

2. Material und Methoden

2.1. Studienort

Das westafrikanische Land Ghana, welches von den Staaten Burkina Faso (im Norden), Elfenbeinküste (im Westen), Togo (im Osten) und dem Golf von Guinea (im Süden) begrenzt wird, erstreckt sich über eine Fläche von 238 537 Quadratkilometern. Es beherbergt ca. 17,7 Millionen Einwohner. Man kann es in drei geographische Regionen mit der jeweils entsprechenden Klimazone einteilen: Die relativ trockene Küstenregion mit der Hauptstadt Accra verfügt über zwei Regenzeiten, die von April bis Juni bzw. September bis Oktober andauern. Es herrschen Maximaltemperaturen um 30°C und eine konstante Luftfeuchtigkeit von ca. 80 %. In der zentralen Waldregion (Ashanti-Region), in der diese Studie durchgeführt wurde, sind die Regenfälle schwerer und länger anhaltend. Es bestehen zwei Regenzeiten. Demgegenüber weist das nördliche, auf einem Plateau befindliche, Drittel des Landes (mit der Hauptstadt Tamale) nur eine Regenzeit, die von April bis Oktober andauert und eine geringere Luftfeuchtigkeit mit höheren Maximaltemperaturen auf. Ghana beheimatet verschiedene Volksgruppen, wie die Akan (zu denen auch die Ashanti gehören), die Mossi, Ewe, Ga und Fanti. Der in der Ashanti-Region gelegene Studienort Agogo ist von grünen Hügeln, Wäldern und Farmen umgeben. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurden im Presbyterian Mission Hospital von Agogo durchgeführt, welches 1931 von der Baseler Mission gegründet wurde. Es verfügt über 250 Betten und stellt ein wichtiges medizinisches Versorgungszentrum für ungefähr 130 000 Menschen aus Agogo und Umgebung dar. Der hier vorherrschende Malariaerregertypus ist *Plasmodium falciparum*, gefolgt von *Plasmodium ovale* und *malariae*. *Plasmodium vivax* ist in Westafrika nicht beheimatet. Malaria tritt in Ghana hyperendemisch auf. Übertragung und Inzidenz erreichen während und nach beiden Regenzeiten ihr Maximum (Browne *et al.*, 2000; Quaterly Health Statistics, Presbyterian Mission Hospital Agogo, unveröffentlicht).

2.2. Studienrahmen

2.2.1. Rekrutierung der Probanden

Diese Studie wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes des Institutes für Tropenmedizin, Berlin, der University of Science and Technology, Kumasi und des Agogo Hospitals zum Thema „Malaria in der Schwangerschaft und im ersten Lebensjahr“ durchgeführt. Das Studienprotokoll

wurde durch das Committee on Human Research, Publication and Ethics, University of Science and Technology, Kumasi, geprüft und freigegeben.

Kurz vor der Geburt stehende Frauen, die zur Entbindung das Presbyterian Mission Hospital Agogo aufsuchten, wurden um ihre Teilnahme an dieser Studie gebeten, nachdem sie ordnungsgemäß in der regionsüblichen Sprache Twi über Bedingungen, Verlauf und Ziele der Studie von einer ortsansässigen Hebamme aufgeklärt wurden. Die Einverständniserklärung erfolgte in Form einer Unterschrift oder eines Daumenabdruckes. Die Rekrutierung der Mütter und der dazugehörigen Neugeborenen erfolgte zwischen dem 24. Januar 2000 und 20. Januar 2001.

Ich leitete über einen Zeitraum von sieben Monaten das Studienlabor und nahm in Zusammenarbeit mit der deutschen Kinderärztin Dr. Christiane von Gaertner, einer Krankenschwester und den Labor- und Studienhelfern die Daten der Monats- und Extrabesuche auf (körperliche Untersuchung und Anamnese der letzten Wochen, Körpergröße und -gewicht der Kinder, Hb (Hämoglobingehalt), Körpertemperatur, Herstellung und Mikroskopie von über 1000 „Dicken Tropfen“ zur Bestimmung von *P. falciparum*-Infektionen und Parasitendichten, Herstellung der Ausstriche, Leukozytenzahl-Ermittlung mittels Zellzähler, Gewinnung von Serum, Therapie). In Begleitung der Studienhelfer besuchte ich die 140 Familien zu Hause und nahm ihre sozioökonomischen Daten auf. Die Daten der in Berlin durchgeführten genetischen Untersuchungen (IL-10- und TNF- α -Promoterpolymorphismen, *P. falciparum*-Nachweis mittels PCR) wurden mir zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Definition der Studiengruppe

Die Kinder wurden nach Geburt rekrutiert und von da an monatlich (und zusätzlich bei Erkrankungen außerhalb des Monatstermins) bis zum ersten Geburtstag untersucht. Es werden nur solche Kinder berücksichtigt, die an wenigstens 10 der 13 möglichen Termine vorstellig wurden (n = 140).

2.2.3. Untersuchung und Beurteilung der Neugeborenen

Zunächst wurde der APGAR-Score durch die bei der Geburt anwesende Hebamme nach einer, fünf und zehn Minuten bestimmt. Dabei wurden die üblichen Kriterien, wie Aussehen, Puls, Grimassieren beim Absaugen, Aktivität und Respiration überprüft und für die einzelnen Kategorien Punkte zwischen 0 und 2 vergeben. Nach der Gesamtpunktzahl (zwischen 1 und 10) wurde der Zustand des Kindes beurteilt. Anschließend maß man das Gewicht des Neugeborenen auf einer Handwaage. Die Pädiaterin des Krankenhauses erstellte innerhalb von 24 Stunden *post*

2. MATERIAL UND METHODEN

partum einen Status, in welchem Körperlänge und Kopfumfang (mit Hilfe eines Maßbandes gemessen) und die Temperatur des Kindes (axillär bestimmt) festgehalten wurden. Die allgemeine körperliche Untersuchung umfasste eine Inspektion, die Auskultation von Herz und Thorax, die Palpation des Abdomens und der Genitale sowie eine orientierende neurologische Untersuchung. Außerdem wurde das Gestationsalter (nach Finnström *et al.*, 1977) ermittelt, um den Reifegrad des Neugeborenen festzustellen. Hierzu bediente man sich der Bestimmung der sieben Reifezeichen Hautdurchsichtigkeit am Rumpf, Ausbildung der Brustwarze, Größe des Brustdrüsengewebes, Festigkeit des Ohres, Wachstum des Daumenfingernagels, Beschaffenheit des Kopfhaares und Ausbildung der plantaren Fältelung. Aus dem sich ergebenden Gesamtpunktwert (zwischen 7 und 23) lässt sich das Gestationsalter ermitteln. Die Frühgeburtlichkeit wurde als ein Geburtstermin vor der 37. Schwangerschaftswoche und ein geringes Geburtsgewicht als ein Gewicht < 2500 g bei Geburt definiert.

Anschließend wurden dem Kind 2 ml venösen Blutes aus dem Handrücken entnommen und in ein EDTA-Röhrchen gegeben.

2.2.4. Planung und Verlauf der klinischen Untersuchungen

Im Rahmen dieser Studie wurden die Probanden sowohl regulär einmal pro Monat (Monatsbesuch) untersucht, als auch, wenn außerhalb dieses Termins Erkrankungen jedweder Genese zu behandeln waren (Extrabesuch).

Die monatliche Hauptuntersuchung beinhaltete das Messen von Körpergröße, -gewicht und axillärer Temperatur sowie die Erhebung von Anamnese und körperlicher Untersuchung. Gleichzeitig wurde ein Fragebogen zu den in den letzten vier Wochen vorgefallenen Erkrankungen und deren Behandlung ausgefüllt. Eine Krankenschwester entnahm Blut aus dem Handrücken und überführte dieses sogleich in ein EDTA-Röhrchen. Trat während dieser Untersuchung ein Verdacht für das Vorliegen einer klinischen Malaria, wie zum Beispiel eine Hämoglobinkonzentration < 7 g/dl, eine Körpertemperatur $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ (Fieber: Gilles 1991) oder andere verdächtige Symptome (Erbrechen, Durchfall, Essensverweigerung, Krampfanfall, Blässe, gelbes Hautkolorit, Infektion der oberen Atemwege) auf, wurde das mikroskopische Präparat sofort untersucht (s.u.) um bei positivem Befund eine Malariatherapie einzuleiten.

Zu den so genannten Extrabesuchen kamen Mutter und Kind, wenn sich Krankheiten unterschiedlichster Genese außerhalb des Monatstermins ereigneten. Eine Anamnese der Krankheitssymptome wurde unter Berücksichtigung vorangegangener Erkrankungen der letzten Tage und Wochen erhoben, die Temperatur gemessen und dem Kind per Lanzettstich Blut aus der Ferse entnommen. Nach Bestimmung der Parasitämien (s.u.) wurden an Malaria erkrankte

Kinder behandelt und drei Tage später zur Nachuntersuchung einbestellt. Der Anwendungsbereich und die Art der medikamentösen Therapie sind unter 2.2.5. und 2.2.6. aufgeführt.

Außerdem suchten geschulte Studienhelfer die Probanden einmal pro Woche zu Hause auf, um sie an die Untersuchungstermine zu erinnern und im Krankheitsfalle in das Studienlabor zu überweisen.

2.2.5. Behandlungskriterien

In dieser Studie wurde eine Erkrankung dann als Malaria definiert und auch behandelt, wenn mikroskopisch mindestens ein Parasit und Fieber (axilläre Temperatur $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) nachgewiesen werden konnten. Außerdem wurden Parasitendichten ≥ 5000 Plasmodien/ μl Blut auch ohne das Vorliegen von klinischen Symptomen behandelt.

2.2.6. Medikamente

Die von der Kinderärztin je nach Schwere der Erkrankung verordneten Malariamedikamente sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: Medikamentöse Therapie bei Malaria

Medikamente	Einsatz
Chloroquin	- unkomplizierte Malaria
Sulfadoxin-Pyrimethamin	- Parasitämien bei Nachuntersuchung innerhalb einer Woche
Sulfadoxin-Pyrimethamin und Chloroquin	- symptomatische Parasitämie von ≥ 500 Parasiten/500 Leukozyten
Chinin i.m. über 3 Tage und Sulfadoxin-Pyrimethamin	- schwere Malaria (WHO, 1990)

2.2.7. Sozioökonomische Untersuchung der Probanden

Die 140 Probanden wurden zu Hause von geschulten Studienhelfern und der Laborleiterin besucht, um einen objektiven Überblick über die Wohn- und Lebensverhältnisse der Familie zu erhalten, die einen Einfluss auf das Auftreten einer Malaria haben könnten. Hierzu wurden besonders der Wohnort (Stadtzentrum, Stadtperipherie oder Regenwald), die Wohnsituation der Familie (Sauberkeit im Haushalt, offene Wasserstellen in unmittelbarer Nähe des Hauses) und die Anwendung eines Moskitoschutzes (Verwendung von Moskitonetzen an Bett, Tür und Fenstern; Verwendung von Moskitosprays u.a.) objektiv und standardisiert erfasst. Die erfragten

Faktoren - wie das Lesevermögen und die Schulbildung der Eltern - waren einer relativen Unsicherheit unterlegen und wurden durch das Nehmen von Schrift- und Leseproben verifiziert.

2.3. Untersuchungen im Labor

2.3.1. Bestimmung der Parasitämien

Für jeden Probanden der Studie wurden sowohl zwei „Dicke Tropfen“ zur Bestimmung der Parasitämie als auch zwei Blutaussstriche zur Speziesdifferenzierung angefertigt. Zur Herstellung des „Dicken Tropfens“ wurden sofort nach Blutentnahme zwei ca. 5 µl messende Tropfen EDTA-Blutes auf einen Objektträger aufgebracht und dort auf einer Fläche von jeweils ca. 1.5 mm² mittels einer Pipettenspitze dünn verteilt. Parallel wurde ein Ausstrich angefertigt, indem ca. 5 µl Blut unter Zuhilfenahme eines weiteren Objektträgers der Länge nach ausgestrichen wurden, um eine einschichtige Verteilung der Erythrozyten zu erreichen. Danach ließ man die so hergestellten Präparate über Nacht an der Luft trocknen. Ohne vorherige Fixierung erfolgte die Färbung des „Dicken Tropfens“ in 4 % (v/v) Giemsa in Titrisol-Pufferlösung von pH 7.2 (Merck) für ca. 30 Minuten. Anschließend wurde mit Titrisol-Pufferlösung gespült und die gefärbten Präparate erneut an der Luft getrocknet. Darauf folgend wurde der „Dicke Tropfen“ mittels eines Lichtmikroskops (Wilocyt, Will, Wetzlar) bei eintausendfacher Vergrößerung und Verwendung des Ölimmersionsobjektives betrachtet. Zur Beurteilung der Parasitämien wurde die Anzahl der asexuellen Parasiten pro 500 gezählter Leukozyten ermittelt und die Parasitendichten, gegeben als Parasiten je µl Blut, aus der Zahl der Leukozyten je µl Blut errechnet. Die getrockneten Ausstriche wurden zunächst in absolutem Methanol eine Minute fixiert, luftgetrocknet und später im Tropeninstitut zu Berlin gefärbt und beurteilt.

2.3.2. Bestimmung des Hämoglobingehaltes

Der Hämoglobingehalt wurde ermittelt, indem man sofort nach Blutentnahme eine geringe Menge (ca. 15 µl) des Blutes in eine HemoCue-Küvette der Firma Ångelholm, Schweden, verbrachte und diese in das Photometer derselben Firma einlegte. Um eine einwandfreie Messqualität der Proben zu erreichen, wurde jeden Tag eine Kalibrierung des Gerätes mittels der vom Hersteller beigefügten Eichküvette durchgeführt. Die Definition der Anämie (Hb < 11 g/dl) im ersten Lebensjahr wurde dem Lehrbuch der pädiatrischen Hämatologie von Nathan und Oski (1992) entnommen. Eine schwere Anämie wurde als Hb < 7 g/dl definiert. Die Malaria-Anämie und schwere Malaria-Anämie wurden als Hb < 11 bzw. < 7 g/dl in Anwesenheit eines positiven PCR-Ergebnisses definiert.

2.3.3. Bestimmung der Leukozytenzahl

Innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme wurde die Leukozytenzahl mittels eines halbautomatischen Zellzählgerätes (HC555, Clinicon, Mannheim) ermittelt. Dieses Gerät misst die Widerstandsänderungen des Stromflusses in der untersuchten Flüssigkeit. Zunächst wurde nach Anleitung des Protokolls zur Messung der Leukozytenzahlen ein Ansatz aus einer definierten Menge isotoner Pufferlösung (10 ml) und EDTA-Blutes (40 µl) hergestellt, dieser vorsichtig durch mehrmaliges Umdrehen des geschlossenen Messgefäßes gemischt und dann mit 6 Tropfen zyanidhaltigem Reagenz versetzt, um Erythrozyten zu lysieren und so einer Verfälschung der Werte vorzubeugen. Davon wurde dann ein bestimmtes Volumen durch eine Kapillare definierten Durchmessers gepumpt. Es kam zu einem Anstieg des Widerstandes, sobald ein Partikel (in diesem Falle ein Leukozyt) die Kapillare passierte. Die gemessene Änderung des Widerstandes wurde in Bezug zum Volumen an gepumpter Blutsuspension gesetzt und so die Leukozytenzahl ermittelt.

2.3.4. Extraktion von DNA

Um die Haltbarkeit der EDTA-Blutproben bei tropischen Temperaturen zu gewährleisten und den späteren Transport nach Berlin zu erleichtern, wurden diese mit einem Puffergemisch versetzt. Hierzu wurden 90 µl Erythrozytensediment in ein Eppendorfröhrchen mit 270 µl Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer (AS1, Quiagen) (=Tropenpuffer) pipettiert. Das hier angewandte Verfahren zur DNA-Extraktion aus kernhaltigen Leukozyten beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, in Anwesenheit der Substanz Guanidiniumhydrochlorid an Silikamoleküle zu binden. Zunächst versetzte man die Blutprobe mit Guanidiniumhydrochlorid und Proteinase K, wodurch die Lyse der Zellen eingeleitet und Zellkerne aufgeschlossen werden. Nach Bindung der DNA an Silikamoleküle erfolgten mehrere Waschschriffe mit alkoholischen Lösungsmitteln und schließlich die Elution der DNA in wässrige Lösung (Gillespie & Hardman, 1979). Entsprechend der Vorgaben des QIAmp Blood Kits (Qiagen, Hilden) wurde die Versuchsreihe durchgeführt. Konzentrationsangaben der verwendeten Substanzen liegen nicht vor.

-Lyse-Puffer (AL): wässrige Lösung von Guanidiniumhydrochlorid

-Proteinase K: aus *Tritirachium album*, 1.1 g/ml

-Waschpuffer (AW): ethanolische Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl

-Elutionspuffer (AE): wässrige Lösung von NaCl und Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl

2. MATERIAL UND METHODEN

Im ersten Arbeitsschritt wurden zu den 360 µl Blut-Puffergemisch das gleiche Volumen an Lysepuffer und 25 µl Proteinase K (1.1 g/ml) gegeben und diese Lösung auf einem Zellvortexgerät gründlich gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 56°C für die Dauer von 20 Minuten inkubiert und mit 210 µl absolutem Ethanol versetzt. Der sich nun anschließende Arbeitsvorgang bestand darin, die Proben zunächst auf eine mit einem Silika-Filter versehene Zentrifugensäule mit Auffanghülse (Microspin columns, Quiagen, Hilden) zu verbringen und sie dann bei 8000 UpM für eine Minute zu zentrifugieren. Das Filtrat wurde verworfen und es folgten zwei Waschschriffe durch Zugabe von jeweils 500 µl Waschpuffer. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 8000 UpM für eine Minute wurde das Filtrat erneut verworfen. Die an den Silika-Filter gebundenen Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer oder 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), Inkubation bei 70°C für fünf Minuten und Zentrifugation bei 8000 UpM für eine Minute eluiert. Durch dieses Verfahren wurden aus 360 µl Sediment-Puffergemisch ca. 6 µg DNA gewonnen. Anschließend wurden die Proben mittels einer Vakuumzentrifuge (Con-1000 Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge; Conjet) auf 50 % ihres Ausgangsvolumens konzentriert, so dass sich DNA-Konzentrationen von 100 bis 120 µg/µl ergaben. Darauf folgend wurden die Proben entweder der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zugeführt oder bei -20°C gekühlt.

2.3.5. Nachweis der *Plasmodium falciparum*-Infektion mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine einfache und hoehsensitive Methode zum Nachweis von DNA-Sequenzen. Zunächst wird die während der DNA-Extraktion gewonnene doppelsträngige DNA, die die nachzuweisende Sequenz enthält, bei Temperaturen zwischen 94°C und 99°C denaturiert und damit in Einzelstränge zerlegt. Durch eine sich anschließende Temperatursenkung können nun Primer (synthetische Oligonukleotide) an die die Zielsequenz flankierenden, komplementären DNA-Abschnitte binden und somit den Ausgangspunkt der Neusynthese markieren. Nun kann die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (= Taq-Polymerase) von diesen Abschnitten ausgehend unter Verbrauch von Desoxynukleotid-triphosphaten (dNTP) und bei auf Syntheseoptimum abgesenkter Temperatur, komplementäre DNA-Einzelstränge zur gekennzeichneten DNA-Sequenz synthetisieren. Die einzelnen Reaktionsschritte werden zwischen 25- und 50-mal wiederholt, wobei das entstandene Produkt jeweils als Substrat für erneute Vervielfältigungen (Amplifizierung) dient und somit ein exponentielles Anwachsen des Reaktionsproduktes zu verzeichnen ist. Ein abschließender Reaktionsschritt beim Temperaturoptimum der Taq-Polymerase dient der Komplettierung teilweise synthetisierter DNA-Stränge.

2. MATERIAL UND METHODEN

Das sich anschließende Protokoll basiert auf der Erstbeschreibung der PCR durch Saiki *et al.* (1985), als auch auf der Anwendung zum diagnostischen Nachweis einer *P. falciparum*-Infektion (Snounou *et al.*, 1993). Sämtliche Primer wurden nach Vorgabe der Nukleotidsequenz von einem kommerziellen Anbieter (MWG biotech) bezogen.

Verwendete Substanzen:

- Taq-Polymerase (5000 U/ml, Pharmacia)
- dNTP-Gemisch (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia): 25 mM Deoxyadenosintriphosphat (dATP), 25 mM Deoxycytosintriphosphat (dCTP), 25 mM Deoxythymidintriphosphat (dTTP), 25 mM Deoxyguanintriphosphat (dGTP)
- Reaktionspuffer (Pharmacia): 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0

Die PCR zum Nachweis von *P. falciparum* wurde als Verfahren in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgte die genusspezifische Amplifizierung des Gens, das für die Ribonukleinsäure der kleinen Untereinheit der parasitären Ribosomen kodiert (ssrRNA-Gen). In einem zweiten Schritt wurde dieses Amplikon als Matrize für die Vervielfältigung von *P. falciparum*-spezifischen Bereichen des ssrRNA-Gens verwendet.

Das für die Gattung *Plasmodium* spezifische ssRNA-Gen wurde durch Gebrauch der Primer **rPUL5** (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3') und **rPUL6** (5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3') amplifiziert. Diese Amplifizierung erfolgte in einem Volumen von 50 µl Reaktionspuffer mit 500 mM dNTP's, 200 nM jeweils für die Primer rPUL5 und rPUL6 und 1,5 U Taq-Polymerase. Als Matrize dienten 0,5 µl DNA, entsprechend ca. 50 ng bei einer Konzentration von 100 ng/µl. Als Reaktionsbehältnis wurde ein PCR-Röhrchen mit Stempel-Deckel (Sarstedt) benutzt. Die zyklische Amplifizierung erfolgte in einem automatischen PCR-Gerät (Triothermoblock, Biometra) nach folgendem Schema:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für fünf Minuten
2. 25 Zyklen der Schritte:
 - Denaturierung bei 94°C für eine Minute
 - Primeranlagerung bei 58°C für zwei Minuten
 - Extension bei 72°C für zwei Minuten
3. Abschließende Extension bei 72°C für fünf Minuten

Ein Volumen von 0,5 µl des Reaktionsproduktes wurden in einer zweiten „nested“ PCR als Matrize für die Amplifizierung des *P. falciparum*-spezifischen Bereiches des ssrRNA-Gens

2. MATERIAL UND METHODEN

verwendet. Der Reaktionsansatz, die Konzentration der eingesetzten Reagenzien und das Temperaturschema der Amplifizierung entsprachen den Bedingungen der genusspezifischen PCR. Durch den Einsatz der *P. falciparum*-spezifischen Primer **rFAL1** (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3') und **rFAL2** (5'-ACA CAA TGC ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3') wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 205 bp gewonnen. Dieses wurde in der sich anschließenden Agarose-Gel-Elektrophorese dargestellt.

2.3.6. Bestimmung des Interleukin 10 -1082G/A-Promoterpolymorphismus

Zur Bestimmung des IL-10-Polymorphismus an Position -1082 verwendeten wir die unten angegebene Versuchsanordnung von Bazrafshani *et al.* (2000).

PCR Primer: **Forward:** 5'-GTC AGT GTT CCT CCC AGT-3'

Reverse: 5'-TTA CCT ATC CCT ACT TCC TC-3'

Der „Vorwärts-Primer“ bindet an Position -1356 und der „Rückwärts-Primer“ an Position -1062. Die generierte PCR-Produktlänge beträgt 295 bp. Eine Thymidin-Base am 3'-Ende des Reverse-Primers (unterstrichen) wurde von einem Cytosin ausgehend mutiert, um eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* zu schaffen. Das PCR-Produkt wird in Anwesenheit des G-Allels nicht geschnitten. Demgegenüber entstehen in Anwesenheit des A-Allels zwei Banden (275 und 20 bp).

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

100 ng DNA wurden in einer 25 µl PCR-Reaktionslösung amplifiziert, die sich aus:

- 10 x KCl Puffer (beinhaltet 1.5 mM MgCl₂; Bioline)
- 0.2 mM jedes dNTPs (Bioline)
- 25 µM jeden Primers
- 11.9 µl destillierten Wassers
- 1 U Taq-Polymerase (Bioline)
- 1 mM Betaine (Sigma) zusammensetzte.

Um eine initiale Denaturierung zu induzieren, wurden die Proben drei Minuten lang auf 95°C erhitzt. Anschließend folgten weitere Erhitzungsschritte in 35 Zyklen à eine Minute auf 95°C, eine Minute auf 52°C und eine Minute auf 72°C. Der abschließende Erhitzungsschritt wurde für

2. MATERIAL UND METHODEN

eine Dauer von fünf Minuten bei 72°C durchgeführt. Die PCR-Produkte (295 bp) wurden nun auf einem 1 %-igen Agarosegel, welches mit Ethidiumbromid angefärbt war, nachgewiesen.

Das Reaktionsgemisch setzte sich aus den PCR-Produkten (6,0 µl), dem Puffer (1,5 µl), Enzym (*EaeI*, 4 IE pro Reaktion) und destilliertem Wasser (7,1 µl) zusammen. Außerdem wurden jeweils zwei Tropfen flüssigen Paraffins zugefügt und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Das G-Allel erbrachte ein Produkt von 295 bp und das A-Allel zwei Fragmente von 275 und 20 bp.

2.3.7. Bestimmung des Tumornekrosefaktor alpha -308G/A-Promoterpolymorphismus

Die Typisierung des TNF alpha -308G/A-Promoterpolymorphismus folgte dem Protokoll von Wilson *et al.* (1992).

Ein Basenwechsel am 3'-Ende des Primers A1 (unterstrichen) diene als Erkennungsregion für das *NcoI*-Restriktionsenzym.

PCR-Primer: A1: 5' AGGCAATAGGTTTTGAGGG^CCAT 3'

A2: 5' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 3'

PCR-Bedingungen:

Die Amplifizierung von 100 ng genomischer DNA wurde unter Verbrauch von je 0.2 µM an Primer A1 und A2 in einem Gesamtvolumen von 50 µl, bestehend aus:

1.25 U Taq-DNA-Polymerase, 200 µM jedes dNTP, 10 mM Tris-HCL-Reaktionspuffer, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 0.1 % Triton X-100, durchgeführt.

Die Denaturierung erfolgte in verschiedenen Erhitzungsschritten: 94°C (3 min), 60°C (1 min), 72°C (1 min). Darauf folgten 35 Zyklen bei 94°C (1 min), 60°C (1 min) und 72°C (1 min) mit einem abschließenden Zyklus von 94°C (1 min), 60°C (1 min) und 72°C (5 min).

Die PCR-Produkte zur Bestimmung der TNF-α -308-Variante wurden mit Hilfe des *NcoI*-Restriktionsenzym geschnitten und deren Produkte mit Hilfe der Elektrophorese (4 %-iges Agarosegel) getrennt. Das Allel 1 (308G) konnte durch das Entstehen von zwei Fragmenten von 87 und 20 bp identifiziert werden. Das Allel 2 (308A) wurde nicht geschnitten und wies ein Fragment mit einer Länge von 107 bp auf.

Banden: 107 bp (AA); 87 und 20 bp (GG); 107, 87 und 20 bp (GA)

2.4. Statistische Berechnungen

Die theoretischen Grundlagen der statistischen Berechnungen basieren auf den Handbüchern von Kreienbock & Schach (1997) und Weiß *et al.* (2001). Alle Berechnungen wurden mit den Programmen SPSS, SPLUS, Stata oder Excel (Microsoft) durchgeführt.

2.4.1. Assoziationsberechnungen (χ^2)

Der Mehrfelder-Kontingenztest auf Heterogenität wurde durchgeführt, um Assoziationen zwischen Merkmalsausprägungen nominalen Charakters zu analysieren. Die Nullhypothese wurde unter der Forderung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ formuliert, dass die Merkmale voneinander unabhängig sind. Traf sie nicht zu, bestand ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen und eine Alternativhypothese wurde formuliert. Die Häufigkeiten der Merkmalskombinationen wurden in Form der Vierfeldertafel unter Verwendung des χ^2 -Tests analysiert (Tab. 2.2), wobei tatsächliche mit erwarteten Beobachtungen verglichen wurden. Bei einem kleinen Stichprobenumfang (Gesamtsumme der Vierfeldertafel < 20 oder eines einzelnen Feldes < 5) wurde der **exakte Fisher-Test** angewandt.

Tab. 2.2: Beispiel für eine Vierfeldertafel

	Wildtyp	Mutation
Woche 4	<i>a</i>	<i>b</i>
Woche 8	<i>c</i>	<i>d</i>

Im Falle von stetigen Variablen mit Normalverteilung wurde zur Analyse von Assoziationen zu bestimmten Merkmalsausprägungen der **t-Test** durchgeführt, der die Mittelwerte zweier Stichproben vergleicht. Bei diesem Testverfahren wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ angenommen, dass zwischen den zwei verglichenen Messreihen kein Unterschied vorliegt.

Wegen der Messtechnik der Parasitendichte und der extremen Schiefe der Verteilung der Messwerte, war es sinnvoll, das geometrische Mittel der Parasitendichte (GMPD), statt des arithmetischen Mittels darzustellen. Dazu wurde zunächst der Mittelwert des natürlichen Logarithmus berechnet und anschließend das Ergebnis zurück in seine initiale Einheit als Antilogarithmus transformiert. Negative Werte (keine Infektion) wurden von den Berechnungen ausgeschlossen.

2.4.2. Varianzanalyse (ANOVA)

Die Varianzanalyse (ANOVA, engl.: analysis of variance) untersucht den Einfluss von einer oder mehreren unabhängigen Variablen auf eine abhängige Variable (univariate Analyse) oder mehrere abhängige Variablen (multivariate Analyse). Der einfaktorielle ANOVA-Test wurde angewandt, um einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten von mehr als zwei unabhängigen Stichproben festzustellen. Voraussetzung für den Vergleich der Mittelwerte ist eine Normalverteilung der Werte. Sobald der Test auf Homogenität signifikant ausfiel, das heißt, wenn keine Gleichheit der Varianzen vorlag, wurde der **Welch-Test** verwendet.

Die Verwendung des **Allgemeinen linearen Modells** dient der Beurteilung des Einflusses mehrerer Faktoren auf eine Variable. Die Grundlage dieses Modells besteht in einer Korrelations- und Regressionsrechnung.

Die Berechnung der Fläche unter der Kurve (engl.: *area under the curve*) diente der vergleichenden Darstellung der Häufigkeiten der Erkrankung zwischen den verschiedenen Gruppen. Der Vorteil dieser Darstellung bestand darin, dass auf Grund der Ungewissheit eines bestimmten Beginns oder Endes der Erkrankung ein mittlerer Verlauf erschaffen werden konnte.

2.4.3. Kumulative Inzidenz, relatives Risiko und Konfidenzintervall

Die kumulative Inzidenz gibt den Anteil der Personen einer Population an, der in einem bestimmten Zeitraum an einer bestimmten Krankheit erkrankt. Es wurde das relative Risiko (RR) berechnet, welches angibt, in welcher Relation das Risiko einer Gruppe zu dem der Bezugsgruppe steht. Ein relatives Risiko von eins besagt, dass kein Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht. Ist das relative Risiko kleiner als eins, so bedeutet dies, dass ein protektiver Einfluss im Vergleich zur Bezugsgruppe und somit ein geringeres Risiko für eine Erkrankung vorliegt. Ist das relative Risiko demgegenüber größer als eins, liegt ein erhöhtes Risiko im Vergleich zur Bezugsgruppe vor. Das 95 % Konfidenzintervall (KI) beschreibt den Bereich von Werten, in dem mit 95 %-iger Wahrscheinlichkeit das wirkliche Ergebnis für die gesamte Patientenpopulation liegt. Das Konfidenzintervall verkleinert sich in dem Maße, wie die Anzahl der Patienten, auf die es sich bezieht, ansteigt. Beinhaltet das errechnete Konfidenzintervall nicht die eins, so liegt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

2.4.4. Kaplan-Meier-Methode

Die Kaplan-Meier-Kurven wurden erstellt, um eine vergleichende Aussage über den Zeitpunkt des ersten Auftretens einer Erkrankung zwischen verschiedenen Gruppen zu machen. Bei dieser Methode wird folgendermaßen vorgegangen: Für alle nicht-zensierten Beobachtungen werden

die Zeitpunkte ermittelt, an denen das kritische Endereignis eingetreten ist. Diese werden in aufsteigender Reihenfolge sortiert ($t_1 < t_2 < \dots < t_k$). Für die zensierten Beobachtungen müssen ebenfalls Zeitpunkte bekannt sein, an denen sie aus der Studie ausgeschieden sind. Diese werden mit einem kleinen, hochgestellten + versehen (t_1^+). Die Studie startet mit n Patienten. Zum Zeitpunkt t_1 können dann $n_1 = n - c_1$ Patienten beobachtet werden ($c_1 =$ Zahl zensierter Beobachtungen vor Zeitpunkt t_1). Die Anzahl der Patienten, die zum Zeitpunkt t_2 beobachtet werden können, berechnet sich nach: $n_2 = n_1 - c_2 - d_1$ ($d_1 =$ Anzahl der Patienten, deren kritisches Endereignis zum Zeitpunkt t_1 eintritt; $c_2 =$ Zahl der zensierten Beobachtungen zwischen t_1 und t_2). Analog berechnen sich dann die n_i für die nachfolgenden Zeitpunkte. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten $S(t_i) = P(t \geq t_i)$ werden für jedes nicht-zensierte t_i ($i = 1, \dots, k$) geschätzt nach: $\hat{S}(t_i) = n_1 - d_1 / n_1 \cdot n_2 - d_2 / n_2 \cdot \dots \cdot n_i - d_i / n_i$. Wenn bei einigen Patienten das Endereignis zum letzten Zeitpunkt t_k noch nicht eingetreten ist (z.B. weil die Studie vorher abgeschlossen wird), kann die Überlebensfunktion nur bis zum Zeitpunkt der letzten zensierten Beobachtung geschätzt werden. Die graphische Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit der Zeitpunkte t ergibt eine Treppenfunktion.

Mit Hilfe des **Logrank-Tests** wurde die Verschiedenheit des **gesamten** Kurvenverlaufes auf seine univariate Signifikanz überprüft. Mit Hilfe der **Cox-Regression** wurde der Kurvenverlauf nach Adjustierung für in der univariaten Analyse signifikante Einflussfaktoren auf seine Signifikanz überprüft. Mit seiner Hilfe können alle potentiellen Einflussgrößen in ihrem Zusammenspiel beurteilt werden.

2.4.5. McNemar-Test

Wenn eine Stichprobe zweimal auf ein alternatives Merkmal hin untersucht wird, verwendet man den McNemar-Test. Formell liegen zwei verbundene Stichproben mit einem Alternativmerkmal vor, bei denen die Häufigkeiten der Ausprägung A und \bar{A} verglichen werden (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Beispiel für einen McNemar-Test:

		PCR positiv (A)	PCR negativ (\bar{A})
Mikroskopie	positiv (A)	a	b
	negativ (\bar{A})	c	d

Die Nullhypothese besagt, dass die Stichproben bezüglich der Häufigkeitsverteilung übereinstimmen. Die Anzahl der Beobachtungseinheiten, die in beiden Stichproben dieselbe

Ausprägung A bzw. \bar{A} aufweisen, ist a bzw. d . Die Häufigkeiten b und c quantifizieren die Anzahl mit unterschiedlichen Ausprägungen. Bei Gültigkeit der Nullhypothese würde man erwarten, dass die Häufigkeiten b und c gleich sind. Je mehr sie vom Durchschnittswert $(b+c)/2$ abweichen, umso mehr spricht für die Alternativhypothese.

2.4.6. Pearson Korrelation

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde gemäß folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{(n - 1) \cdot s_x \cdot s_y}$$

Dabei sind x_i und y_i die Werte der beiden Variablen, \bar{x} und \bar{y} deren Mittelwerte und s_x und s_y deren Standardabweichungen, n ist die Anzahl der Wertpaare. In dieser Studie wurde die Pearson Korrelation verwendet, um Aussagen über den Einfluss und die Richtung einer Infektion mit *P. falciparum* und der unterschiedlichen Parasitendichten auf die Höhe des mittleren Hb zu machen.

Der Pearson Koeffizient r gibt je nach Vorzeichen die Richtung seines Einflusses an und p gibt Auskunft über die Signifikanz dieses Einflusses.

2.4.7. Generalized estimating equation (GEE)

Die allgemeine, schätzende Gleichung (engl.: generalized estimating equation: GEE) stellt ein Regressionsmodell für Längsschnitt- oder gruppierte Daten dar. Sie wurde 1986 von Liang und Zeger als eine Methode der Schätzung von Regressionsmodell-Parametern zur Beschreibung korrelierter, also abhängiger, Beobachtungen eingeführt. Sie wird vor allem bei Modellen mit unstenen Resultaten verwendet. Die Berechnungen zur GEE wurden mit Hilfe des Programms Stata durchgeführt.

In unserer Studie benutzten wir die GEE zur Berechnung einer Assoziation unsteter Variablen, wie Fieber oder klinische Symptome mit der *P. falciparum*-Infektion in der Längsschnittanalyse.

Die komplexe statistische Beratung und Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dietz, Institut für Internationale Gesundheitswissenschaften, Berlin, durchgeführt.