

2. Wirts- und Parasitenfaktoren bei der Malaria tropica

2.1. Malaria

2.1.1. Entwicklungszyklus des Erregers

Die Malaria wird durch nacht- und dämmerungsaktive, weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen. Der parasitäre Entwicklungszyklus unterteilt sich in die asexuelle Vermehrung im Mensch und in die sexuelle Vermehrung im Vektor. Sporozoiten aus den Speicheldrüsen infizierter *Anopheles* werden während einer Blutmahlzeit inokuliert und befallen binnen Minuten Leberparenchymzellen. Dort findet eine asexuelle Teilung statt, an deren Ende die Freisetzung von mehreren Tausend Merozoiten in die Zirkulation steht. Die Dauer dieser Gewebsschizogonie entspricht der Inkubationszeit von fünf bis sechzehn Tagen, kann aber auch wesentlich länger dauern. Bei Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* kann ein Teil der Erreger in einem hepatischen Ruhestadium (Hypnozoiten) verbleiben und nach Monaten bis Jahren wieder in den Zyklus eintreten. Die Merozoiten befallen Erythrozyten und durchlaufen Stadien der erythrozytären Schizogonie (Ring, Trophozoit, Schizont), an deren Ende die Lyse der Zellen, Freisetzung von Merozoiten und erneute Invasion von Erythrozyten steht. Ein Teil der Erreger differenziert zu geschlechtlichen Gametozyten, die von *Anopheles* aufgenommen werden. Der sexuelle Entwicklungszyklus in der Mücke (Sporogonie) endet mit der Ausbildung infektiöser Sporozoiten. Kongenitale Infektionen treten ebenso auf wie die Übertragung durch Transfusionen, sind jedoch selten (White, 1996).

2.2.2. Pathophysiologie

Symptome werden durch die erythrozytären Formen verursacht. Die pathogenetisch bedeutsamen Vorgänge werden dabei aber nur unvollständig verstanden. Der Schweregrad der Erkrankung ist durch mehrere, z. T. ineinander greifende Prozesse bedingt. Wesentlich sind hierbei die Freisetzung von Parasitenbestandteilen, pro-inflammatorische Zytokinausschüttung, gesteigerte Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle mit nachfolgender Sequestrierung infizierter Erythrozyten und vermindertem Blutfluss in abhängigen Geweben. Der Übergang von asymptomatischer Infektion zu schwerer und komplizierter Malaria unterliegt dabei Einflüssen von Seiten des Wirts wie auch des Parasiten. Primär vorteilhafte pro-inflammatorische Antworten im Sinne antiparasitärer Kontrolle tragen bei überschüssiger Reaktion zur Pathophysiologie bei.

Bei der Lyse parasitierter Erythrozyten werden Pyrogene freigesetzt. Diese bislang wenig charakterisierten Parasitenbestandteile, zusammengefasst unter den Begriff des Malaria-Toxins, induzieren die Ausschüttung von Zytokinen. Dabei handelt es sich zumindest teilweise um parasitäres Glykosylphosphatidylinositol (GPI). GPI induziert die monozytäre Produktion von u. a. Tumornekrosefaktor (TNF)- α , der eine zentrale Rolle in der Pathogenese der zerebralen Malaria zu spielen scheint (Grau *et al.*, 1989; Schofield *et al.*, 1996; Schofield *et al.*, 2002). TNF- α und weitere pro-inflammatorische Mediatoren wirken pyrogen. Fieber ist eine wirksame antiparasitäre Antwort des Wirts (Kwiatkowski, 1991). GPI im Zusammenspiel mit TNF- α fördert die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen (Schofield *et al.*, 1996). Zudem wird die Induktion weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren wie Interferon- γ , Stickoxid (NO), oder Interleukin (IL)-6 durch GPI vermutet (Clark & Cowden, 2003). Die Bedeutung von GPI und der induzierten inflammatorischen Kaskade zeigt sich im Tiermodell. Die Impfung mit synthetischem GPI resultiert bei nachfolgend mit *P. berghei* infizierten Mäusen in Schutz vor zerebraler Pathologie, Azidose und Lungenödem. Ein Effekt auf die Parasitendichte wird dabei jedoch nicht beobachtet (Schofield *et al.*, 2002).

Die Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten im peripheren Gefäßbett beeinträchtigt die Mikrozirkulation und führt in einem Gewebe-abhängigen Ausmass zu lokaler Hypoxie, Zell- und Organschädigung. Bei zerebralem Befall finden sich Mikrohä-morrhagien, Nekrosen und entzündliche Reaktionen. Der Effekt der Sequestrierung zeigt sich auch im peripheren Blut, wo nahezu ausschliesslich Ringformen von *P. falciparum* nachweisbar sind. Daher spiegelt, abhängig vom Entwicklungszyklus, die periphere Parasitendichte die tatsächliche Parasitenlast nur unzureichend wider (White, 1996; Miller *et al.*, 2002). Bei Schwangeren kommt es zur Sequestrierung von *P. falciparum* im intervillösen Raum (Bulmer *et al.* 1993). Mütterliche Anämie, Behinderung der lokalen Zirkulation und Ausschüttung inflammatorischer Zytokine tragen zu Abort, Frühgeburtlichkeit und intrauteriner Wachstumsretardierung bei (Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.*, 2000b). Die Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten wird durch Rezeptor-Liganden-Bindung zwischen parasitärem Neoantigen einerseits und vaskulären Adhäsionsmolekülen andererseits vermittelt. Dieser Zytoadhärenz liegt auf Seiten des Parasiten die Expression u. a. von PfEMP1 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*) zugrunde. Dieses durch hochvariable *var*-Gene codierte Protein findet sich in Protrusionen der Membran infizierter Erythrozyten und vermittelt nicht nur die Adhäsion an geeignete Endothelrezeptoren sondern auch die Bindung nicht-infizierter Erythrozyten (Baruch *et al.*, 1995; Reeder *et al.*, 1999; Gamain *et al.*, 2001; Rowe *et al.*, 2002). Zwar bindet PfEMP1 an unterschiedlichste Liganden, im einzelnen

erythrozytären Parasiten wird jedoch nur eine der zahllosen Varianten des *var*-Gens exprimiert (Chen *et al.*, 1998). Daraus ergibt sich z. B., dass Stämme mit Spezifität für den mikrovaskulären Hauptrezeptor CD36 nicht an andere Rezeptoren z. B. plazentaren Endothels binden können (Gamain *et al.*, 2001). Folglich liegt es nahe, dass die Manifestation der Malaria tropica zumindest teilweise durch die Spezifität der Bindungseigenschaften unterschiedlicher Stämme von *P. falciparum* und dem dadurch vermittelten Ausmass und der Lokalisation von Sequestrierung bedingt ist (Miller *et al.*, 2002). Auf Wirtsseite wurden mehrere Liganden für PfEMP1 identifiziert. Dazu zählen CD31 (PECAM, *platelet endothelial cell adhaesion molecule*), CD36, VCAM-1 (*vascular cellular adhaesion molecule-1*), CSA (Chondroitinsulfat A), Hyaluronsäure, Thrombospondin, ELAM-1 (*erythrocyte leukocyte adhaesion molecule-1*) und ICAM-1 (*intracellular adhaesion molecule-1*) (Übersicht bei Miller *et al.*, 2002). Insbesondere bei zerebraler Malaria wird eine gesteigerte Bindungsfähigkeit von *P. falciparum* gegenüber ICAM-1 einerseits und eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls andererseits beobachtet. Der Sequestrierung folgt die lokale Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren wie TNF- α und NO, die in Folge die weitere Expression von Adhäsionsmolekülen und letztlich mikrovaskuläre Zirkulationsstörungen verursacht (Berendt *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2002; Clark & Cowden, 2003).

Anämie ist eine obligate Folge einer Malaria und in schwerer Ausprägung die führende Manifestationsform schwerer Malaria bei jungen Kindern in den Hochendemiegebieten (WHO, 2000b). Die Pathogenese ist multifaktoriell und kann in gesteigerten Erythrozytenabbau und verminderte Erythrozytenproduktion unterteilt werden. Die jeweiligen Anteile sind dabei u. a. abhängig vom Immunstatus, Alter und lokaler Endemizität. (Menendez *et al.*, 2000a). Die Hämolyse parasitär befallener Erythrozyten bei der Ruptur des reifen Schizonten ist offenkundig. Durch die Aktivierung des retikuloendothelialen Systems werden infizierte, und in einem höheren Masse auch nicht-infizierte, Erythrozyten vorwiegend in der Milz hämolysiert. Letzterem Befund liegen eine erhöhte Rigidität nicht-infizierter Erythrozyten und die Membranbindung von Parasitenbestandteilen zugrunde (Dondorp *et al.*, 1999). Der Hypersplenismus bei akuter Malaria geht zudem mit erhöhtem lienalen *Pooling* und verkürzter Erythrozytenlebensdauer einher (Angus *et al.*, 1997). Der Beitrag einer Autoimmunhämolyse infolge der Ablagerung von IgG und Komplementfaktoren in der Membran nicht-infizierter Erythrozyten wird uneinheitlich beurteilt (Menendez *et al.*, 2000a). Während der akuten Malaria wird eine der Anämie inadäquate Funktion des erythropoetischen Systems beobachtet. Die Freisetzung von Retikulozyten ist trotz erhöhter Erythropoetin-Spiegel reduziert. Die Erythropoetin-Konzentration entspricht zudem nicht dem Ausmass der Anämie. Diese Kno-

chenmarkssuppression persistiert auch bei Parasiteneliminierung für einige Wochen (Burchard *et al.*, 1995; El-Hassan *et al.*, 1997; Camacho *et al.*, 1998). Bei chronisch-rezidivierenden oder persistierenden Infektionen zeigt das Knochenmark Dyserythropoese und Erythrophagozytose (Abdalla *et al.*, 1980; Clark *et al.*, 1988). Ob diesem Befund der Effekt erhöhter TNF- α -Spiegel (Clark *et al.*, 1988), andere Serumfaktoren oder ein Ungleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (Kurtzhals *et al.*, 1998; *et al. et al.*, 1999) zugrunde liegen, ist nicht abschliessend geklärt (Menendez *et al.*, 2000a). Weitere häufige Ursachen einer Anämie in den Endemiegebieten wie Eisen- und Folatmangel, Hakenwurm- und HIV-Infektion sowie Hämoglobinopathien verkomplizieren häufig die pathogenetische Zuordnung.

2.2.3. Immunität

Der Infektion mit *Plasmodium* folgt eine Wirtsantwort, die durch angeborene und erworbene Immunmechanismen reguliert wird, aber auch von Seiten exogener Faktoren wie Ernährungszustand und allgemeine Immunitätslage beeinflusst wird. Die tatsächlichen Prozesse und insbesondere ihrer Wechselwirkungen werden allerdings nur unvollständig verstanden.

Säuglinge besitzen während der ersten drei bis sechs Lebensmonate einen relativen Schutz vor manifester Malaria (Brabin, 1990; Snow *et al.*, 1997). Ursächlich liegen dem diaplazentar übertragene, gegen *Plasmodium* gerichtete IgG-Antikörper (Carlier & Truyens, 1995) und ein hoher Gehalt an fetalem Hämoglobin (Pasvol, 1977) zugrunde. Weitere Erklärungsansätze beinhalten eine niedrige Aufnahme von para-Aminobenzoesäure (Kicska *et al.*, 2003) und die diaplazentare Passage antiparasitärer Medikamente mit langer Halbwertszeit (Mutabingwa *et al.*, 1994). Die Bedeutung dieser Faktoren lässt mit zunehmendem Alter nach. Im Alter von ca. 18 Wochen sind sowohl die mütterlichen Antikörper als auch das fetale Hämoglobin auf niedrige Spiegel abgefallen (Metaxotou-Mavromati *et al.*, 1982; Achidi *et al.*, 1995). Der „Nestschutz“ betrifft nicht die Infektion *per se*. In hochendemischen Gebieten steigen Prävalenz und Dichte von *P. falciparum* stetig von Geburt bis zu einem Gipfel im zweiten Lebenshalbjahr an (Brabin, 1990; Binka *et al.*, 1994; Kitua *et al.*, 1996). Mit Beginn des zweiten Lebenshalbjahres beginnt die Phase der höchsten Anfälligkeit gegenüber manifester Malaria, die sich bis zum zweiten oder dritten Lebensjahr erstreckt (Snow *et al.*, 1997). Auch wiederholte bzw. kontinuierliche Exposition gegenüber dem Erreger führt nicht zu einer sterilen Immunität, die Neuinfektionen verhindert. Stattdessen entwickelt sich bis zum späten Kindesalter eine sog. *Semi-Immunität* (Ross, 1910), die durch milde oder fehlende klinische Symptomatik bei chronischen und niedrigen Parasitämien charakterisiert ist. Diese

Art der „Krankheits-Immunität“ bedarf der kontinuierlichen Exposition gegenüber dem Parasiten (Snow *et al.*, 1999). Bei Malariaepisoden kenianischer Kinder wiesen die infizierenden Parasiten häufig PfEMP1-Varianten auf, die nicht durch präexistente anti-PfEMP1-Antikörper der Erkrankten erkannt wurden (Bull *et al.*, 1998). Dies weist auf die protektive Rolle von anti-PfEMP1 Antikörpern aber auch auf ihre Stammspezifität hin. Semi-Immunität scheint daher eine Funktion des sich kontinuierlich erweiternden Repertoires immunologischer Erkennungsmechanismen und der Vielzahl unterschiedlicher parasitärer Epitope darzustellen. In diesem Zusammenhang könnte eine Erklärung für den regelhaften Anstieg der Malaria-Morbidität mit der Regenzeit trotz fortbestehender chronischer Parasitämien in der meiotische Rekombinationen des Erregers im Vektor und folglich der Expression neuer PfEMP1-Varianten liegen (Hviid, 1998).

Protektive, sterile Immunität kann in der Maus durch die Infektion mit bestrahlten nicht aber mit inaktivierten Sporozoiten induziert werden (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989). Im Initialstadium der Infektion des Menschen kommt es zu einem kurzfristigen Anstieg von Sporozoiten-spezifischen Antikörpern. Der entsprechende Titer korreliert aber nicht mit Immunität (Webster *et al.*, 1988). Dem liegt wahrscheinlich die nur kurze Anwesenheit der Sporozoiten im Blut (2-30 min.) zugrunde. Eine zytotoxische T-Zell-Antwort betrifft nur die Leberzellstadien, da infizierte Erythrozyten nicht die notwendigen HLA-Antigene exprimieren. Die intrazellulären Parasiten exprimieren eine Reihe hoch immunogener Antigene, die von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen, HLA Klasse I bzw. II vermittelt, erkannt werden (Good *et al.*, 1998; Good & Doolan, 1999). Die CD8⁺-vermittelten Effekte wie direkte Zytotoxizität oder Ausschüttung von IFN- γ werden als wesentlich für die Immunität auf prä-erythrozytärer Ebene erachtet und sind in der Regel Stamm-spezifisch (Good & Doolan, 1999). IFN- γ -abhängige Wirkungen werden auch durch CD4⁺-T-Zellen, Natürliche Killerzellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt (Tsuji *et al.*, 1990; Doolan & Hoffmann, 1999; Rzepczyk *et al.*, 1997; Plebanski & Hill, 2000). Die der B-Zellaktivierung folgenden spezifischen Antikörper können zellvermittelte Zytotoxizität induzieren und die intrazelluläre Schizogonie hemmen (Paschetto *et al.*, 1997; Good & Doolan, 1999).

Bei der Kontrolle der erythrozytären Erreger kommen sowohl nicht-spezifische Mechanismen als auch die Entwicklung spezifischer zellvermittelter und humoraler Immunantworten zum Tragen. Nicht-spezifische Mechanismen beinhalten die Phagozytose via Bindung an CD36 von Makrophagen, Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, und Freisetzung von toxischen Sauerstoffmetaboliten und Stickoxid (Nalua & Friedman, 1988; Rockett *et al.*, 1992). Initial tritt eine polyklonale B-Zellaktivierung auf. Die Bedeutung humoraler Mecha-

nismen zeigt sich an der Reduktion bzw. Eliminierung einer bestehenden Parasitämie durch die Infusion von Immuns Serum (Cohen *et al.*, 1961; McGregor *et al.*, 1963). Eine humorale, Stamm-spezifische Immunantwort entwickelt sich im Verlauf; sie vermittelt deutlichen Schutz vor der erneuten Infektion mit dem gleichen Stamm (Ciuca *et al.*, 1934; Jeffery, 1966). Schützende Antikörper hemmen die Parasitenreplikation durch Agglutinierung von Merozoiten und, in Zusammenarbeit mit dem Monozyten-Makrophagen-System, durch die Bindung an infizierte Erythrozyten und nachfolgende FC-Rezeptor-Aktivierung (Brown *et al.*, 1986; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990). Die Entfernung infizierter Erythrozyten in der Milz ist infolge erhöhter Filtration und FC-Rezeptor-vermittelter Phagozytose (Looareesuwan *et al.*, 1987; Ho *et al.*, 1990) gesteigert. Infizierte Erythrozyten zeigen in diesem Zusammenhang eine erhöhte Membranrigidität (Cranston *et al.*, 1984) sowie eine Opsonierung infolge der Expression von parasitärem Neoantigen auf der Membran (Marsh & Howard, 1986). In der Milz tragen $\gamma\delta$ -T-Zellen zur Elimination infizierter Erythrozyten aus dem Blutkreislauf bei (McKenna *et al.*, 2000). Sowohl Antikörper-abhängige als auch –unabhängige zelluläre Immunität gegen erythrozytäre Parasitenformen wird diskutiert (Good & Doolan, 1999). Spezifische $CD4^+$ -T-Zellen können im Mausmodell auch ohne offensichtliche, begleitende Antikörperantwort die Parasitämie begrenzen. Es wird vermutet, dass dieser Effekt über pro-inflammatorische Zytokine, Stickoxid, und $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt wird (Taylor-Robinson *et al.*, 1999; Seixas & Langhorne, 1999; Good & Doolan, 1999]. Die ebenfalls zu beobachtende, gesteigerte Produktion von $IFN-\gamma$ geht mit protektiver Immunität gegen erythrozytäre Plasmodien einher (Luty *et al.*, 1999). Die Komplexität der beteiligten Immunmechanismen zeigt sich jedoch an dem Befund, dass die $IFN-\gamma$ -Produktion bei semi-immunen Erwachsenen aus Hochendemiegebieten stark reduziert ist. Dies verweist auf die Bedeutung der Abregulierung inflammatorischer Antworten für klinische oder antitoxische Immunität, die von der antiparasitären abzugrenzen ist (Rhee *et al.*, 2001).

2.2. Manifestationsformen der Infektion mit *Plasmodium falciparum*

2.2.1. Asymptomatische und submikroskopische Parasitämie

In vielen, insbesondere in holoendemischen, Malariagebieten präsentiert sich die Infektion mit *P. falciparum* als asymptomatische Parasitämie niedriger Parasitendichte. Die Definition der asymptomatischen Parasitämie in Abgrenzung von der unkomplizierten Malaria ist inso-

fern problematisch als in variabler Weise Kriterien wie Fieber, Schwellenwerte für Parasitendichten und unspezifische Symptome mit einbezogen werden, häufiger aber Afebrilität mit Asymptomatik gleichgesetzt wird (Greenwood *et al.*, 1987; Cox *et al.*, 1994). Zirkadiane Schwankungen der Körpertemperatur, altersabhängige Grenzwerte pyrogener Parasitendichten und Unterschiede zwischen den Endemiegebieten erschweren zusätzlich die Festlegung. Die Ergebnisse zahlreicher Studien legen ungeachtet dessen nahe, dass ein grosser Teil der Infektionen bei semi-immunen Erwachsenen und Säuglingen, aber auch bei Kindern als chronische, asymptomatische Parasitämie verlaufen (Greenwood *et al.*, 1987; Trape *et al.*, 1994; Bottius *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 2000). Während einer viermonatigen Längsschnittstudie im Senegal mit nahezu täglichen Beobachtungen wurde eine Parasitämie bei bis zu 90% der Kinder nachgewiesen; eine oder mehrere febrile, Malaria-assoziierte Episoden traten in dieser Zeit aber nur bei der Hälfte auf. Mit steigendem Alter verschob sich dieses Verhältnis deutlich zur asymptomatisch-chronischen Parasitämie hin (Trape *et al.*, 1994). Von 20 parasitämisches und täglich untersuchten Tanzanianischen Kindern wurden binnen zweier Wochen zwei symptomatisch (Färnert *et al.*, 1997). Im Verlauf erfuhren Kinder mit häufigen Parasitämien signifikant weniger klinische Episoden als zuvor aparasitämische Altersgenossen (Färnert *et al.*, 1999). Die Persistenz asymptomatischer Parasitämien kann z. T. Monate betragen (Babiker *et al.*, 1998). Daraufhin einsetzende febrile Symptomatik, z. B. mit gesteigerter Übertragungsfrequenz zu Beginn der Regenzeit, wird zu grossen Teilen der Infektion mit neuen parasitären Genotypen, bzw. dem Fehlen stammspezifischer Immunmechanismen zugeschrieben (Contamin *et al.*, 1996; Babiker *et al.*, 1998; Kun *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen widersprechen jedoch dieser Ansicht. In einer engmaschigen Kohortenstudie im Gabun ging nur bei 7% parasitämisches Kinder eine asymptomatische Phase von mehr als 4 Tagen einer klinischen Manifestation voraus (Missinou *et al.*, 2003). In Uganda wiesen Kinder mit asymptomatischer Parasitämie ein um das Fünffache erhöhtes prospektives Risiko manifester Malaria auf als aparasitämische Kinder. Das Risiko war bei submikroskopischen Parasitämien dagegen nicht erhöht (Nsobyia *et al.*, 2003).

Submikroskopische Parasitämie bezeichnet das Vorliegen von *Plasmodium* unterhalb der Nachweisgrenze sorgfältiger Mikroskopie (ca. 10-20 Parasiten/ μ L Blut; Clendennen *et al.*, 1995), die z. B. mit Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: PCR, *Polymerase Chain Reaction*) dargestellt werden können. Die Nachweisgrenze der PCR liegt bei mindestens 2,5 Parasiten/ μ L (Snounou *et al.*, 1993a). In Querschnittsstudien werden Prävalenzen submikroskopischer *P. falciparum*-Infektionen von bis zu über 80% erfasst (z. B. Snounou *et al.*, 1993b; Bottius *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1998; Färnert *et al.*, 1999). Mittels PCR lässt

sich zudem die z. T. periodische Fluktuation der Parasitämie um die mikroskopische Nachweisgrenze darstellen. Dies könnte einerseits in der Erfassung sehr niedriger peripherer Parasitämien und andererseits in der Amplifizierung von parasitärer DNA sequestrierter Erreger begründet sein (Snounou *et al.*, 1993a; Färnert *et al.*, 1999). Maximal 48 Stunden nach Inokulation abgetöteter Plasmodien in Mäuse ist mittels PCR kein Parasit mehr nachweisbar (Jarra & Snounou, 1998).

Die klinische Bedeutung primär asymptomatisch-chronischer und insbesondere submikroskopischer Infektionen mit *Plasmodium* ist nicht gesichert. Bei Säuglingen verläuft der überwiegende Teil dieser Art von *P. falciparum*-Infektionen ohne Symptomatik (Wagner *et al.*, 1998). Bei älteren Kindern werden chronische oder rezidivierende, niedriggradige Parasitämien als Ursache von Anämien dyserythropoetischer Prägung angeschuldigt (Abdalla *et al.*, 1980). Denkbar ist eine Beeinflussung immunologischer Prozesse mit folgend gesteigerter Empfänglichkeit für andere pathogene Keime. Inwieweit submikroskopische Infektionen pyrogen wirken, welchen Anteil sie an der Pathogenese der Malaria-assoziierten Anämie haben, und welchen natürlichen Verlauf sie nehmen, bedarf der Klärung.

2.2.2. Unkomplizierte Malaria

Das klinische Bild der unkomplizierten Malaria betrifft v. a. Nicht-Immune und Kinder im Alter von ca. einem halben bis fünf Jahren in den Endemiegebieten. Das initiale Krankheitsbild ist von der Erregerspezies weitgehend unabhängig. Insbesondere ist der Fieberverlauf initial uncharakteristisch. Die seltene „klassische“ Manifestation der Malaria setzt meist akut mit Kältegefühl und Schüttelfrost ein. Es folgt das febrile Stadium, das über mehrere Stunden anhalten und bei Kindern mit Fieberkrämpfen, Erbrechen und orthostatischen Dysregulationen einhergehen kann. Die Entfieberung mit Schweissausbrüchen schliesst sich bis zu einige Stunden danach an. Dieser stadienhafte Ablauf der akuten Attacke wird in den Endemiegebieten nur selten gesehen. Unspezifische Symptome wie allgemeine Schwäche, Durchfall, Erbrechen, Trinkschwäche, Lethargie und Husten treten bei Kindern auf und stehen häufig im Vordergrund. Im Verlauf entwickeln sich Spleno(hepato)megalie und eine primär normozytäre Anämie (White, 1996). Nicht zuletzt wegen der uncharakteristischen Manifestation der Erkrankung hat sich bei der Erfassung der Morbidität der Malaria die Definition als febrile Parasitämie weitgehend durchgesetzt (Greenwood *et al.*, 1987). Grundlage der im Folgenden zusammengestellten Untersuchungen ist jedoch, dass, abhängig von bekannten und unbekanntem Faktoren, gleiche Parasitendichten unterschiedlich toleriert werden. Das klinische

Bild reicht dabei vom leichten Fieber ohne sonstige Symptomatik bis hin zur Entwicklung des Krankheitsbildes der schweren und komplizierten Malaria.

2.2.3. Schwere und komplizierte Malaria

Das Krankheitsbild der schweren und komplizierten Malaria ist durch Organkomplikationen und hohe Letalität gekennzeichnet. Es wird geschätzt, dass eine von hundert Infektionen mit *P. falciparum* zu diesem klinischen Sammelbegriff fortschreitet (Greenwood *et al.*, 1991).

Die derzeitige Definition der schweren und komplizierten Malaria bei Kindern (WHO, 2000b) unterscheidet sich von früheren durch einen breiter gefassten Kriterienkatalog, geringere Spezifität, aber einfachere Handhabung bei gleichbleibender Sensitivität, vital bedrohliche Verläufe zu erfassen (Imbert *et al.*, 2002). Danach liegt eine schwere und komplizierte Malaria beim Nachweis asexueller Stadien von *P. falciparum* ungeachtet der Parasitendichte vor, wenn eines der in Tabelle 1 aufgeführten Symptome hinzutritt.

Weitere häufige, aber nicht definierende, Befunde sind Hypoglykämie (Glukose < 40 mg/dL), Hyperlaktatämie (Laktat \geq 5 mmol/L) und Hyperparasitämie (z. B. > 250.000 Parasiten/ μ L). Das Vorherrschen einzelner Symptome und ihre prognostische Bedeutung variieren u. a. mit Alter, Zugang zu medizinischer Versorgung und Endemizität. Die wichtigsten Formen sind die schwere Anämie und die zerebrale Malaria. Während erstere v. a. bei jungen Kindern in Hochendemiegebieten auftritt, häuft sich die zerebrale Malaria bei älteren Kindern und in Gebieten niedriger und saisonaler Erregerübertragung. Die Letalität hospitalisierter Kinder mit schwerer Malaria liegt in den Endemiegebieten im Bereich von 10 bis 25% (Marsh *et al.*, 1995; WHO, 2000b; Imbert *et al.*, 2002). Prognostisch ungünstige Zeichen sind zerebrale Malaria, Azidose (Kussmaul-Atmung), bzw. Hyperlaktatämie, Hypoglykämie und Hyperparasitämie. Überlappende Syndrome wie Atemnot, Koma und Anämie gehen mit der höchsten Sterblichkeit einher (Marsh *et al.*, 1995). Neurologische Sequelae nach zerebraler Malaria (u. a. Ataxie, Hemiplegie, Sprachstörungen, Blindheit) werden bei 7-12% betroffener Kinder beobachtet (WHO, 2000b).

Tabelle 1. Definierende Symptome schwerer und komplizierter Malaria bei Kindern

Symptom	Anmerkungen
Prostration	Unfähigkeit eines Kindes, zu sitzen, obwohl es ansonsten dazu in der Lage ist. Für jüngere Kinder gilt analog die Unfähigkeit zu trinken.
Bewusstseins- beeinträchtigung	Diese wird mittels der Blantyre-Koma-Skala (Molineux <i>et al.</i> , 1989) erhoben, die die Reaktion auf Ansprache und schmerzhaften Stimulus erfasst. Der Begriff der <i>zerebralen Malaria</i> ist für unerweckbar koma-töse Patienten ohne Reaktion auf Schmerzreiz reserviert (Warrell <i>et al.</i> , 1982). Alternativ wird ein Punktwert von weniger als drei von fünf möglichen verwendet.
Schwere Anämie	Hb < 5 g/dL
Respiratorische Insuffizienz	Definierend gelten hierbei Kussmaulsche Atmung, anhaltendes Na-senflügeln und tiefe, subcostale Einziehungen.
Wiederholte Konvulsionen	≥ 2 / 24 h
Zirkulatorischer Kollaps	Systolischer Blutdruck < 60 mm Hg (Kinder bis zu fünf Jahren Alter) bzw. < 80 mm Hg (Kinder über fünf Jahren Alter) in Kombination mit klinischen Zeichen verminderter Perfusion (kalte Extremitäten, fehlende periphere Pulse).
Lungenödem	Radiologischer Nachweis erforderlich.
Abnorme Blutungsneigung	Klinische Symptomatik, nicht biochemische Parameter sind ausschlag-gebend.
Ikterus	s. o.
Hämoglobinurie	Abgrenzung zu Hämaturie notwendig.

2.2.4. Malaria in der Schwangerschaft

Obwohl erwachsene Frauen in den Endemiegebieten über *Semi-Immunität* verfügen, ist das Risiko einer Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft ungefähr vierfach erhöht (Diagne *et al.*, 1997; Diagne *et al.*, 2000). In Hochendemiegebieten verläuft der überwiegende Anteil dieser Infektionen a- oder oligosymptomatisch. Ungeachtet dessen wurden in einer Studie aus Mosambik 16% der Todesfälle bei Schwangeren auf eine Malaria zurückgeführt (Granja *et al.*, 1998). In einem u. a. von der Endemizität abhängigen Masse erhöht die Infek-

tion mit *P. falciparum* das Risiko für mütterliche Anämie, Abort, intrauterine Retardierung, erniedrigtes Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit (Matteelli *et al.*, 1994; Ordi *et al.* 1998; Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.*, 2000b). Termin-ferne Infektionen disponieren für intrauterine Wachstumsverzögerung und folglich niedriges Geburtsgewicht, Termin-nahe Infektionen dagegen für Frühgeburtlichkeit (Sullivan *et al.*, 1999). Die Malaria trägt somit zu einer perinatalen Mortalität bei, die ein Vielfaches über derjenigen in den industrialisierten Ländern liegt. Dabei sind v. a. Erstschwangere betroffen; mit zunehmender Parität nimmt das Risiko der Infektion und seiner Manifestationen ab (Brabin, 1983; McGregor, 1984; Menendez *et al.*, 2000b).

Die erhöhte Anfälligkeit Schwangerer für die Infektion mit *P. falciparum* wird auf eine erhöhte Stichfrequenz von *Anopheles* (Lindsay *et al.*, 2000), auf eine Cortisol-vermittelte, relative Immunsuppression (Vleugels *et al.*, 1989) sowie auf die für den Parasiten günstige, junge Erythrozytenpopulation (Tian *et al.*, 1998) zurückgeführt. Dies allein kann jedoch weder die besondere Anfälligkeit Erstschwangerer noch die Sequestrierung von *P. falciparum* im intravillösen Raum der Plazenta (Bulmer *et al.*, 1993) erklären. *P. falciparum* vermag an Synzytiotrophoblasten zu binden, im intravillösen Raum zu sequestrieren und folglich der lienalen Eliminierung zu entgehen. Vermittelt wird diese Adhäsion durch Chondroitinsulfat A (CSA; Fried & Duffy 1996), das in relevanter Menge nur als Oberflächenmolekül des Synzytiotrophoblasten produziert wird. Ein weiterer Rezeptor ist Hyaluronsäure (Beeson *et al.*, 2000). Als parasitärer Rezeptor dienen spezifische Expressionsvarianten des Oberflächenmoleküls PfEMP1 (Reeder *et al.*, 1999; Rowe *et al.*, 2002). CSA-bindende Stämme von *P. falciparum* werden nahezu ausschliesslich bei Schwangeren nachgewiesen (Beeson *et al.*, 1999). Antikörper, die die plazentare Adhäsion des Parasiten blockieren können, sind bei Nicht- oder Erstschwangeren nicht vorhanden oder selten (Fried & Duffy, 1998; Beeson *et al.*, 1999; Reeder *et al.*, 1999; Ricke *et al.*, 2000) bzw. werden nur verzögert produziert (O'Neil-Dunne *et al.*, 2001). Mit wiederholten Schwangerschaften und wiederholter Exposition gegenüber Parasiten mit Plazenta-adhärierenden PfEMP1-Varianten werden auch zunehmend Adhäsions-blockierende Antikörper nachgewiesen (Fried *et al.* 1998b; Beeson *et al.*, 1999; Ricke *et al.*, 2000), bzw. diese werden beschleunigt produziert (O'Neil-Dunne *et al.*, 2001).

Die plazentare Sequestrierung hat weitere Konsequenzen. Zum einen verlaufen Infektionen bei Schwangeren häufig ohne peripher-venöse Parasitämie und können so der Diagnose entgehen (Desowitz & Alpers, 1992; Leke *et al.*, 1999; Mankhambo *et al.*, 2002). Zum anderen induziert die lokale plazentare Parasitämie die lokale Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α oder IFN- γ (Fried *et al.*, 1998), wobei erhöhte Spiegel von

TNF- α ihrerseits zu intrauteriner Retardierung beitragen (Moormann *et al.*, 1999; Rogerson *et al.*, 2003). Histologisch finden sich Zeichen einer Massiven Chronischen Intervillositis (Ordi *et al.*, 1998), Gewebsnekrosen, Fibrinlagerungen und Verlust von Mikrovilli (Bulmer *et al.*, 1993; Ismail *et al.*, 2000). Der uteroplazentare Blutfluss ist auch in asymptomatischen Fällen reduziert (Dorman *et al.*, 2002). Auch die diaplazentare Passage mütterlicher Antikörper ist beeinträchtigt (Baird *et al.*, 1984). Weitere Effekte auf das Neugeborene werden wahrscheinlich durch die mütterliche Anämie vermittelt (Shulman *et al.*, 1999). Perinatale Infektionen des Neugeborenen treten sehr selten auf (Brabin, 1983).

2.3. Parasitäre Einflussfaktoren auf die Inzidenz und Manifestation der *Plasmodium falciparum*-Infektion

2.3.1. Multiplizität und Diversität von *Plasmodium falciparum*

Sergent und Parrot (1935) schlugen vor, dass Schutz vor Malaria auch durch Prämunitio n vermittelt werde. Nach diesem Modell schützt eine bestehende Infektion vor Superinfektion und damit vor der Etablierung eines potentiell virulenten Stammes. Diese Annahme ist in den letzten Jahren durch molekularbiologische Befunde unterstützt worden.

Infektionen mit *P. falciparum* sind in der Regel polyklonal, was sich mit Verfahren der PCR zur Typisierung polymorpher parasitärer Genbereiche darstellen lässt. Dabei werden insbesondere die hochvariablen Gene *msp1* und *msp2* amplifiziert, die für die Oberflächenproteine *merozoite surface protein 1* und *2* codieren. Die Klonalität oder Multiplizität der Infektion (MOI, engl.: *multiplicity of infection*) steigt mit zunehmender Endemizität (Babiker *et al.*, 1999; Bendixen *et al.*, 2001; Owusu-Agyei *et al.*, 2002) und in hochendemischen Gebieten mit dem Alter bis zu einem Gipfel zwischen drei und sechs Jahren (Ntoumi *et al.*, 1995; Konate *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999b; Engelbrecht *et al.*, 2000; Owusu-Agyei *et al.*, 2002).

Diese polyklonalen Infektionen scheinen eine wesentliche Bedeutung für den Erwerb und die Aufrechterhaltung einer protektiven Immunität zu besitzen. In einer Erweiterung des Modells der Prämunitio n wird postuliert, dass eine Infektion nicht nur Stamm- oder gar Klon-spezifische (Bull *et al.*, 1998), sondern auch relativ kurzlebige kreuzreagierende Immunantworten induziert. Neu erworbene Infektionen werden dann in Abhängigkeit von ihrer antigenen Ähnlichkeit zu persistierenden Parasiten vom Wirt kontrolliert (Smith *et al.*, 1999a). Der Zusammenhang zwischen MOI und Manifestation der *P. falciparum*-Infektion ist aber komplex und abhängig von Faktoren wie Alter und Endemizität. Im Säuglingsalter und nachdem der Nestschutz (s. o.) abgeklungen ist, sind Infektionen mit *P. falciparum* nur von kurzer

Dauer (Kitua *et al.* 1996; Smith *et al.*, 1999c); der Säugling reagiert auf die Infektion primär mit Fieber und Zytokinausschüttung (Kwiatkowski, 1991). Folglich werden Infektionen eher eliminiert als kontrolliert, was deren Persistenz und damit die Etablierung von Prämunitio n zunichte macht. Dementsprechend korreliert MOI bis zu einem Alter von ca. einem Jahr mit dem Ausmass der klinischen Manifestation (Felger *et al.*, 1999). Bei älteren Kindern steigt MOI parallel zum Erwerb einer Krankheits-Immunität und zur Fähigkeit, Parasitämie zu kontrollieren (Smith *et al.*, 1999b). Im Kindesalter wird eine höhere Klonalität in asymptomatischen als in symptomatischen Infektionen beobachtet, und eine hohe Multiplizität vermittelt ein reduziertes prospektives Risiko einer Malaria (Contamin *et al.*, 1996; Al-Yaman *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 1997; Färnert *et al.*, 1997; Färnert *et al.*, 1999; Müller *et al.* 2001; Magesa *et al.* 2002). Allerdings liegen auch entgegengesetzte Befunde vor (Branch *et al.* 2001; Ofusu-Okyere *et al.* 2001).

Interventionen oder Dispositionen, die in dieses Wechselspiel zwischen Prämunitio n und Erkrankung eingreifen, können potentiell das Risiko einer Malaria reduzieren oder steigern. Das Phänomen der „rebound malaria“, der Anstieg von Inzidenz und Manifestation der Malaria z. B. nach Chemoprophylaxe (Greenwood *et al.*, 1995; Menendez *et al.*, 1997), wird mit einer Reduktion der Multiplizität von *P. falciparum* infolge solcher Intervention erklärt (Beck *et al.*, 1999). Andererseits wurde eine erhöhte Multiplizität bei Kindern mit Sichelzellanlage beobachtet (Ntoumi *et al.*, 1997a), wenn auch nicht bestätigt (Konate *et al.* 1999). Ob dieser Zusammenhang Kausalität oder Koinzidenz darstellt, ist nicht bekannt.

Neben der Multiplizität der Infektion lassen sich mit der Typisierung von *mSP1* und *mSP2* auch Allelfamilien (*mSP1*: K1, Mad20, Ro33; *mSP2*: FC27, IC) und Einzelallele des im Menschen in der Regel haploiden Parasiten, und somit seine Diversität, darstellen. Die Merozoitenoberflächenproteine sind an der erythrozytären Invasion beteiligt (Goel *et al.*, 2003). Ob und inwiefern allelische Varianten hierbei mit unterschiedlichen Befallsraten korrelieren, ist jedoch unklar. Dennoch wurden zahlreiche und oftmals widersprüchliche Assoziationen zwischen *mSP*-Allelfamilien oder Einzelallelen mit Inzidenz und Schwere der Malaria tropica berichtet (z. B.: Robert *et al.*, 1996; Kun *et al.*, 1998a; Arie y *et al.*, 2001; Owusu-Okyere *et al.*, 2001). Vorgeschlagen wurde, dass insbesondere in Gebieten geringer Endemizität und damit relativ geringer Diversität sich spezifische *mSP*-Allele in einem Verteilungsungleichgewicht mit Genen befinden können, die funktionell an der Pathogenese der Malaria tropica beteiligt sind (Arie y *et al.*, 2001). Selektion bestimmter *mSP*-Allelfamilien durch die Sichelzellanlage wurde ebenfalls beschrieben (Ntoumi *et al.*, 1997b; Konate *et al.*, 1999).

2.3.2. Infektion mit *Plasmodium malariae* oder *Plasmodium ovale*

In den Endemiegebieten sind Infektionen mit *P. falciparum* sowie einer oder mehreren Spezies von *Plasmodium* nicht selten. Diese sog. gemischten Infektionen scheinen Inzidenz und Schwere der Malaria tropica beeinflussen zu können. Allerdings liegen nur wenige diesbezügliche Untersuchungen vor.

Ein methodologisches Problem stellt der Nachweis gemischter Infektionen dar. *P. malariae* und *P. ovale* erreichen selten hohe Parasitendichten (Trape *et al.*, 1994, Faye *et al.*, 1998), so dass diese v. a. bei ausgeprägtem Befall mit *P. falciparum* nachgerade regelhaft übersehen werden (Knowles & White, 1930). PCR-basierte und Längsschnittstudien zeigen, dass *P. malariae* und *P. ovale* wesentlich häufiger vorkommen als vermutet (Molineaux *et al.*, 1980; Snounou *et al.*, 1993b; Trape *et al.*, 1994; Faye *et al.*, 1998; May *et al.*, 1999; Mehlotra *et al.*, 2000).

Interaktionen zwischen den *Plasmodium*-Spezies könnten durch Kreuzimmunität reguliert sein, wobei ein wesentliches Postulat dieser Hypothese die Asymmetrie der resultierenden Immunantworten ist (Molineaux *et al.*, 1980; Richie, 1988). Hinweise auf eine die *Plasmodium*-Spezies überschreitende Kreuzimmunität entstammen primär Studien zur murinen Malaria (Übersicht bei Richie, 1988; Maitland *et al.*, 1997). In Peru wiesen Sulzer *et al.* (1988) *P. falciparum*-spezifische Antikörper bei mehr als einem Viertel einer Bevölkerung nach, in der dieser Erreger unbekannt, *P. malariae* aber endemisch ist. In Tansania gingen gemischte Infektionen mit deutlich gesteigerter Reaktivität gegenüber einem spezifischen *P. falciparum*-Antigen einher als dies bei *P. falciparum*-Monoinfektionen der Fall war (Alifrangis *et al.*, 1999). Kreuzimmunität wird zudem als das wirksame Prinzip der saisonal bedingten und spiegelbildlichen Häufigkeitsgipfel von *P. falciparum* einerseits und *P. malariae* (Molineaux *et al.*, 1980) oder *P. vivax* (Maitland *et al.*, 1997) andererseits betrachtet. Bruce *et al.* (2000) postulieren dagegen eine Parasitendichte-abhängige, Spezies-unabhängige Kontrolle der Parasitämie bei asymptomatischen Infektionen. In Kombination mit nur zum Teil kreuzreagierenden Immunmechanismen und unterschiedlichen Multiplikationsraten der einzelnen Spezies resultiere so eine sequentielle Abfolge von Infektionen mit den einzelnen Erregern.

In klinisch-epidemiologischen Studien zeigte sich, dass eine vorangehende Infektion mit *P. malariae* oder *P. ovale* mit einer signifikanten Reduktion der Parasitendichten folgender *P. falciparum*-Infektionen assoziiert ist (Jeffery, 1966; Collins & Jeffery, 1999). In mathematischen Modellen macht diese Reduktion bis zu 50% aus (Mason *et al.*, 1999). In Papua Neu Guinea verringerte eine bestehende Infektion mit *P. malariae* oder *P. vivax* die Wahr-

scheinlichkeit einer folgenden Malaria tropica (Smith *et al.*, 2001a). Bei *P. falciparum*-infizierten Kindern in der Elfenbeinküste wurde *P. malariae* bei 27% asymptomatischer Infektionen, aber in keinem Fall klinischer Manifestation nachgewiesen (Black *et al.*, 1994).

In der Zusammenfassung dieser Befunde scheint insbesondere die persistierende Infektion mit *P. malariae*, wohlmöglich über eine Drosselung der inflammatorischen Kaskade (Black *et al.*, 1994), mit milderer Verläufe der Malaria tropica einherzugehen. Es ist denkbar, dass dabei auch Wirtsfaktoren eine Rolle spielen. So wird postuliert, dass die milde Manifestation der Malaria bei Trägern des Sichelzellgens z. T. durch die Selektion von *P. malariae* bedingt ist, auch wenn eine solche Häufung bislang nicht gezeigt werden konnte (Blampain-Azzibrouck *et al.*, 1999). Dagegen wurde im Senegal eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber *P. ovale* beschrieben (Faye *et al.*, 2002). Bei α -thalassämischen Kindern in Vanuatu wurde während der ersten zwei Lebensjahre eine erhöhte Inzidenz von *P. vivax*, im weiteren Altersverlauf eine mildere Manifestation von *P. falciparum* beobachtet. Es wurde vorgeschlagen, dass *P. vivax* in diesem Kontext als „natürliche Vakzine“ gegen spätere Malaria tropica wirke (Williams *et al.*, 1996; Maitland *et al.*, 1997). Aufgrund des nahezu vollständigen Fehlens von *P. vivax* in Westafrika kann dies dort nicht der Fall sein. Zudem liegen die Häufigkeitsgipfel von *P. malariae* und *P. ovale* bei einem höheren Alter als der für *P. falciparum* (Molineaux *et al.*, 1980; May *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2000; Mehlotra *et al.*, 2000; Smith *et al.* 2001b). Weitere Faktoren, die in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden müssen, sind der Häufigkeitsgipfel gemischter Infektionen in der Trockenzeit (Molineaux *et al.*, 1980; Afari *et al.*, 1993), ihr häufigeres Auftreten in ländlichen Gebieten (May *et al.*, 1999), starke Prävalenzschwankungen selbst innerhalb kleiner Ortschaften (Snounou *et al.*, 1993b) und letztendlich die Eliminierung durch residuelle Medikamentenspiegel (Hellgren *et al.*, 1994).

2.3.3. Medikamentenresistenz bei *Plasmodium falciparum*

Die Kontrolle der Malaria beruht heute zu grossen Teilen auf der frühzeitigen Therapie Infizierter. In Afrika südlich der Sahara kommt dabei in erster Linie Chloroquin, und in Ostafrika zunehmend Sulfadoxin-Pyrimethamin zum Einsatz. Die Resistenz des Erregers *P. falciparum* gegenüber Chloroquin und den übrigen in Endemiegebieten erschwinglichen Medikamenten breitet sich jedoch zunehmend aus (Mockenhaupt *et al.*, 1997) und verursacht eine steigende Mortalität der Malaria in Afrika (Trape *et al.*, 2002).

Chloroquin akkumuliert u. a. in Erythrozyten und erreicht dort die 10-30fache Konzentration des Plasmawertes. In infizierten Erythrozyten reichert sich Chloroquin in der para-

sitären Verdauungsvakuole an. Beim Abbau von Hämoglobin entsteht dort Häm (Ferriprotoporphyrin IX [FP]). Dieses Molekül bedingt in höherer Konzentration die Lyse des Parasiten, hemmt parasitäre Proteasen und wird zum nicht-toxischen Hämозoin polymerisiert. Eine zentrale Rolle im derzeitigen Modell zum Wirkmechanismus von Chloroquin (Ginsburg *et al.*, 1999) nimmt eine Komplexbildung von FP und Chloroquin in der Verdauungsvakuole ein, wodurch die Polymerisation des toxischen FP zu Hämозoin unterbunden wird. Darüber hinaus wird ein Teil des FP über einen Glutathion-abhängigen Mechanismus abgebaut, den Chloroquin wiederum inhibiert.

Chloroquin-Resistenz zeichnet sich durch eine reduzierte parasitäre Akkumulierung des Medikaments aus. Verschiedene Mechanismen der Chloroquin-Resistenz werden diskutiert. Dazu zählen eine reduzierte Aufnahme oder ein gesteigerter Efflux von Chloroquin, vermittelt z. B. über ein *Plasmodium falciparum multiple drug resistance analogue 1* Gen (*pfmdr1*) codiertes P-Glykoprotein (Krogstad *et al.*, 1989). Weitere Modelle beinhalten eine Modifizierung des Protonenstromes und der Chloroquin-Aufnahme an der Verdauungsvakuole, reduzierten Zugang zu FP, beeinträchtigten Abbau von Chloroquin-FP Komplexen und eine Ansäuerung der Verdauungsvakuole (Ginsburg *et al.*, 1999; Fidock *et al.*, 2000).

Mutationen im Gen *pfcr*t auf Chromosom 7 von *P. falciparum* gehen mit Chloroquin-Resistenz einher. *Pfcr*t codiert ein transmembranöses Protein der Verdauungsvakuole (PFCRT: *Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter*). Eine spezielle Mutation (K76T) wurde *in vitro* bei resistenten nicht aber bei sensitiven Erregern nachgewiesen (Fidock *et al.* 2000). In einer Studie aus Mali war das Risiko für Therapieversagen von Chloroquin um nahezu das Zwanzigfache erhöht, wenn Kinder mit der *pfcr*t T76 Variante von *P. falciparum* infiziert waren (Djimde *et al.*, 2001). Diese starke Assoziation von *pfcr*t T76 mit Chloroquin-Resistenz schließt eine Beteiligung anderer Proteine nicht aus. Mutationen von *pfmdr1* auf Chromosom 5 des Parasiten scheinen zwar nicht ursächlich für Chloroquin-Resistenz zu sein. *In vitro* verschärfen sie aber das Ausmaß vorbestehender Resistenz (Reed *et al.*, 2000). In Mali war die Y86 Hauptmutation von *pfmdr1* mit einem dreifach erhöhten Risiko eines Therapieversagens assoziiert. Der prädiktive Wert der *pfcr*t T76 Mutation wurde jedoch nicht durch das gleichzeitige Vorkommen einer *pfmdr1* Y86 Variante vergrößert (Djimde *et al.*, 2001). In Mali erlitten nicht alle Patienten, die mit *pfcr*t T76 Varianten von *P. falciparum* infiziert waren, Therapieversagen. Der Anteil der Kinder unter 10 Jahren, die bei Vorliegen der *pfcr*t Mutation ein Therapieversagen erfuhren, war doppelt so groß wie bei Patienten im Alter über 10 Jahren. Es wurde gefolgert, dass die Immunität der älteren Patienten

zur Eliminierung auch resistenter Parasiten beitrug und so die Assoziation zwischen Resistenzmarker und klinischer Resistenz verringerte (Djimde *et al.*, 2001).

Pyrimethamin wirkt mit grosser Affinität gegen die Dihydrofolatreduktase (DHFR) von *P. falciparum*; in Kombination mit Sulfadoxin (SP, Fansidar) wird zudem die Dihydropteroatsynthetase (DHPS) gehemmt. Ungeachtet nachgewiesener Unwirksamkeit (Nahlen *et al.*, 1990) wird Pyrimethamin in Westafrika vielerorts noch immer zur Prophylaxe der Malaria in der Schwangerschaft eingesetzt. SP findet in Ostafrika zunehmend Verwendung in der Therapie und als Mittel der intermittierenden präventiven Behandlung bei Kleinkindern und Schwangeren (Shulman *et al.*, 1999). Resistenz gegen Pyrimethamin wurde bereits nach 1950 beobachtet und hat sich seitdem ebenso wie die relative Unempfindlichkeit gegenüber Sulfadoxin-Pyrimethamin ausgebreitet. Betroffen ist neben Südamerika und Südostasien in zunehmendem Masse auch Afrika (Mockenhaupt *et al.*, 1997). Pyrimethamin-Resistenz korreliert mit Punktmutation des parasitären DHFR-Gens, insbesondere der Hauptmutation am Codon 108 (S108N). Die dreifache Mutation (S108N, N51I, R59C) in Verbindung mit zwei Punktmutationen des DHPS-Gens ist prädiktiv für SP-Therapieversagen (Kublin *et al.*, 2002).

2.4. Einfluss von Wirtsfaktoren auf Inzidenz und Manifestation der *Plasmodium falciparum*-Infektion

Im Gegensatz zu den erworbenen Immunmechanismen tragen mehrere hereditäre Faktoren zu einem Schutz vor der Malaria *a priori*, also schon im Kleinkindesalter vor der Entwicklung protektiver Immunität, bei. Dies schliesst wechselseitiges Zusammenwirken nicht aus. Haldane formulierte 1949 ein als „Malariahypothese“ bekannt gewordenes Postulat. Demnach stelle die hohe Frequenz der β -Thalassämie im Mittelmeerraum nicht das Resultat hoher Mutationsraten sondern der Selektion durch die zuvor endemische Malaria dar. Der Verlust der Population durch Homozygotie wäre dabei durch den Überlebensvorteil der Heterozygoten ausgeglichen und die genetische Variante im Rahmen eines balancierten Polymorphismus selektiert worden. Diese Hypothese ist heute für eine Reihe erythrozytärer aber auch anderer Polymorphismen bestätigt. Ungeachtet dessen steht in vielen Fällen die Klärung des oder der zugrunde liegenden, protektiven Mechanismen aus (Wilkinson & Pasvol, 1997). Gleiches betrifft den quantitativen Anteil der Wirtsfaktoren an der Abwehr von Infektion oder Erkrankung, der zudem mit der Endemizität und mit der Koexistenz weiterer Dispositionen variieren mag. Nur allmählich wird die Bedeutung der angeborenen Resistenzfaktoren für die Interaktionen zwischen Wirt und Parasit, von Kommensalität bis letale Erkrankung, und die po-

tentielle Gefahr eventueller Interventionen in diesem Wechselspiel erkannt (Maitland *et al.*, 1997). Letztlich muss heute der massenhafte Einsatz von antiparasitären Medikamenten als menschlicher Einflussfaktor in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden.

2.4.1. Erythrozytenvarianten

2.4.1.1. Hämoglobin S

Die Hämoglobinvariante HbS wird durch einen Aminosäureaustausch von Glutamin zu Valin an Position 6 der β -Globinkette bedingt. Beim homozygoten Patienten mit Sichelzellanämie (HbSS) bilden diese veränderten Peptidketten unter reduzierter Sauerstoffspannung langgestreckte Polymere, die die Verformung des Erythrozyten zur Sichelform, Membranveränderungen und eine reduzierte Verformbarkeit nach sich ziehen. Dies tritt bei Menschen mit der heterozygoten Anlage (HbAS) nur in extremen Situationen auf (Hochgebirge, Tiefseetauchen). HbS ist in vielen Malariagebieten weit verbreitet und erreicht Prävalenzen von bis zu 40% in Ostafrika (Fleming *et al.*, 1998).

Die klinische Manifestation des HbSS umfasst chronisch-hämolytische Anämie, akute aplastische Krisen und vaso-okklusive Syndrome, denen die Sequestrierung der rigiden Sichelzellen zugrunde liegt. Zu letzteren zählen neben Infarkten zahlreicher Gewebe auch solche der Milz, was schliesslich zu Autosplenektomie führt. Die Anfälligkeit für bakterielle Infektionen ist stark erhöht (Smith, 1989). Vor der Einrichtung spezialisierter Zentren in Afrika erreichten nur ca. 20% der Patienten mit Sichelzellanämie das Erwachsenenalter; der Median der Lebenszeit wurde auf 14 Jahre geschätzt (Allison, 1956; Diggs, 1973). Dieser frühen Sterblichkeit des Sichelzellanämikers mit der Folge verringerter Reproduktion steht der Überlebensvorteil des Anlageträgers in Malariaendemiegebieten entgegen (Allison, 1954a, 1954b; Aidoo *et al.*, 2002). Es handelt sich um das klassische Beispiel eines balancierten Polymorphismus.

Allison (1954a) zeigte erstmals den Zusammenhang zwischen Genfrequenz und Malariaendemizität. Bei der artifiziellen Infektion Erwachsener zeigten innerhalb eines Monats 14 von 15 Probanden mit normalem Hämoglobintyp eine Parasitämie aber nur zwei von 15 Trägern des Sichelzellgens (Allison, 1954b). In Fall-Kontroll-Studien in Nigeria (Gilles *et al.*, 1967), Gambia (Hill *et al.*, 1991) und Gabun (Lell *et al.*, 1999) war HbAS mit einem 60-90%igen Schutz vor schwerer Malaria assoziiert. Die Rolle der Disposition bei der unkomplizierten Malaria wird dagegen uneinheitlich eingeschätzt. Während in Nigeria (Fleming *et al.*, 1979) und Gambia (Allen *et al.*, 1992) Kinder mit HbAS im Vergleich zu solchen mit HbAA

erniedrigte Parasitendichten aufwiesen, demonstrierten Studien in Uganda (Raper, 1955) und Liberia (Willcox *et al.*, 1983) zusätzlich eine reduzierte Prävalenz von Parasitämie. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass HbAS nicht die Inzidenz unkomplizierter Malaria reduziert, sondern vielmehr das Auftreten hoher Parasitendichten (Lell *et al.*, 1999; Aidoo *et al.*, 2002). Allison (1964) postulierte, dass der protektive Effekt des HbAS im frühen Kindesalter, also in einem Lebensalter höchster Mortalität und vor der Ausbildung klinischer Immunität, wirksam sein müsse. Dies scheint durch die Befunde einer Kohortenstudie in Kenia unterstützt zu werden. Dabei war HbAS bis zum Alter von 16 Monaten, nicht aber später, mit einer signifikanten Senkung der Mortalität assoziiert. Vor allem während dieses Alters, aber auch noch bis zum fünften Lebensjahr wurde ein Schutz vor Malaria-assoziiierter schwerer Anämie beobachtet. Zudem war nur die Inzidenz hoher Parasitämien ($>10.000/\mu\text{L}$) reduziert (Aidoo *et al.*, 2002).

Es bestehen unterschiedliche Erklärungsansätze für den diesem Schutz zugrunde liegenden Mechanismus. Unter reduzierter Sauerstoffspannung, die der postkapillären Bereiche entspricht, zeigt *P. falciparum* vermindertes Wachstum (Friedman, 1978) sowie reduzierte Invasionsraten und Reifung (Pasvol *et al.*, 1978). Bei normaler Sauerstoffsättigung ist dies nicht der Fall (Pasvol, 1980). Auch wird der gesteigerte Abbau *P. falciparum*-infizierter und dadurch sichelnder HbAS Erythrozyten vorgeschlagen (Luzzatto *et al.*, 1970). Der verzögerte Ersatz von fetalem Hämoglobin bei Säuglingen mit HbAS könnte zudem während der ersten Lebensmonate die Anfälligkeit gegenüber dem Parasiten herabsetzen (Shear *et al.*, 1998). Inwiefern eine modifizierte Anigenexpression bzw. veränderte Immunitätsentwicklung bei Menschen mit dem Sichelzellan am Schutz vor der Malaria beteiligt sind, ist weitgehend unklar. Im Tiermodell waren transgene, HbS exprimierende Mäuse nur bis zur Splenektomie vor Malaria geschützt (Shear *et al.*, 1993). Die mit der Infektion einhergehenden Strukturänderungen der Erythrozytenmembran bei HbAS (Luzzatto *et al.*, 1970) wurden als Ursache gesteigerter lymphoproliferativer Antworten auf parasitäres Antigen (Abu-Zeid *et al.*, 1991) erachtet. Membranveränderungen, insbesondere im desoxygenierten Zustand, wurden auch für die verminderte Zytoadhärenz infizierter HbAS Erythrozyten verantwortlich gemacht, was auf die veränderte Expression parasitärer Oberflächenproteine hinweisen könnte (Carlson *et al.* 1994). Zwar wurden bei Kindern mit HbAS erhöhte Titer gegen parasitäre Neoantigene der Erythrozytenmembran nachgewiesen, inwieweit diese mit Protektion gegen *P. falciparum* korrelieren, ist aber nicht geklärt (Marsh *et al.*, 1989). Im Gabun unterschied sich die Seroaktivität gegen definierte parasitäre Antigene bei Kindern mit HbAS oder HbAA dagegen nicht (Ntoumi *et al.*, 2002).

Über die parasitologischen und klinischen Effekte hinaus scheint HbS zudem Bedeutung für das Ansprechen auf Therapie zu haben. Bei der *in vitro*-Kultivierung von *P. falciparum* in HbSS Erythrozyten, nicht aber in HbAS Blutzellen, zeigt Chloroquin eine verminderte Wirkung (Nguyen-Dinh & Parvin, 1986). Andererseits war der Erfolg der Chloroquintherapie bei kenianischen Kindern mit der Sichelzellanlage gesteigert (Brandling-Bennett *et al.*, 1988). Ebenso war die Rate von Therapieversagen von Sulfadoxin-Pyrimethamin bei Kindern mit HbAS ca. 50% geringer als bei solchen mit HbAA (Terlouw *et al.*, 2002). Ob diesen Befunden und den reduzierten Re-Infektionsraten nach Therapie (Sokhna *et al.*, 2000) pharmakokinetische, pharmakodynamische oder antiparasitäre Effekte des HbS zugrunde liegen, ist nicht bekannt.

2.4.1.2. Hämoglobin C

HbC wurde erstmals 1950 bei einem Afroamerikaner in den USA beschrieben (Itano & Neel, 1950). Wie beim HbS beruht die Anomalie auf einem Aminosäureaustausch an Position 6 der β -Globinkette, in diesem Fall aber wird Glutamin durch Lysin ersetzt. Die Hämoglobinopathie tritt in polymorphen Frequenzen ausschließlich in Westafrika auf und erreicht höchste Prävalenzen (15-25%) in den nördlichen Savannengebieten von Ghana und der Elfenbeinküste sowie in Mali und Burkina Faso (Flint *et al.*, 1998). Im Vergleich zu HbSS geht HbCC mit einer weitaus milderer Manifestation einher; milde bis moderate hämolytische Anämie, Splenomegalie mit Infarzierung sowie weitere vaso-okklusive Symptome können dennoch auftreten (Duflo *et al.*, 1985). Schon früh wurde beobachtet, dass eine inverse Korrelation zwischen der Häufigkeit von HbS und HbC besteht. In dem Masse wie z. B. in Ghana HbC an Prävalenz zunimmt, nimmt die von HbS ab. U. a. aus diesem Befund wurde abgeleitet, dass HbC mit einem protektiven Effekt hinsichtlich der Malaria assoziiert sein müsse (Edington & Laing, 1957).

Die in Folge durchgeführten Untersuchungen ergaben jedoch keine überzeugenden Hinweise für einen Schutz vor der Malaria durch HbAC oder HbCC. Abgesehen von einer vielfach kritisierten Studie (Thompson, 1962), wurde kein Einfluss von HbC auf Prävalenz oder Parasitendichte von *P. falciparum* beobachtet (Edington & Laing, 1957; Ringelmann *et al.*, 1976; Labie *et al.*, 1984). In zwei kleineren Studien in Mali und Nigeria konnte zudem keine Protektion vor schwerer Malaria nachgewiesen werden (Gilles *et al.*, 1967; Guinet *et al.*, 1997). Erst Agarwal *et al.* (2000) zeigten in Mali, dass gegenüber einer Kontrollgruppe von Kindern mit unkomplizierter Malaria HbAC mit einer ca. 75%igen Reduktion der Wahrscheinlichkeit einer schweren Malaria assoziiert ist. Keine Unterschiede bestanden hingegen

zwischen den Genfrequenzen von HbC bei Kindern mit unkomplizierter Malaria und der Bevölkerung. Unterstützt werden diese Ergebnisse nur teilweise durch eine neuere Fall-Kontroll-Studie aus Burkina Faso (Modiano *et al.*, 2001). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Prävalenzen von HbAC und HbCC zwischen Kindern mit unkomplizierter oder schwerer Malaria. Wurden aber Schulkinder als Kontrollgruppe herangezogen, betrug die Risikoreduktion für schwere Malaria durch HbAC 34% und lag bei 86% für HbCC. Angesichts dieses dem HbAS vergleichbaren Schutzes, der nur milden Pathologie von HbCC und der geringen Frequenz von HbS in Regionen, in denen HbC auftritt, schlugen die Autoren vor, dass in Westafrika der allmähliche Ersatz von HbS durch HbC zu erwarten ist. Ungeklärt bleibt aber bislang, ob der durch HbC vermittelte Schutz die Progression der Erkrankung zur schweren Malaria tropica (Agarwal *et al.*, 2000) oder vielmehr die Entwicklung klinischer Symptomatik allgemein (Modiano *et al.*, 2001) betrifft.

In vitro wurde das Ausbleiben der Replikation von *P. falciparum* in HbCC Erythrozyten (Friedman *et al.*, 1979; Olson & Nagel, 1986), beziehungsweise eine deutliche Hemmung beobachtet (Pasvol & Wilson, 1982). Dieser Befund kontrastiert mit der Beobachtung auch hoher Parasitämien bei HbCC *in vivo* (Agarwal *et al.*, 2000). In HbAC Erythrozyten vermehrt sich der Erreger weitgehend uneingeschränkt (Friedman *et al.*, 1979). Neuere Untersuchungen wiesen wiederum eine Hemmung der Multiplikation von *P. falciparum* in HbCC Erythrozyten nach, die nicht auf eine verringerte Invasionsrate zurückgeführt werden konnte (Fairhurst *et al.*, 2003). Allerdings starben ca. 50% der Parasiten innerhalb morphologisch intakter HbCC Erythrozyten ab, wobei parasitäre Vakuolisierung, Membranschädigung und Organellzerfall auftraten. Ursächlich wurde eine vorangegangene Schädigung der Spendererythrozyten *in vivo* infolge ihrer erhöhten Rigidität vermutet. Darüber hinaus fanden sich auf den Membranen infizierter HbCC Erythrozyten weniger, dafür aber kompaktere Protrusionen parasitären Neoantigens. Diese *knobs* sind wesentlich am Prozess der Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten beteiligt, beinhalten jedoch auch Proteine von antigener Bedeutung. Der individuelle Krankheitsverlauf bei Patienten mit HbCC könnte sich demzufolge aus den jeweiligen Anteilen von reduzierter parasitärer Multiplikation, modifizierter Ausbildung von Oberflächenantigenen und gestörter Zytoadhärenz ergeben (Fairhurst *et al.*, 2003). Inwieweit diese Hypothese für HbAC zutrifft, bleibt zu klären.

2.4.1.3. α -Thalassämie

Die α -Thalassämie ist die häufigste monogene Erbkrankheit des Menschen. Der normale α -Globin-Genotyp ist durch ein Paar funktionell identischer α -Globin-Gene auf jedem Chromo-

som 16 charakterisiert ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Bei der in Afrika vorherrschenden Variante der α^+ -Thalassämie kommt es infolge einer Deletion von 3,7 kb zum Verlust eines Gens dieses Paares ($-\alpha$). Eine reduzierte Zahl von α -Globin-Genen korreliert mit einer verminderten Produktion von α -Globin-Ketten. Heterozygote Träger ($-\alpha/\alpha\alpha$) weisen nur geringe Abweichungen hämatologischer Indizes auf. Homozygote Individuen ($-\alpha/-\alpha$) zeigen eine milde mikrozytäre Anämie. Da bei diesen milden Formen der α -Thalassämie nur in der Neugeborenenperiode, und das in einem nicht konstanten Ausmass, das kompensatorisch gebildete Hämoglobin Bart's (γ_4) nachgewiesen werden kann, wurde die Prävalenz dieser Hämoglobinopathie lange unterschätzt. Heute weiss man, dass die α^+ -Thalassämie bei bis zu 50% der Bevölkerung in Afrika auftritt (Lell *et al.*, 1999) und bei bis zu mehr als drei Vierteln der Bewohner in Gebieten Südostasiens wie Papua, Melanesien oder Nepal (Flint *et al.*, 1998).

In Melanesien besteht eine enge Korrelation zwischen der Frequenz der α^+ -Thalassämie und der Endemizität der Malaria (Flint *et al.*, 1986). In Nepal wurde die Fähigkeit der ethnischen Gruppe der Tharu, ein holoendemisches Malariagebiet zu besiedeln, der extrem hohen Prävalenz der α^+ -Thalassämie zugeschrieben (Modiano *et al.*, 1991). Auf der Grundlage der geringen Beeinträchtigung des Homozygoten wird postuliert, dass im Gegensatz zu z. B. HbS, sich die α^+ -thalassämische Deletion nicht in einem balancierten sondern vielmehr in einem transienten Polymorphismus befindet, an dessen Ende die Fixierung der Disposition steht (Modiano *et al.*, 1991). Erstaunlich ist jedoch, dass in Afrika, wo 90% der Malaria-Morbidität und Mortalität auftreten, bislang kein Schutz durch die α^+ -Thalassämie nachgewiesen werden konnte (Allen *et al.*, 1993; Lell *et al.*, 1999). In Vanuatu dagegen war das Risiko für eine schwere Malaria um 60% bei homozygoten und um 34% bei heterozygoten Kindern reduziert (Allen *et al.*, 1997). Bei Unterteilung nach Symptomen zeigte sich kein Schutz vor zerebraler Malaria, wohl aber ein solcher vor schwerer Anämie und Azidose. Die Prävalenz von *P. falciparum* in einer Kontrollgruppe war dagegen unabhängig vom α -Globin-Genotyp. In Papua Neu Guinea wurde eine mildere Ausprägung Malaria-assoziiertes Anämie bei α -thalassämischen Säuglingen beobachtet (Oppenheimer *et al.*, 1987) Diese Befunde weisen darauf hin, dass die α^+ -Thalassämie nicht vor der Infektion *per se* sondern vielmehr vor ihrer Progredienz schützt.

Die dem zugrunde liegenden Mechanismen sind unklar. Epidemiologische Untersuchungen in Vanuatu haben gezeigt, dass die Inzidenz unkomplizierter Malaria insbesondere durch *P. vivax* bei α^+ -thalassämischen Säuglingen und Kindern im Alter unter zwei Jahren gesteigert ist (Williams *et al.*, 1996). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die relativ

benigne *P. vivax*-Infektion, zumal in einem Lebensalter, in dem noch Reste von „Nestschutz“ wirksam sind, im Sinne einer „natürlichen Vakzine“ wirke, die Spezies-überschreitende Kreuzimmunität induziere und so vor der *Malaria tropica* im späteren Kindesalter schütze (Williams *et al.*, 1996). Da *P. vivax* in Afrika nur sporadisch auftritt, kann diese Hypothese jedoch nicht zur Erklärung der hohen Genfrequenzen dort dienen.

In vitro wurde eine reduzierte Multiplikationsrate von *P. falciparum* in α -thalassämische Erythrozyten beobachtet (Pattanapanyasat *et al.*, 1999). Infizierte α -thalassämische Erythrozyten binden mehr IgG von semi-immunen Spendern als infizierte normale Blutzellen, was auf eine gesteigerte oder modifizierte Expression von parasitären Neoantigenen hinweisen könnte (Luzzi *et al.*, 1991). Dies zusammen mit der erhöhten Empfindlichkeit α -thalassämischer Erythrozyten gegenüber oxidativem Stress (Senok *et al.*, 1998) könnte den Befund gesteigerter Phagozyte infizierter α -thalassämischer Erythrozyten erklären (Yuthavong *et al.*, 1988). Zudem bilden infizierte α -thalassämische Erythrozyten nur in verminderten Masse Rosetten, ein Zeichen reduzierter Zytoadhärenz und *in vitro*-Korrelat schwerer Malaria (Carlson *et al.*, 1994).

Ein indirekter Zusammenhang zwischen α -Thalassämie und Malaria kann zudem Bedeutung für die Epidemiologie der Infektion haben. *In vitro* zeigt *P. falciparum* bei Kultur in Erythrozyten von Spendern mit ausgeprägten α -Thalassämie-Syndromen eine reduzierte Sensitivität gegenüber Artemisinin und Chloroquin (Yuthavong *et al.*, 1989), was durch die gesteigerte Aufnahme dieser Substanzen in nicht infizierte Erythrozyten erklärt wird (Kamchongwongpaisan *et al.*, 1994; Kamchongwongpaisan & Yuthavong, persönliche Mitteilung). Inwieweit dies bei den milden Formen der Hämoglobinopathie zutrifft, ist nicht bekannt.

2.4.1.4. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel

Der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-Mangel ist die häufigste Enzymopathie des Menschen. Der Erbgang ist X-chromosomal. Der G6PD-Locus weist eine erstaunliche Variabilität auf; mehr als 80 polymorphe Varianten sind bekannt (Mehta *et al.*, 2000). Im tropischen Afrika treten drei Varianten in polymorphen Frequenzen auf: G6PD B, der Normtyp mit 100% Enzymaktivität, liegt in Prävalenzen von 60-80% vor. G6PD A weist ca. 90% normaler Enzymaktivität auf und kommt in 15-40% vor. Das afrikanische Defizienzallel G6PD A⁻ geht mit einer Enzymaktivität von 10-20% einher und erreicht Prävalenzen bis 25% (May *et al.*, 2000a). Aus dem X-chromosomalen Erbgang ergeben sich Normtypen (Gd^B, Gd^A, Gd^B/Gd^B, Gd^B/Gd^A, Gd^A/Gd^A), heterozygote Frauen (Gd^B/Gd^A, Gd^A/Gd^A), homozygote

Frauen (Gd^{A^-}/Gd^{A^-}) und hemizygoten Männer (Gd^{A^-}). Infolge der variablen Inaktivierung des X-Chromosoms variiert die Enzymaktivität heterozygoter Frauen mit dem Mosaik defizienter und normaler Erythrozyten (Beutler *et al.*, 1962).

G6PD-defiziente Erythrozyten zeigen eine vom Ausmass des Enzymmangels abhängige, gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress. Ursache ist eine verminderte Produktion von NADPH und reduziertem Glutathion. Im Vergleich zu den schweren Formen des G6PD Mangels treten Neugeborenenikterus sowie schwere hämolytische Krisen infolge von Infektionen, Medikamenten oder Nahrungsmitteln (z. B. Fava-Bohne, Favismus) bei G6PD A^- -Defizienz seltener auf. Chronische, subklinische Hämolyse wird jedoch vermutet (May *et al.*, 2000a).

Auch für das Gd^{A^-} Allel besteht eine enge Korrelation zwischen Genfrequenz und Malaria-Endemizität. Eine Fülle von klinisch-epidemiologischen Studien erbrachte jedoch uneinheitliche Ergebnisse (Übersicht bei Ruwende & Hill, 1998). So zeigten in Nigeria Jungen mit dem Typ G6PD A und heterozygote Mädchen mit G6PD A^-/B einen Schutz vor Malaria, nicht aber heterozygote Mädchen mit G6PD A^-/A , homozygote Mädchen oder hemizygoten Jungen (Bienzle *et al.*, 1972). In der bislang grössten Untersuchung zu dieser Fragestellung, die zudem erstmals den G6PD-Status mittels Genotypisierung erfasste, wurden die Ergebnisse zweier Fall-Kontroll-Studien aus Kenia und Tansania analysiert. Dabei zeigte sich, dass die weibliche Heterozygotie für Gd^{A^-} mit einer 46%igen Reduktion schwerer Malaria-Fälle und einem 41%igen Schutz vor milder Malaria assoziiert war. Bei hemizygoten Jungen war die Wahrscheinlichkeit schwerer Malaria um 58% verringert; kein solcher Effekt wurde für das Allel Gd^A beobachtet (Ruwende *et al.*, 1995).

Die Ursache relativer Resistenz gegenüber *P. falciparum* wird in der gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress gesehen (Destro-Bisol, 1999). Dabei wird vermutet, dass die mit der Infektion anfallenden Sauerstoffradikale und andere Stoffwechselprodukte von der defizienten Wirtszelle nicht kompensiert werden können, was hemmend auf das Wachstum des mikroaerophilen Parasiten rückwirkt. Weitere postulierte Mechanismen beinhalten die gesteigerte Lyse und Phagozytose infizierter Zellen und ein vermindertes intrazelluläres Wachstum (Übersicht bei Ruwende & Hill, 1998). Die Befunde zur Hemmung des Parasitenwachstums in G6PD-defizienten Zellen sind aber widersprüchlich (Luzzatto *et al.*, 1969; Roth *et al.*, 1983; Cappadoro *et al.*, 1998). Neure Untersuchungen haben gezeigt, dass mit Ringstadien infizierte G6PD-defiziente Erythrozyten mehr autologes IgG binden als infizierte, normale Blutzellen. Diese gesteigerte Immunerkennung infizierter G6PD-defizienter Erythrozyten schon in einem frühen Stadium im Lebenszyklus des Parasiten in Kombination

mit oxidativen Membranschädigungen, die beide Phagozytose bedingen, könnte einen protektiven Mechanismus darstellen (Cappadoro *et al.*, 1998). Diese Vorstellung erweitert eine ältere Hypothese, nach der Makrophagen, infolge der Phagozytose mit frühen Parasitenformen infizierter, defizienter Zellen, mit geringeren Mengen toxischen Malariapigments konfrontiert werden und die Schädigung des zellulären Sankels der Abwehr daher vermindert wird (Turrini *et al.*, 1993).

2.4.2. Promoterpolymorphismen von Zytokinen und anderen Mediatoren

2.4.2.1. Tumornekrosefaktor- α

Die Rolle des TNF- α als zytotoxischer Effektor und Mediator verschiedener Prozesse in der Zytokinkaskade ist komplex. Der im Mausmodell beobachteten antiparasitären Wirkung, dem primär vorteilhaften, pyrogenen Effekt bei Schizontenruptur, und der beschleunigten Ausheilung bei hoher TNF- α -Produktionskapazität (Kwiatkowski, 1991; Kremsner *et al.*, 1995) stehen hohe Spiegel bei schweren, insbesondere zerebralen, Verläufen der Malaria tropica und deren prognostisch ungünstige Bedeutung gegenüber (Grau *et al.*, 1989; Day *et al.*, 1999).

Das TNF- α -Gen liegt zwischen den für die Humanen Leukozyten Antigene (HLA) I und II codierenden Sequenzen. Von den zehn Einzelnukelotidpolymorphismen im Promoterbereich des TNF- α -Gens wurden drei G \rightarrow A Substitutionen in Zusammenhang mit der Manifestation der Malaria gebracht (TNF-_{238A}, TNF-_{308A}, TNF-_{376A}). Die Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von TNF- α korreliert allerdings nicht mit diesen Polymorphismen. Darüberhinaus bestehen teilweise Verteilungsungleichgewichte zwischen TNF-_{238A} und TNF-_{376A}, TNF-_{308A} und TNF-_{376A} sowie von TNF- α -Promoterpolymorphismen mit unterschiedlichen HLA-Varianten (Knight *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 1999; May *et al.*, 2000b; de Jong *et al.*, 2002).

So verwundert es nicht, dass Fall-Kontroll-Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich Assoziationen zwischen den genannten Polymorphismen und schwerer Malaria kommen. TNF-_{238A} war in Kenia mit Schutz vor zerebraler Malaria vergesellschaftet; in Gambia dagegen mit schwerer Malaria-Anämie assoziiert (McGuire *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 1999). Ebenfalls in Gambia ging das homozygote TNF-₃₀₈-Allel mit erhöhtem Risiko für schwere Malaria einher (McGuire *et al.*, 1994). Dies wurde in Kenia bestätigt, als weiterer unabhängiger Risikofaktor wurde TNF-_{376A} identifiziert (Knight *et al.*, 1999). Keinerlei Zusammenhänge zwischen diesen Polymorphismen und dem Risiko schwerer Malaria wurden in Gabun gesehen (May *et al.*, 2000b). Stattdessen war die Inzidenz asymptomatischer *P.*

falciparum-Infektionen bei Kindern mit TNF_{-238A} und TNF_{-376A} signifikant gesteigert (Missinou *et al.*, 2003). Schliesslich wurde wiederum in Kenia ein Zusammenhang zwischen TNF_{-308A} Homozygotie mit Frühgeburtlichkeit und einer erhöhten Rate hoher Parasitämien im ersten Lebensjahr beobachtet (Aidoo *et al.*, 2001). Angesichts der mangelnden funktionellen Bedeutung der TNF- α -Polymorphismen und den widersprüchlichen Befunden zu ihrer Rolle bei der Malaria ist ein kausaler Zusammenhang nicht zu erkennen. Dies schliesst eine Kopplung in bislang nicht identifizierten, funktionell bedeutsamen Haplotypen nicht aus.

2.4.2.2. Interleukin-10

Die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen beeinflusst Pathogenese und Verlauf der schweren Malaria (Day *et al.*, 1999). Das anti-inflammatorische Th2 Zytokin Interleukin-10 (IL-10) vermittelt eine negative Rückkopplung auf die Produktion von TNF- α nach Endotoxin-Stimulation *in vivo* (van der Poll *et al.*, 1994) oder nach Induktion durch *P. falciparum*-Antigen *in vitro* (Ho *et al.*, 1995). IL-10 wird simultan oder kurz nach Ausschüttung von TNF- α freigesetzt. Plasmaspiegel von IL-10 aber auch von TNF- α , IFN- γ und IL-6 sind bei Thailändischen Erwachsenen mit schwerer Malaria stark erhöht. Sterblichkeit durch schwere, v. a. zerebrale, Malaria war in dieser Gruppe mit im Verhältnis zum pro-inflammatorischen IL-6 relativ erniedrigten Spiegeln von IL-10 assoziiert (Day *et al.*, 1999). Bei Kindern in Ghana wurde, bereinigt für Unterschiede in der Parasitendichte, eine enge Assoziation zwischen der schweren Malaria-Anämie einerseits und einem erniedrigten IL-10:TNF- α Quotienten andererseits beobachtet. Kein solcher Zusammenhang bestand mit zerebraler Malaria (Kurtzhals *et al.*, 1998). Diese Korrelation zwischen einer relativ insuffizienten Produktion von IL-10 und schwerer Anämie wurde bei Kindern in Kenia und Gabun bestätigt (Othoro. *et al.*, 1999; May *et al.*, 2000b). Kurtzhals *et al.* (1998) schlugen vor, dass mit reduzierter Synthese einhergehende Polymorphismen im Promoterbereich des IL-10-Gens (Turner *et al.*, 1997) ursächlich beteiligt sein könnten. In der Tat sind solche Polymorphismen, insbesondere ein bimorphes Allel (G/A) an Position -1082, mit unterschiedlicher IL-10 Sekretion (Turner *et al.*, 1997) und einer Reihe von Autoimmunprozessen und Infektionskrankheiten assoziiert (Übersicht bei: Hurme *et al.*, 1998). In Thailand konnte kein Zusammenhang zwischen dem IL-10-Promoterpolymorphismus -1082G/A und schwerer Malaria beobachtet werden (Ohashi *et al.*, 2002b).

2.4.2.3. Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase Typ 2

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine entscheidende Rolle in der Wirtsabwehr von *P. falciparum*. Hohe Blutspiegel dieses Mediators korrelieren mit beschleunigter Parasiteneliminierung (Kremsner *et al.*, 1996) und schützen vor der Entwicklung von unkomplizierter und zerebraler Malaria (Anstey *et al.* 1996). Antiparasitäre Wirkungen gegen Blutformen von *P. falciparum* *in vitro* (Rocket *et al.*, 1991) wurden ebenso demonstriert wie die Hemmung von Leberstadien im Tiermodell (Seguin *et al.*, 1994). NO supprimiert zudem die Expression von ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) und VCAM-1 (*Vascular Adhesion Molecule-1*) (de Caterina *et al.*, 1995), die an der Zytoadhärenz und mikrovaskulären Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten beteiligt sind (Turner, 1997). Desweiteren drosselt NO die Produktion von TNF- α durch Makrophagen (Florquin *et al.*, 1994). Da hohe Spiegel von TNF- α (Grau *et al.*, 1989) und des im Gewebe gebildeten, analogen Lymphotoxin- α (Engwerda *et al.*, 2002) an der Pathogenese schwerer, v. a. zerebraler Malaria beteiligt sind, könnte NO auf diesem Wege die Ausbildung dieses Krankheitsbildes unterdrücken.

Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (NOS2) des Makrophagen katalysiert die Produktion von NO aus L-Arginin. Die Assoziation zwischen NO-Spiegeln und Krankheitsverlauf (Kremsner *et al.*, 1996) legte die Existenz von Polymorphismen im Promoter-Bereich des NOS2 Gens nahe. Tatsächlich wurden bislang zwei Varianten (Prävalenzen: 5-10%) in afrikanischen nicht aber in kaukasischen Populationen nachgewiesen: a) ein Basenaustausch an Position -954 (NOS2^{-954 G→C}) (Kun *et al.*, 1998b) und b) ein Basenaustausch an Position -1173 (NOS2^{-1173 C→T}) (Hobbs *et al.*, 2002). Während Kun *et al.* (2001) eine gesteigerte NOS2-Enzymaktivität infolge der NOS2^{-954 G→C} Mutation beschrieben, konnte bei Tanzanianischen Kindern mit diesem Allel keine Variation von Stickstoffmetaboliten nachgewiesen werden (Levesque *et al.*, 1999). Gleiches trifft auf den Genotyp eines kurzen (< 11 Kopien) Pentanukleotid-*Repeats* (CCTTT)_n ca. 2,5 kb vor dem Transkriptionsstartcodon zu, das mit Sterblichkeit bei zerebraler Malaria in Zusammenhang gebracht wurde (Burgner *et al.*, 1998). Stickstoffmetabolite in Urin und Plasma waren jedoch bei Tanzanianischen Kindern mit heterozygotem NOS2^{-1173 C→T} Genotyp um ca. 50% erhöht (Hobbs *et al.*, 2002).

Die klinischen Befunde zur Assoziation zwischen den NOS2 Promoter-Polymorphismen und der Malaria sind uneindeutig. Im Gabun, nicht aber in Tansania (Levesque *et al.*, 1999), wurde bei Kindern mit der heterozygoten Anlage des NOS2^{-954 G→C} Allels ein Schutz vor der schweren Malaria in der Grössenordnung der Protektion durch HbAS beobachtet (Kun *et al.*, 1998b). Darüber hinaus war die Inzidenz unkomplizierter Malaria bei diesen Kindern

signifikant erniedrigt (Kun *et al.*, 2001). In Tansania ging Heterozygotie für $\text{NOS2}^{-1173 \text{ C} \rightarrow \text{T}}$ mit einem signifikanten Schutz vor unkomplizierter und vor schwerer Malaria einher. Zudem zeigte sich in einer kenianischen Kohorte eine 75%ige Reduktion von Fällen schwerer, Malaria-assoziiertes Anämie. Die Inzidenz der *P. falciparum*-Infektion *per se* wurde von diesem Genotyp jedoch nicht beeinflusst (Hobbs *et al.*, 2002). Höhere Sterblichkeit an zerebraler Malaria bei Vorliegen des kurzen $(\text{CCTTT})_{<11 \text{ repeats}}$ wurde in Gambia beschrieben (Burgner *et al.*, 1998), keine Assoziation mit schwerer Malaria dagegen in Gabun, Tansania oder Kenia (Levesque *et al.*, 1999; Kun *et al.*, 2001; Hobbs *et al.*, 2002). In Thailand wurde gar eine Häufung langer Allele (≥ 15 Kopien) bei Patienten mit schwerer Malaria beobachtet (Ohashi *et al.*, 2002). Diese Befunde werden durch die offensichtliche Kopplung der Promoterpolymorphismen mit den $(\text{CCTTT})_n \text{ repeats}$ nicht vereinfacht. In Tansania wiesen 92% der Kinder mit $\text{NOS2}^{-1173 \text{ C} \rightarrow \text{T}}$ 13 Kopien auf vs. 32% bei Kindern mit dem NOS2 Wildtyp. Die höhere Fallzahl bei kenianischen Kindern, bei denen ebenfalls diese Kopplung bestand, ermöglichte die Aussage, dass $\text{NOS2}^{-1173 \text{ C} \rightarrow \text{T}}$ und nicht das lange $(\text{CCTTT})_n$ -Allel mit Schutz vor schwerer Malaria assoziiert war. Die Fallzahl schloss darüber hinaus die Analyse der klinischen Bedeutung der schwächeren Kopplung zwischen $\text{NOS2}^{-954 \text{ G} \rightarrow \text{C}}$ und dem $(\text{CCTTT})_8$ -Allel aus (Hobbs *et al.*, 2002). Inwiefern Haplotypen, z. B. $\text{NOS2}^{-1173 \text{ C} \rightarrow \text{T}}/(\text{CCTTT})_{13}$, frühere Befunde zur erhöhten Sterblichkeit bei zerebraler Malaria infolge eines kurzen (CCTTT) -Allels (Burgner *et al.*, 1998) erklären können, oder ob weitere Verteilungsungleichgewichte mit bisher nicht identifizierten Polymorphismen bestehen, ist derzeit nicht bekannt.

2.4.3. Residuelle, antiparasitäre Medikamentenspiegel

Untersuchungen zur Epidemiologie und Manifestation der Malaria müssen heute einen potentiellen Einfluss residueller antiparasitärer Medikamentenspiegel als nicht-hereditären Wirtsfaktor berücksichtigen. In den Endemiegebieten Afrikas mit ihren unzureichenden medizinischen Strukturen erfolgt der Grossteil initialer Behandlungsversuche bei Malaria mittels traditioneller Heilverfahren. Zudem werden ca. 50% der Malariamedikamente, v. a. Chloroquin, ohne bzw. vor Kontakt mit dem Gesundheitssystem eingenommen. Chloroquin zählt neben Azetylsalicylsäure und Paracetamol zu den drei am häufigsten verwendeten Medikamenten weltweit. Geschätzte 190 Tonnen Chloroquin-Base wurden 1988 alleine in Afrika verbraucht, das entspricht einer Grössenordnung von 800 Millionen regulären, pädiatrischen Dosen. Sulfadoxin-Pyrimethamin (z. B. Fansidar) folgt mit grossem Abstand; andere Malariamedikamente spielen eine untergeordnete Rolle. Eigenbehandlung, Fehldosierung sowohl

ausserhalb als auch innerhalb des Gesundheitssystems, unzureichende Behandlungstreue und die weit verbreitete „präsumptive“ Therapie ohne fundierte Diagnosestellung sind häufig (Wernsdorfer, 1991; Foster, 1994). Die Halbwertszeit von Chloroquin beträgt zwei bis drei Wochen (Wetsteyn *et al.*, 1995). Die wenigen diesbezüglichen Untersuchungen legen nahe, dass der Nachweis von Chloroquin-Blutspiegeln bei Kindern in vielen Endemiegebieten mehr der Regel als der Ausnahme entspricht. So wurden in Tansania ganz überwiegend subprophylaktische Konzentrationen bei 80% von Schulkindern (Hellgren *et al.*, 1994) und bei 98% von Kindern, die einen Gesundheitsposten aufsuchten (Nsimba *et al.*, 2002), nachgewiesen. Residuelle Medikamentenspiegel tragen wesentlich zur Resistenzentwicklung von *P. falciparum* bei (Wernsdorfer, 1991). Ihre Bedeutung darüber hinaus ist kaum untersucht worden. Neben der Eliminierung von *P. ovale* und *P. malariae* auch durch niedrige Konzentrationen von Chloroquin (Hellgren *et al.*, 1994) und den möglicherweise damit verbundenen Effekten auf die Epidemiologie von *P. falciparum* (Richie, 1988; Maitland *et al.*, 1997) liegt es nahe, dass residuelle Medikamentenspiegel die klonale Zusammensetzung individueller *P. falciparum*-Infektionen, z. B. durch Hemmung sensibler Genotypen, beeinflussen. Insuffiziente Chemoprophylaxe führt zu einer relativen Reduktion der Multiplizität von *P. falciparum*, was auf die Aufrechterhaltung protektiver Immunität rückwirken könnte (Beck *et al.*, 1999). Einige Hämoglobinopathien gehen mit unterschiedlicher Wirksamkeit oder Pharmakokinetik von Malaria-medikamenten einher (Brandling-Bennett *et al.*, 1988; Yuthavong *et al.*, 1989; Kamchongwongpaisan *et al.*, 1994; Terlouw *et al.*, 2002). Zur tatsächlichen, klinisch-epidemiologischen Relevanz diese Zusammenhänge liegen keine Daten vor.