für HbAC eine Prävalenz von 15,9% und für HbSS eine Prävalenz von 1,0% ermittelt. Die überwiegende Mehrheit wies mit 83% den Genotyp HbAA auf. HbAS, HbCC und HbSC kamen in unserer Patientengruppe nicht vor. Ähnliche Prävalenzen bei Kindern mit komplizierter Malaria wurden von Modiano *et al.* (2001) für Burkina Faso beschrieben: HbAA 80,7%, HbAC 17,6%, HbAS 1,1%, HbCC 0,3% und HbSC 0,3%. HbSS kam in der dortigen Patientengruppe nicht vor (Modiano *et al.*, 2001). Im Vergleich zu unseren Ergebnissen wurde in Mali, wo Agarwal *et al.* (2000) die ethnische Gruppe der *Dogon* untersuchten, für HbAA mit 91,0% eine höhere- und für HbAC mit 4,5% eine niedrigere Prävalenz beobachtet. Dort wurde zusätzlich der Genotyp HbAS mit einer Prävalenz von 4,5% nachgewiesen. HbCC und HbSC lagen auch nicht vor.

4.2.4.5 Einfluss von HbS auf eine komplizierte Malaria

Es ist bekannt, dass heterozygote HbS-Merkmalsträger vor einer komplizierten Malaria geschützt sind (Hill *et al.*, 1991; Marsh 1992; Lell *et al.*, 1999; Modiano *et al.*, 2001; Aidoo *et al.*, 2002). In dieser Untersuchung konnte der schützende Effekt erneut bestätigt werden. So reduzierte sich das Risiko, an einer komplizierten Malaria zu erkranken, für Kinder mit HbAS um 98% (Tab. 34). In einer Studie in Burkina Faso reduzierte sich das Risiko, an einer klinischen Malaria (unkomplizierte Malaria und komplizierte Malaria) zu erkranken, für Kinder mit HbAS um 73% (Modiano *et al.*, 2001). Es wurde allerdings nicht zwischen einer unkomplizierten und komplizierten Malaria unterschieden, sondern der Einfluss von HbS auf eine klinische Malaria per se untersucht.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit HbAS bei nicht infizierten Kindern (Tab. 35) sowie submikroskopisch- (Tab. 36) und asymptomatisch (Tab. 37) infizierten Kindern signifikant häufiger als bei Kindern mit komplizierter Malaria beobachtet.

Verschiedene komplexe Mechanismen, die auf unterschiedlichen Ebenen wirken, scheinen beim Schutz vor einer komplizierten Malaria von Bedeutung zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz einer *P. falciparum*-Infektion durch HbAS nicht beeinflusst. Jedoch wiesen Kinder mit HbAS eine signifikant niedrigere Parasitendichte auf (Tab. 18 & 19). Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen in Nigeria (Fleming *et al.*, 1979) und in Gambia

(Allen *et al.*, 1992). In Untersuchungen in Kenia wurde für Kinder mit HbAS dagegen ein vermindertes Risiko nur bei hohen Parasitendichten (> 1000) ermittelt. Niedrige Parasitendichten (≤ 1000) wurden durch HbAS nicht beeinflusst (Aidoo *et al.*, 2002).

Für Kinder mit HbSS wurden in dieser Arbeit noch niedrigere Parasitendichten als für Kinder mit HbAS beobachtet. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Tab. 19). Die fehlende Signifikanz könnte auf die niedrige Prävalenz von HbSS (0,5%) in der Studienpopulation zurückzuführen sein. Zusätzlich reduzierte sich bei Kindern mit HbSS das Infektionsrisiko für *P. falciparum* um 80% (Tab. 18). Diese Beobachtungen stimmen mit einer Studie in Kenia überein (Aluoch 1997). HbSS scheint somit die parasitäre Proliferation stärker als HbAS zu hemmen und zusätzlich auch das Risiko einer *P. falciparum*-Infektion zu reduzieren. Der Schutz von HbS scheint dabei vom HbS-Anteil abhängig zu sein. Man könnte vermuten, dass homozygote HbS-Merkmalsträger durch diesen Schutz einen Überlebensvorteil gegenüber HbA-Merkmalsträgern besitzen. Patienten mit Sichelzellanämie weisen jedoch, bedingt durch die Komplikationen der Sichelzellanämie, ein hohes Mortalitätsrisiko auf. Zusätzlich können Sichelzellkrisen durch eine Malaria ausgelöst werden (Aluoch 1997).

Ältere Studien, zumeist auf der Grundlage von *in vitro* Untersuchungen, weisen auf eine Hemmung der intrazellulären Proliferation hin. So könnten die Parasiten z.B. durch den Sichelungsprozess zerstört werden (Luzzatto 1979). *In vitro* wurde beobachtet, dass infizierte HbS-Zellen mit einer zwei bis achtfachen Wahrscheinlichkeit den Sichelungsprozess durchlaufen als nicht infizierte HbS-Zellen (Luzzatto *et al.*, 1970). Dieser findet nur in desoxygenierten HbS-Zellen statt (Friedman 1978). Die Desoxygenierung könnte durch *P. falciparum* selbst, über einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und einer Senkung des intrazellulären pH zustande kommen. (Friedman *et al.*, 1979). Auch könnten reifere Trophozoiten und Schizonten durch Sichelung zerstört werden (Friedman 1978). Um diese Hypothesen zu bestätigen, müsste allerdings nachgewiesen werden, dass infizierte HbAS-Zellen auch *in vivo* den Sichelungsprozess durchlaufen.

Eine weitere Hypothese führt das reduzierte parasitäre Wachstum auf einen intrazellulären Kaliumverlust mit Dehydratation als Folge eines Membrandefekts der HbS-Zellen während der Sichelung zurück (Friedman *et al.*, 1979). Durch die erhöhte intrazelluläre Hämoglobinkonzentration wird die HbS-Polymerisation verstärkt (Carlson 1999). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass in desoxygenierten infizierten HbAS-Zellen die Trophozoiten durch Auslaugen ihres Zytoplasmas zerstört werden (Roth *et al.*, 1978; Friedman 1979).

Eine andere Hypothese basiert auf der erhöhten Bildung schädlicher Sauerstoffradikale in HbAS-Zellen. Der Sauerstoffverbrauch durch den Parasiten erhöht diese zusätzlich und fördert somit durch einen vorzeitigen Zelluntergang auch die Zerstörung des Parasiten (Hebbel 1990). Auch die toxische Wirkung von Ferriprotoporphyrin IX, das unter oxidativem Stress in HbAS-Zellen während der Sichelung freigesetzt wird, ist mit einer parasitären Destruktion in Zusammenhang gebracht worden (Greenwood *et al.*, 1991).

Neuere Untersuchungen weisen auf eine effizientere humorale und zelluläre Immunantwort bei heterozygoten HbS-Merkmalsträgern hin. *In vitro* Untersuchungen konnten für Individuen mit HbAS eine gesteigerte lymphozytäre Proliferation auf lösliche *P. falciparum*-Antigene nachweisen. (Bayoumi *et al.*, 1990). Diese wurde bei HbAS in Zeiten hoher Malariatransmission verstärkt beobachtet und war bei Kindern, im Vergleich zu Erwachsenen, stärker ausgeprägt. Im Gegensatz dazu wurde bei Individuen mit HbA, bei hoher Transmissionsrate, eine supprimierte T-Zellaktivität nachgewiesen (Abu-Zeid *et al.*, 1992).

In Malawi wurde bei Säuglingen mit HbAS eine höhere Infektionsprävalenz für *P. falciparum* festgestellt (Brabin *et al.*, 2004). Säuglinge sind in den ersten Lebensmonaten durch passive Immunmechanismen, wie z.B. diaplazentar- und über die Muttermilch übertragener IgG-Malariaantikörper (Hogh *et al.*, 1995) und den hohen Anteil fetalen Hämoglobins (HbF) geschützt (Pasvol *et al.*, 1976). Die frühzeitige Infektion mit *P. falciparum* könnte bei Säuglingen mit HbAS, ohne dass sie an einer klinischen Malaria erkranken, zu einer beschleunigten Immunitätsentwicklung führen. Dabei könnte durch die parasitäre Proliferation, die durch die Antikörper der Mutter in den ersten 4-6 Monaten kontrolliert wird, ein Prozess in Gang gesetzt werden, der zu einer effizienteren und/oder spezifischeren Immunantwort führt. Vergleichbar wäre dies mit der Immunantwort nach einer Impfung.

Bei infizierten Erythrozyten kommt es während der intraerythrozytären Proliferation zudem zur Expression parasitärer Neoantigene auf der Erythrozytenmembran. Diese Oberflächenproteine fungieren als Liganden an mikrovaskulären Endothelien, wodurch es zu einer Sequestration der infizierten HbAS-Zellen in mikrovaskulären Gefäßen kommt. Parasitär induzierte Oberflächenneoantigene auf infizierten HbAS-Zellen während der Sichelung modifiziert vorzuliegen (Abdulhadi 2003). Diese Modifikationen könnten über eine Änderung der antigenen Eigenschaften zu einer höheren Antigenität führen. Eine spezifischere und effizientere Immunantwort, die zu einer verstärkten Eliminierung der infizierten Erythrozyten führt, könnte die Folge sein. In Gambia wurden für heterozygote HbS-Merkmalsträger signifikant höhere Antikörpertiter gegen parasitäre Neoantigene nachgewiesen (Marsh *et al.*, 1989). Eine höhere Antigenität wird z. B. auch für die α - und β -Thalassämie vermutet, wo auf infizierten α - und

β -Thalassämie-Zellen *in vitro* größere Mengen spezifischer Antikörper gebunden wurden als auf normalen HbA-Zellen (Luzzi *et al.*, 1991).

Kürzlich wurde *in vitro* beobachtet, dass nicht nur mit Ringformen infizierte G6PD-Erythrozyten und β -Thalassämiezellen (Cappadoro *et al.*, 1998), sondern auch infizierte HbAS-Zellen verstärkt durch Monozyten phagozytiert werden (Ayi *et al.*, 2004). Auf den Membranen dieser Erythrozyten wurden Opsonine, wie autologes IgG, C3c-Komplementfragmente und aggregierte Bande 3-Proteine, in höherer Konzentration als auf normalen Erythrozyten vorgefunden. Ein Schutz könnte somit durch eine verstärkte komplementvermittelte Phagozytose von infizierten HbAS-Zellen zustande zu kommen. Dabei scheinen ähnliche Prozesse wie bei alternden oder oxidativ geschädigten normalen Erythrozyten abzulaufen (Beppu *et al.*, 1990; Low 1991; Lutz *et al.*, 1993).

Parasitäre Neoantigene sind entscheidend an pathogenen Prozessen der komplizierten Malaria, wie Zytoadhärenz, Rosetting und der Freisetzung von Zytokinen, beteiligt (Chen *et al.*, 2000). Modifizierte Oberflächenproteine könnten jedoch nicht nur zu einer gesteigerten parasitären Eliminierung, sondern auch zu einer Minderung der Zytoadhärenz und des Rosettings führen. *In vitro* konnte für infizierte HbSS-Zellen eine reduzierte Zytoadhärenz an Endothelzellen, wahrscheinlich über Modifikation des ICAM-Rezeptors, nachgewiesen werden. Dies wurde auch an infizierten HbAS-Zellen, jedoch in geringerer Ausprägung, beobachtet (Rowland *et al.*, 1993). Zusätzlich könnte auch die Überproduktion von Zytokinen, wie TNF- α ; INF- γ und Interleukinen, verhindert werden (Abdulhadi 2003). Obwohl Zytokine in moderater Konzentration an der immunologischen Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind, führt eine Überproduktion jedoch zu einer Schädigung des menschlichen Organismus (Chen *et al.*, 2000).

Einen weiteren Schutzfaktor könnte die verminderte Fähigkeit von HbS-Erythrozyten zum Rosetting darstellen. Bisher wurden dazu *in vitro* gegensätzliche Beobachtungen gemacht. Eine Arbeitsgruppe konnte keine Unterschiede in der Rosettingfähigkeit zwischen HbAS- und HbAA-Zellen feststellen (Udomsangpetch *et al.*, 1993). In einer anderen Studie wurde dagegen nachgewiesen, dass HbS-Erythrozyten wesentlich kleinere und schwächere Rosetten bilden als normozytäre HbAA-Zellen (Carlson *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe führte das eingeschränkte Rosetting auf veränderte mechanische Eigenschaften der HbS-Erythrozyten (Verformung und stärkere Rigidität) während der Sichelung zurück. Rosetting wird über spezifische Rezeptoren (Rossetins) auf der Membran infizierter Erythrozyten, die an Rezeptoren auf nicht infizierten Erythrozyten binden, vermittelt (Helmby *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2000). Während der Sequestration infizierter HbAS-Erythrozyten in den postkapillären Gefäßen könnte es durch unzureichende Oxygenierung zur Sichelung der infizierten HbAS-Erythrozyten kommen. Die

Verformung und stärkere Rigidität dieser gesichelten Zellen könnte eine Rezeptorbindung verhindern oder zumindest stark einschränken (Carlson *et al.*, 1994). Rosetting wird insbesondere bei einer zerebralen Malaria (Chen *et al.*, 2000), aber auch bei Kindern mit schwerer Anämie gesehen (Newbold *et al.*, 1997). Somit könnte ein reduziertes Rosetting bei HbS-Merkmalsträgern nicht nur vor einer zerebralen Malaria, sondern auch vor einer schweren Anämie Schutz bieten.

4.2.4.6 Einfluss von HbC auf eine komplizierte Malaria

Ob neben HbS auch HbC vor einer komplizierten Malaria schützt, wurde lange gegensätzlich diskutiert (Thompson 1962; Gilles *et al.*, 1967; Ringelmann *et al.*, 1976; Guinet *et al.*, 1997). Ausgehend von der begrenzten Verbreitung in Gebieten Westafrikas und des milden Krankheitsbildes homozygoter Merkmalsträger gingen einige Arbeitsgruppen davon aus, dass die hohe Zahl von Individuen mit HbC das Ergebnis eines Gründereffektes ohne nennenswerte Selektion sein könnte [Murray 1982 zit. n. ((Guinet *et al.*, 1997))]. Die Ergebnisse der hier dargestellten Studie sprechen jedoch eindeutig für selektive Mechanismen. So wich die Prävalenz der β -Globingenotypen in der Studienpopulation der „Northern Region“ nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Die Verteilung der β -Globingenotypen in der Patientengruppe mit komplizierter Malaria dagegen schon. Diese Selektion könnte durch einen Überlebens- und Reproduktionsvorteil, bedingt durch einen milderen Krankheitsverlauf einer Malaria bei Merkmalsträgern von HbC im Vergleich zu HbA-Merkmalsträgern, zustande kommen.

Neuere Untersuchungen unterstützen diese These. Es gibt inzwischen eindeutige Hinweise, dass die hohe Prävalenz von HbC in Westafrika auf eine erhöhte Resistenz gegenüber einer *P. falciparum*-Malaria zurückzuführen ist (Agarwal *et al.*, 2000; Modiano *et al.*, 2001; Rihet *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte der Schutz von HbAC vor der komplizierten Verlaufsform erstmalig für ein hyperendemisches Gebiet, die Savanne Nordghanas, bestätigt werden. Das Risiko einer komplizierten Malaria reduzierte sich für Kinder mit HbAC um 35%. Dies ist vergleichbar mit zwei vorangegangenen Fall-Kontrollstudien in Mali und in Burkina Faso (Agarwal *et al.*, 2000; Modiano *et al.*, 2001). In Mali reduzierte sich das Risiko, aus einer unkomplizierten Malaria eine schwere Verlaufsform zu entwickeln, für Kinder mit HbC (HbAC und HbCC) um 78% (Agarwal *et al.*, 2000). Der Schutz dort war höher als in der hier vorliegenden Studie. Die Arbeitsgruppe in Mali unterschied allerdings nicht zwischen der homo- und heterozygoten Form von HbC, sondern untersuchte den Einfluss von HbC insgesamt.

In Burkina Faso konnte für HbC ein Schutz vor einer klinischen *P. falciparum*-Malaria nachgewiesen werden. Dort reduzierte sich das Risiko einer klinischen Malaria (unkomplizierte und komplizierte Verlaufsform) für Kinder mit HbAC um 29% und für Kinder mit HbCC sogar um 93% (Modiano *et al.*, 2001). Der ermittelte Schutz für HbAC liegt in der Studie von Modiano *et al.* (2000) ähnlich hoch wie in der hier dargestellten Arbeit. Zusätzlich liegen die Konfidenzintervalle der ermittelten „odds ratio“ für HbC in der hier vorliegenden Arbeit (OR = 0,64; 95% KI = 0,4 – 0,9) sowie in den Untersuchungen in Mali (OR = 0,22; 95% KI = 0,04 – 0,74) und Burkina Faso (OR = 0,71; 95% KI = 0,58 – 0,87) in überlappenden Bereichen.

Für Kinder mit HbAS lag auch in unserer Studienpopulation ein höherer Schutz als für Kinder mit HbAC vor (Risikoreduktion 98% vs. 35%). Dies erklärt nicht, warum HbC in einigen Gebieten Afrikas häufiger vorkommt als HbS und warum die Verbreitung von HbC auf wenige Regionen in Westafrika beschränkt ist. Eine Erklärung könnte sein, dass diese Mutation erst kürzlich entstanden ist. Eine andere Hypothese geht davon aus, dass bei Koexistenz von HbS und HbC und protektivem Effekt beider Hämoglobingenotypen gegenüber einer komplizierten Malaria, HbC das HbS auf längere Sicht verdrängen könnte. Der mildere Krankheitsverlauf homo- und heterozygoter HbC-Merkmalsträger ginge mit einem höheren Überlebens- und Reproduktionsvorteil gegenüber homozygoten HbS- und HbSC-Merkmalsträgern einher, die eine hohe Morbidität und Mortalität aufweisen (Modiano *et al.*, 2001). Es ist jedoch fraglich, ob der wesentlich schwächer ausgeprägte Schutz von HbAC ausreicht, um den Nachteil homozygoter HbS-Merkmalsträger auszugleichen, da auch heterozygote HbS-Merkmalsträger klinisch nicht beeinträchtigt sind.

Komplexe, teilweise paradoxe Mechanismen scheinen beim Schutz von HbAC vor einer komplizierten Malaria eine Rolle zu spielen. In der hier dargestellten Arbeit wurden die Infektionsprävalenz von *P. falciparum* und die Parasitendichte durch HbC (HbAC und HbCC) nicht beeinflusst (Tab. 18 & 19). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen epidemiologischer Studien (Storey *et al.*, 1979; Agarwal *et al.*, 2000; Burchard *et al.*, 2001; Modiano *et al.*, 2001).

Auch *in vitro* Studien weisen auf eine ungestörte Proliferation in HbAC-Zellen hin (Friedman *et al.*, 1979; Olson & Nagel 1986). Dem widersprechend wurde in einer Studie in Burkina Faso eine negative Korrelation zwischen HbC und der Parasitendichte bei Kindern mit unkomplizierter Malaria beschrieben (Rihet *et al.*, 2004). Allerdings wurde dort nicht zwischen der homo- und der heterozygoten Form von HbC unterschieden. *In vitro* Untersuchungen weisen, im Gegensatz zu unseren *in vivo* Beobachtungen, auf eine gehemmte parasitäre Proliferation in homozygoten HbC-Zellen hin. In einem Großteil der untersuchten HbCC-Zellen

wurden zerstörte Ringformen und Trophozoiten nachgewiesen (Friedman *et al.*, 1979; Fairhurst *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit waren die maximalen Parasitendichten bei Kindern mit HbCC reduziert (Tab. 19). Aufgrund der niedrigen Probandenzahl mit HbCC ist es schwierig, allgemeine Schlussfolgerungen aus dieser Beobachtung zu ziehen. Es wäre jedoch möglich, dass aus einigen HbCC-Zellen keine Freisetzung der Merozoiten erfolgt, diese absterben und dadurch der intraerythrozytäre Zyklus unterbrochen wird. Degenerierte Schizonten wurden in HbCC-Zellen schon häufiger beobachtet (Nagel 1990). Auch die hohe Rigidität von HbC-Zellen und die verstärkte Kristallbildung von HbC im oxygenierten Zustand könnte das parasitäre Wachstum erschweren (Booth & Mead 1983). Weiter wird diskutiert, ob es, wie bei Kindern mit einer β -Thalassämie (Weatherall *et al.*, 2002), auch bei Individuen mit HbS und HbC in den ersten Lebensjahren zu einer verzögerten Produktion von adultem Hämoglobin kommt und HbF länger vorhält (Olson & Nagel 1986; Nagel 1990). Aus *in vitro* Untersuchungen ist bekannt, dass HbF die parasitäre Proliferation hemmt (Pasvol *et al.*, 1977). Dies könnte ein weiterer protektiver Effekt in den ersten Lebensjahren sein.

Ähnlich wie bei HbAS scheinen auch bei HbC veränderte Immunmechanismen, die z.B. zu einer verstärkten parasitären Eliminierung, zu einer reduzierten Zytoadhärenz und zu einem verminderten Rosetting führen, für den Schutz vor einer komplizierten Malaria verantwortlich zu sein. In einer älteren Studie wurden bei Individuen mit HbAC höhere, jedoch unspezifische IgG-Konzentrationen beschrieben. Dies wurde mit einem Schutz vor Malaria in Zusammenhang gesehen (Storey *et al.*, 1979). Neuere *in vitro* Untersuchungen weisen auf modifizierte Oberflächenneoantigene auf Erythrozyten mit reifen Trophozoiten hin. Parasitäre Neoantigene wie z. B. *PfEMP-1* (*P. falciparum*-Erythrozytenmembranprotein-1) fungieren als Rezeptoren zur Adhäsion mikrovaskulären Endothelien oder beim Rosetting und sind für die Sequestration infizierter Erythrozyten im Gehirn und in anderen Organen verantwortlich. Zusätzlich entgehen die infizierten Erythrozyten durch die Sequestration der Eliminierung in der Milz (Aikawa *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2000). Auf HbCC-Zellen wurden solche parasitären Neoantigene in veränderter Form und in geringerer Anzahl als auf HbAA-Zellen nachgewiesen (Fairhurst *et al.*, 2003). In einer kürzlich durchgeführten Studie konnten diese modifizierten parasitären Polypeptide nicht nur auf HbCC-, sondern auch auf HbAC-Zellen identifiziert werden. Diese waren aggregierter und mit 120 nm Durchmesser größer als eine andere Polypeptidgruppe mit nur 70 nm Durchmesser. Diese vergrößerten Aggregate wurden am häufigsten auf HbCC-Zellen, seltener auf HbAC-Zellen und nur sehr selten auf HbAA-Zellen gefunden (Arie *et al.*, 2005). Die

Exprimierung dieser veränderten Oberflächenproteine scheint vom HbC-Anteil abhängig zu sein (Fairhurst *et al.*, 2005).

Durch diese Modifikation könnten nicht nur die antigenen Eigenschaften verändert, sondern auch die Adhärenz infizierter Erythrozyten an mikrovaskuläre Endothelien reduziert und darüber eine Sequestration der infizierten Erythrozyten in den postkapillaren Gefäßen verhindert werden. Dies könnte wiederum zu einer verstärkten Eliminierung in der Milz führen. So scheint z.B. *PfEMP-1*, ein parasitäres Neoantigen, das als wichtiger Ligand bei der Zytoadhärenz identifiziert wurde (Chen *et al.*, 2000), auf HbC-Zellen modifiziert exprimiert zu werden (Arie *et al.*, 2005). In einer weiteren Untersuchung stellte sich *PfEMP-1* unter dem Fluoreszenzmikroskop auf infizierten HbCC-Erythrozyten im Vergleich zu HbAA-Erythrozyten wesentlich schwächer sowie unregelmäßiger und weit verteilt dar. Nur ein Teil der HbAC-Erythrozyten (ca. 25%) wies ähnliche Strukturveränderungen für *PfEMP-1* wie auf HbCC-Zellen auf. Zusätzlich wurde *in vitro* für HbAC-Zellen eine um 25% verminderte Zytoadhärenz und für HbCC-Zellen eine fehlende Zytoadhärenz an endotheliale Rezeptoren wie *ICAM-1* und *CD36* beobachtet (Fairhurst *et al.*, 2005).

Des Weiteren wurde *Bande 3*-Protein, ein weiteres parasitäres Neoantigen, auf infizierten HbCC-Zellen in veränderter Form und Größe vorgefunden. *Bande 3*-Protein lag im Vergleich zu infizierten HbAA-Zellen (Durchmesser 500 nm) auf HbCC-Erythrozyten häufiger und zusätzlich vergrößert (1µm Durchmesser) vor (Tokumasu *et al.*, 2005). Dies könnte zu einer verstärkten Opsonierung durch autologes IgG und Komplement mit einer Elimination der infizierten HbC-Erythrozyten in der Milz führen. Kürzlich wurden membrangebundene Autoantikörper auf HbAC-Erythrozyten und in noch höherer Konzentration auf HbCC-Erythrozyten nachgewiesen. Auf HbAA-Erythrozyten wurden dagegen keine Autoantikörper gefunden (Fairhurst *et al.*, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit höhere Splenomegalierate bei Kindern mit HbAC könnte z.B. durch die gesteigerte Phagozytose von HbAC-Erythrozyten zustande kommen. Eine gesteigerte Phagozytose wie für HbAS, die α -Thalassämie und G6PD-Mangel beobachtet, konnte *in vitro* für HbAC bisher nicht nachgewiesen werden (Cappadoro *et al.*, 1998; Ayi *et al.*, 2004).

Einen weiteren Schutzfaktor könnte ein vermindertes Rosetting von HbC-Zellen darstellen. *In vitro* konnte für HbAC und HbCC ein abgeschwächtes Rosetting durch Modifikationen des *PfEMP-1* Rezeptors nachgewiesen werden. Bei HbAC-Erythrozyten reduzierte sich die Rosettinghäufigkeit gegenüber HbAA-Erythrozyten um 33%. Bei HbCC-Erythrozyten wurde Rosetting noch seltener beobachtet (Fairhurst *et al.*, 2005). Ein vermindertes Rosetting bei HbC-Erythrozyten könnte somit einerseits auf modifizierte Oberflächenproteine wie *PfEMP-1*,

andererseits auf die Mikrozytose der HbC-Erythrozyten zurückzuführen sein. Bei der α - und β -Thalassämie sowie bei HbAS wurde *in vitro* beobachtet, dass diese mikrozytären Erythrozyten, im Vergleich zu HbAA, wesentlich kleinere und schwächere Rosetten bilden (Carlson *et al.*, 1994). Diese Korrelation wurde unabhängig von der Ursache der Mikrozytose festgestellt. HbC-Erythrozyten weisen auch eine höhere Zellrigidität auf (Booth & Mead 1983), die bei infizierten Erythrozyten durch das parasitäre Wachstum weiter zunimmt (Dondorp *et al.*, 2000; Glenister *et al.*, 2002). Auch diese Prozesse könnten zu einer reduzierten Zytoadhärenz bzw. einem verminderten Rosetting und damit zu einer verstärkten Eliminierung in der Milz beitragen. Ein zusätzlicher Schutz könnte durch das höhere Infektionsrisiko von HbC-Merkmalsträgern mit benignen Malariaerregern (*P. ovale* und *P. malariae*), wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, entstehen. So könnte die frühzeitige Infektion mit benignen Malariaerregern zu einer beschleunigten Immunitätsentwicklung mit einer Abregulierung der Zytokinkaskade führen. (Kapitel: 4.2.4.5).

Auch die Selektion von weniger virulenten *P. falciparum*-Stämmen könnte beim Schutz vor einer komplizierten Malaria eine Rolle spielen. In einer Studie in Nordghana wurde die Prävalenz der *P. falciparum*-Varianten *msp1* und *msp 2* jedoch weder durch HbAS noch durch HbAC beeinflusst (Mockenhaupt *et al.*, 2004).

Weiter könnten unbekannte genetische Faktoren den Verlauf einer *P. falciparum*-Infektion in den einzelnen Bevölkerungsgruppen zusätzlich beeinflussen. In Burkina Faso wurden z.B. bei den *Mossi*, *Fulani* und *Rimaibe* deutliche Unterschiede in der Prävalenz einer *P. falciparum*-Infektion, der klinischen Ausprägung einer Malaria sowie der Prävalenz und Höhe der Antikörper gegen verschiedene *P. falciparum*-Antigene beschrieben (Modiano *et al.*, 1999). In Mali wurden für die Gruppe der *Fulani* höhere Splenomegalieraten, höhere malariaspezifische Antikörper, niedrigere Parasitendichten und weniger Malariaattacken als bei den *Dogon* beobachtet. Paradoxerweise wurde jedoch HbC häufiger in der Gruppe der *Dogon* vorgefunden (Dolo *et al.*, 2005). Auch in unserer Studienpopulation gehörten die Probanden mehr als sieben verschiedenen ethnischen Gruppen an (*Dagomba*, *Gonja*, *Komkomba*, *Frafa*, *Basare*, *Fulani*, *Chimbulisi*), wobei die Gruppe der *Dagomba* mit rund 85% die Mehrheit bildeten. Auf eventuelle Unterschiede innerhalb einzelner ethnischer Gruppen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen. Dies sollte in zukünftigen Studien beachtet werden.

Einfluss von HbS und HbC auf klinische Symptome einer komplizierten Malaria

Eine schwere Anämie trat in unserer Studienpopulation mit 54% häufig auf. Dass HbAC wie vermutet vor allem vor einer schweren Anämie schützt, hat sich in der vorliegenden Arbeit nicht

bestätigt. Auch die übrigen klinischen Symptome einer komplizierten Malaria wurden nicht durch HbAC beeinflusst. Obwohl mit insgesamt 290 Kindern ein relativ großes Patientenkollektiv vorlag, entstanden nach Aufteilung bezüglich klinischer Symptome relativ kleine Untergruppen. Somit könnte die fehlende Signifikanz eventuell auf den geringen Stichprobenumfang der einzelnen Untergruppen zurückzuführen sein. Vergleichbar mit diesen Ergebnissen konnte auch in Mali kein Einfluss von HbC auf eine schwere Anämie beobachtet werden. Dort erkrankten jedoch Kinder mit HbAC und HbCC signifikant seltener an einer zerebralen Malaria (Agarwal *et al.*, 2000). Hinweise, dass HbC vielleicht doch vor einer schweren Anämie schützt, gibt eine weitere Studie aus Mali (Guinet *et al.*, 1997). In dieser wurde bei keinem der Kinder mit HbC eine schwere Anämie beobachtet. Die Unterschiede zu Kindern mit HbAA waren jedoch nicht signifikant. Grund dafür könnte auch dort die niedrige Probandenzahl mit schwerer Anämie in der Untersuchungsgruppe sein.

Ob HbAS auch vor der Manifestation einzelner klinischer Symptome einer komplizierten Malaria schützt, und somit insbesondere das Risiko einer schweren Anämie und einer zerebralen Malaria reduziert, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da HbAS in der Patientengruppe mit komplizierter Malaria nicht vorkam. Zwei Fall-Kontrollstudien in Gambia (Hill *et al.*, 1991) und in Kenia (Marsh 1992) geben Hinweise, dass HbAS sowohl vor einer zerebralen Malaria als auch vor einer schweren Anämie schützt. In beiden Studien reduzierte sich das Risiko bei Kindern mit HbAS sowohl für eine zerebrale Malaria als auch für eine schwere Anämie um mehr als 90%. In einer weiteren Untersuchung in Nigeria erkrankten zwar Kinder mit HbAS und HbAA gleichhäufig an einer zerebralen Malaria, jedoch wurden Unterschiede in der Mortalität beobachtet. Infolge der erhöhten Sichelungsrate hatten Kinder mit HbAS zwar einen höheren Bedarf an Bluttransfusionen, jedoch starb keines dieser Kinder an den Folgen einer zerebralen Malaria. Dagegen lag die Mortalität der zerebralen Malaria für Kinder mit HbAA bei 18% (Olumese *et al.*, 1997). Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass HbAS die Manifestation einer zerebralen Malaria nicht verhindert, jedoch die Mortalität dieser Komplikation senkt.

4.2.5 Ausblick

Für HbC-Merkmalsträger konnte in der Savanne Nordghanas erstmals ein Schutz vor der komplizierten Verlaufsform einer Malaria nachgewiesen werden. Somit scheint HbC nicht nur in Regionen mit vorwiegend zerebraler Malaria, sondern auch in Gebieten, in denen als Komplikation eine schwere Anämie im Vordergrund steht, Schutz zu bieten. Ob neben der

heterozygoten Form (HbAC) auch die homozygote Form (HbCC) vor einer komplizierten Malaria schützt, konnte aufgrund der niedrigen Prävalenz von HbCC (0,8%) im Studiengebiet nicht untersucht werden. Es wäre sinnvoll, diese Untersuchungen in einem größeren Stichprobenumfang zu wiederholen.

Milde Manifestationen einer *P. falciparum*-Infektion, wie submikroskopische- und asymptomatische Infektionen, wurden durch HbAS und HbAC nicht beeinflusst. Ob diese Hämoglobinopathien vor einer unkomplizierten Malaria schützen, wurde aufgrund der niedrigen Prävalenz einer unkomplizierten Malaria im Studiengebiet (2,8%) nicht untersucht. Dies sollte während der Regenzeit bestimmt werden, da die Prävalenz einer unkomplizierten Malaria in dieser Zeit höher liegt. Allgemein wird davon ausgegangen, dass der schützende Einfluss dieser Hämoglobinopathien mit der Progression einer Malaria, d.h. mit der Schwere der Erkrankung, zunimmt (Carlson 1999). Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, in der milde Manifestationen einer *P. falciparum*, wie submikroskopische und asymptomatische Infektionen, durch HbAS und HbAC nicht beeinflusst wurden. Für beide β -Globingenotypen konnte jedoch ein Schutz vor der schweren Verlaufsform nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlaubten Aussagen zum Infektionsrisiko einer *P. falciparum*-, *P. malariae*- und *P. ovale*-Infektion sowie zur parasitären Proliferation. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Schutz vor einer komplizierten Malaria vorwiegend auf einer effizienteren Immunantwort beruhen könnte. Dabei scheinen parasitär induzierte Oberflächenneoantigene, die auf HbS- und HbC-Erythrozyten modifiziert vorliegen, eine Rolle zu spielen. Höhere Antikörpertiter gegen solche Neoantigene wurden für HbAS (Marsh *et al.*, 1989) und vor kurzem auch für HbAC und HbCC (Fairhurst *et al.*, 2005) beschrieben. Epidemiologische Untersuchungen zu einer veränderten zellulären und humoralen Immunantwort bei Individuen mit HbS und HbC, wie z.B. die Bildung von Antikörpern gegen parasitäre Neoantigene, könnten hier neue Erkenntnisse bringen. Weiterführende Untersuchungen zu modifizierten Oberflächenneoantigenen, die bei HbS- und HbC-Merkmalsträgern zu einer effizienteren Immunantwort führen, könnten in Zukunft dazu beitragen, effiziente Malariainpfstoffe und neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Für die Entwicklung eines Malariainpfstoffes wurde z.B. *Bande 3*-Antigen, welches auf infizierten HbC-Zellen modifiziert vorliegt und mit einer effizienteren Immunantwort in Verbindung gebracht wird, vorgeschlagen (Kennedy 2001).