

### 3. Probanden, Patienten, Material und Methoden

Die Probanden und Patienten der einzelnen Studiengruppen sowie die verwendeten Materialien und Methoden sind in den zusammengefassten Arbeiten dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und zum Verständnis einzelner, v. a. methodologischer Sachverhalte werden die Studien im Folgenden skizziert bzw. einige Details hervorgehoben.

#### 3.1. Probanden, Patienten und Studiengruppen

##### 3.1.1. Kinder aus Nigeria [1997]

In einer Querschnittserhebung zur Epidemiologie der *Plasmodium*-Infektion, zu erythrozytären Polymorphismen sowie zu residuellen Medikamentenspiegeln und parasitären Resistenzmarkern im Südwesten Nigerias wurden von Oktober 1996 bis September 1997 insgesamt 695 Probanden rekrutiert. Studienorte waren die Stadt Ibadan mit ca. 4 Millionen Einwohnern und das Dorf Abanla, rund 20 km südlich gelegen. Beide Orte befinden sich im ehemaligen Regenwald-Gürtel Süd-Nigerias. Diese Region ist ein holoendemisches Malariagebiet; Plasmodien werden ganzjährig übertragen. Nach Ausschluss einiger Kinder aufgrund unzureichender Datenlage oder fehlender Parameter verblieben 593 Probanden in vier Untergruppen (May *et al.*, 1999):

- 230 *per definitionem* asymptomatische Schulkinder sowie Kinder aus Impfprogrammen und Kindergärten (1-11 Jahre) aus dem Ort Abanla
- 59 *per definitonem* asymptomatische Schulkinder sowie Kinder aus Impfprogrammen und Kindergärten (3-8 Jahre) aus der Stadt Ibadan
- 144 Kinder (10 Monate – 11 Jahre), die sich in Gesundheitsposten in Ibadan mit einer fieberhaften Erkrankung bzw. einer Fieber-Anamnese vorstellten
- 160 Erwachsene (15-56 Jahre), die zum Personal des *University College Hospital* gehörten, dienten als Referenzgruppe für genetische Dispositionen

Ca. 95% der Probanden gehörten zur ethnischen Gruppe der Yoruba. Patienten mit klinischen Zeichen schwerer Malaria wurden nicht rekrutiert.

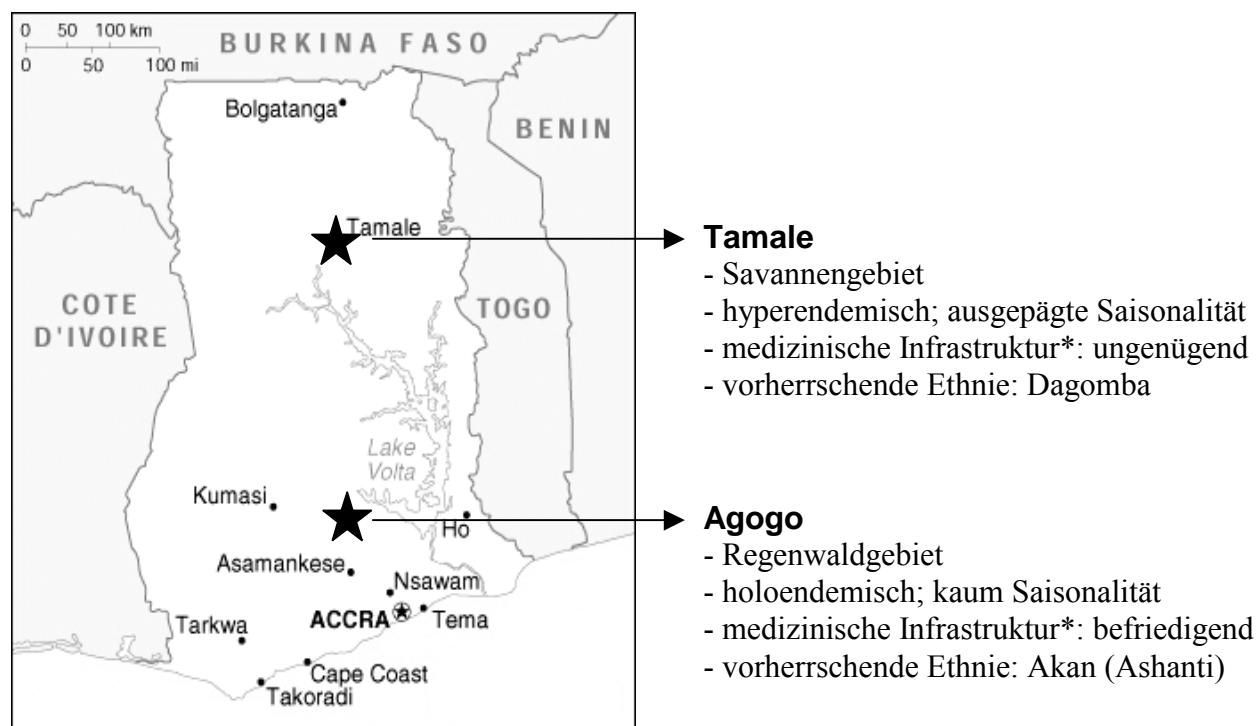
Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem *Genetic Research Team* (Prof. A.G. Falusi), *Postgraduate Institute for Medical Research and Training* des *University College Hospital Ibadan* durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde vom *Joint Ethical Committee University of Ibadan, University College Hospital* geprüft und genehmigt.

### 3.1.2. Schwangere aus Agogo, Ghana [1998]

In der Feldstation des Instituts für Tropenmedizin Berlin am *Presbyterian Mission Hospital* in Agogo, Süd-Ghana (Abb. 1) fand 1998 eine erste, deskriptive Querschnittsstudie zur Malaria in der Schwangerschaft statt. Ziel der Untersuchungen war primär die Beschreibung der Epidemiologie der Malaria in der Schwangerschaft in diesem Gebiet unter besonderer Berücksichtigung submikroskopischer *P. falciparum*-Infektionen. Weitergehende Untersuchungen betrafen die Bedeutung von Hämoglobinopathien, G6PD-Mangel, antiparasitären Medikamentenspiegeln, parasitärer Multiplizität und Resistenz für die Prävalenz der *Plasmodium*-Infektion und ihrer Auswirkungen.

Agogo befindet sich im holoendemischen, ehemaligen Regenwaldgebiet Süd-Ghanas und ist eine dörfliche Siedlung von ca. 30.000 Einwohnern. Das *Presbyterian Mission Hospital* verfügt über 250 Betten und ist mit jährlich ca. 5000 stationären Aufnahmen und 56.000 ambulanten Konsultationen das wichtigste Zentrum medizinischer Versorgung für die rund 130.000 Einwohner der Region. Die Malaria ist die häufigste Ursache stationärer Behandlung. Die Schwangerenvorsorge-Ambulanz registriert ungefähr 5.000 Konsultationen jährlich. Zu den routinemässigen diagnostischen Untersuchungen dort zählen die Bestimmungen von Gestationsalter, Blutdruck, Albuminurie und Hb. Pyrimethamin wird zur Chemoprophylaxe der Malaria verordnet; darüber hinaus werden Eisen- und Folat-Präparate verschrieben. Bis zu vier Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen sind kostenfrei, nicht aber weiterführende Labortests oder Medikamente. Im Jahre 1998 fanden ca. 1.000 Geburten am *Presbyterian Mission Hospital* statt, davon 24% per Kaiserschnitt. Die Müttersterblichkeit betrug 4,4%.

**Abbildung 1. Lage und Kennzeichen der Studienorte Agogo und Tamale in Ghana**



\*, im Vergleich zur medizinischen Infrastruktur in Ghana

Im November und Dezember 1998, am Ende der zweiten Regenzeit, wurden 530 Schwangere aller Paritäten und Gestationsalter in der Schwangerenvorsorge-Ambulanz des *Presbyterian Mission Hospital* rekrutiert. Die Teilnahme an der Studie erfolgte nach ausführlicher Information und schriftlicher Einverständniserklärung. Alle sich vorstellenden Frauen wurden rekrutiert, keine verweigerte die Teilnahme an der Studie. Die Schwangeren gehörten der ethnischen Gruppe der Akan an. Frauen mit einer fieberhaften Parasitämie, einer Anämie (Hb <7 g/dL) oder sonstigen Auffälligkeiten wurden ärztlicher Behandlung zugeführt. Der Aufbau der Feldstation und die Untersuchungen fanden in Kooperation mit dem *Presbyterian Mission Hospital* (Dr. T. W. Thompson) statt. Das Studienprotokoll wurde von der Nationalen Ethikkommission des ghanaischen Gesundheitsministeriums geprüft und genehmigt.

### 3.1.3. Gebärende aus Agogo, Ghana [2000]

Im Anschluss und in Erweiterung der Untersuchungen von 1998 wurde eine zweite Studie zur Malaria in der Schwangerschaft in Agogo durchgeführt. Dabei wurden zwischen Januar 2000 und Januar 2001 893 gebärende Frauen mit ihren neugeborenen Kindern rekrutiert. Frauen, die unter der Geburt starben, wurden nicht erfasst. Die Ziele der Studie deckten sich weitge-

hend mit denen der Untersuchungen von 1998. Die Gewinnung plazentar Blutproben nach der Geburt (s. u.) ermöglichte darüber hinaus die Evaluierung diagnostischer Methoden und die Prüfung, inwiefern im peripheren Blut diagnostizierte *P. falciparum*-Infektionen mit plazentar sequestrierten Erregern korrelieren. Als klinische Parameter wurden neben mütterlicher Anämie auch Geburtsgewicht und Gestationsalter der Neugeborenen erfasst. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist ein grosser Teil der Befunde noch im Prozess der Auswertung. Dies gilt auch für eine aus dieser Studiengruppe ausgesuchten Geburtskohorte von 160 Kindern, die bis zum Erreichen des ersten Geburtstags wöchentlich nachverfolgt wurden.

Die Untersuchungen in Agogo im Jahre 2000 wurden in Zusammenarbeit mit dem *Presbyterian Mission Hospital* (Dr. C. von Gärtner) und dem *Komfo Anoyke Teaching Hospital, University of Science and Technology, Kumasi* (Dr. G. Bedu-Addo) durchgeführt. Von allen Frauen wurde nach Information in den lokalen Dialekten das schriftliche Einverständnis zur Teilnahme an der Studie eingeholt. Das Studienprotokoll wurde nach Prüfung durch das *Committee on Human Research Publication and Ethics, School of Medical Sciences, University of Science and Technology, Kumasi* genehmigt.

#### **3.1.4. Kinder aus Tamale, Ghana [2000]**

Tamale ist die Provinzhauptstadt der *Northern Region* Ghanas mit einer Bevölkerung von ca. 300.000 Einwohnern, die zum grössten Teil der ethnischen Gruppe der Dagomba angehören. Trotz ihrer Grösse ist die Stadt ländlich geprägt; verstreute Rundhüttensiedlungen herrschen vor. Die Bewohner betreiben überwiegend Subsistenzlandwirtschaft und Kleinhandel. Klima und Vegetation sind durch die Westafrikanische Savanne geprägt. Die jährliche Niederschlagsmenge beträgt 1053 mm mit einem Minimum im Januar (2 mm) und einem Maximum im Juli (128 mm). Die Endemizität der Malaria ist meso- bis hyperendemisch. Die Prävalenz von Parasitämie bei Kindern zeigt entsprechend der Regenzeit von Mai bis September einen Gipfel im Juli (>60%) und ist am Ende der Trockenzeit am geringsten (ca. 20%; Mockenhaupt *et al.*, unveröffentlicht).

Die Feldstation des Instituts für Tropenmedizin Berlin wurde 2000 am *Bulpeila Health Centre* aufgebaut. Dabei handelt es sich um eine Einrichtung der primären Gesundheitsversorgung (*primary health post*) in einem Aussenbezirk von Tamale. Der Gesundheitsposten ist, neben einigen nur zeitweise besetzten Aussenposten, privaten Praxen und traditionellen Heilern, für die medizinische Versorgung der ca. 50.000 Bewohner dieses ländlich geprägten Bezirks zuständig. Das reguläre Personal besteht aus einer *medical assistant* sowie zwei

Schwestern. Mehrere Hebammen leiten zudem Geburten und führen Impf- und Gesundheits-erziehungsprogramme durch. Die Zahl jährlicher Konsultationen im kurativen Bereich betrug 1999 ungefähr 8000. Häufigste Diagnose zu dieser Zeit und in Abwesenheit eines Labors waren Malaria und Anämie bei Kindern im Alter unter fünf Jahren. Mit Einrichtung der Feldstation sind am *Bulpeila Health Centre* nun zusätzlich zwei Ärzte, zwei Schwestern, drei Laborassistenten sowie zehn Gemeindearbeiter tätig. Ein Feldlabor ermöglicht einfache parasitologische und hämatologische Untersuchungen.

Für eine erste Studie zur Malaria in Tamale wurden zwischen September und Dezember 2000 840 fieberhafte Kinder im Alter von 6 Monaten bis 5 Jahren rekrutiert. Ziel der Untersuchungen war neben der Erfassung der Prävalenzen von Wirtsfaktoren, Chloroquinresistenzmarkern und der Multiplizität und Diversität von *P. falciparum* die Analyse möglicher Interaktionen zwischen diesen Faktoren. 356 dieser Kinder wurden zudem in eine Studie zur Therapie der unkomplizierten Malaria mit Chloroquin eingeschlossen. Die Befunde einer sich anschließenden Längsschnittstudie von 15 Monaten Dauer werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt ausgewertet.

Die Untersuchungen in Tamale wurden in Kooperation mit der *School of Medicine and Health Sciences, University for Development Studies*, Tamale (Dr. R.N. Otchwemah) und der *Regional Health Administration, Northern Region* (Dr. S.D. Anemana) durchgeführt. Die jeweiligen Studienprotokolle wurden vom Ethikkomitee der *Regional Health Administration* und vom Nationalen Ethikkomitee des ghanaischen Gesundheitsministeriums geprüft und genehmigt.

### **3.1.5. Kinder aus Northern Region, Ghana [2002]**

Eine repräsentative Erhebung zur Epidemiologie von Malaria, Anämie und Chloroquinresistenz in der Region von Tamale und den umliegenden Distrikten wurde 2002 durchgeführt. Das Studiengebiet umfasste die Distrikte (Einwohnerzahlen) von Tamale (300.000), Savelugu-Nanton (91.000), Tolon-Kumbungu (135.000), Yendi (133.000), East Gonja (176.000) und West Gonja (141.000). Auf der Basis von Einwohnerzahlen des regionalen *guinea worm eradication program* (1999) und des nationalen Zensus (2002) wurde das Studiengebiet in zwei Strata urbaner (Tamale) und ländlicher Eigenschaft aufgeteilt. Einem zweistufigen *cluster-sampling* folgend und für die Einwohnerdichte adjustiert wurden 30 Ortschaften im Studiengebiet zufällig ausgewählt. Zwei Ortschaften (Yendi Distrikt) mussten wegen bewaffneter ethnischer Konflikte nachträglich durch zufällig ausgewählte Orte ersetzt werden. In jeder

Siedlungseinheit (*cluster*) wurden, durch Flaschendreihen randomisiert, Häuser/Hütten ausgewählt und 70 Kinder im Alter von 6 Monaten bis 9 Jahren rekrutiert, wenn die Eltern ihr informiertes Einverständnis gaben. Diese Kinder wurden klinisch untersucht, und Blutproben wurden zum mikroskopischen Nachweis von Malariaerregern und zur Bestimmung des Hb-Wertes entnommen. Bei fieberhafter Parasitämie oder bei einer asymptomatischen Parasitämie von mehr als 5.000/ $\mu$ L wurden die Kinder mit Sulfadoxin-Pyrimethamin behandelt. Im Falle einer schweren Malaria, einer schweren Anämie (Hb < 5 g/dL) oder einer anderen schweren Erkrankung erfolgte die Einweisung in die nächstgelegene medizinische Einrichtung.

Diese Untersuchungen wurden in identischer Weise während der Trockenzeit (Februar-April) und der Regenzeit (August-Oktober) bei jeweils 2100 Kindern durchgeführt. Ca. 80% der während der Trockenzeit rekrutierten und mit einem Studienpass versehenen Kinder wurden in der Regenzeit angetroffen. Die restlichen Kinder wurden pro Siedlungseinheit wiederum zufällig ausgewählt. Die Kinder und Befunde der Regenzeiterhebung dienten als primäre Kontrollgruppe in einer Fall-Kontrollstudie zur schweren Malaria (2.1.6.).

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit der *School of Medicine and Health Sciences, University for Development Studies*, Tamale (Dr. R.N. Otchwemah) und der *Regional Health Administration, Northern Region* (Dr. S.D. Anemana) durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde vom Ethikkomitee der *Regional Health Administration* und vom Nationalen Ethikkomitee des ghanaischen Gesundheitsministeriums geprüft und genehmigt.

### **3.1.6 Kinder mit schwerer und komplizierter Malaria, Tamale, Ghana [2002]**

Eine Studie zur klinischen Manifestation und zur Bedeutung humangenetischer Polymorphismen bei der schweren Malaria wurde zwischen August und November 2002 am *Tamale Teaching Hospital* durchgeführt. Dieses Krankenhaus dient als medizinisches Referenzzentrum für die gesamte *Northern Region*. Die pädiatrische Abteilung verfügt über eine Station von 55 Betten; dem stehen in der Regenzeit bis zu 80 stationäre Aufnahmen täglich gegenüber. Intensivmedizinische Infrastruktur (z. B. Beatmung, Dialyse) besteht nicht.

Die Rekrutierung von Kindern im Alter von 6 Monaten bis 9 Jahren erfolgte stufenweise. Schwestern und Ärzte im Ambulanzbereich der Klinik überwiesen Patienten zur pädiatrischen Station, wenn der Verdacht auf schwere Malaria, eine Anamnese wiederholter Krampfanfälle, eine axilläre Temperatur >40°C oder Trink- oder Sitzschwäche vorlag. Im stationären Bereich fand die klinische Untersuchung durch die Pädiaterin (Dr. S. Gellert) und

insbesondere der Vermerk von definierenden Symptomen der schweren und komplizierten Malaria (Tab. 1) und dem Ausschluss anderer, diesen Symptomen zugrunde liegenden Erkrankungen statt. Nach Blutabnahme, Schnellfärbung und Mikroskopie Dicker Tropfen (s. u.) sowie Bestimmung des Hb-Wertes wurde eine schwere Malaria klassifiziert, wenn in Anwesenheit von asexuellen Formen von *P. falciparum* eines der definierenden klinischen Symptome oder eine schwere Anämie ( $\text{Hb} < 5 \text{ g/dL}$ ) vorlag. Parallel wurden Blutglukose und –laktat gemessen. Nach ausführlicher Information der Mutter und ihrer schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte die Rekrutierung in die Studie. Ausschlusskriterium war eine Transfusion innerhalb der vorangegangenen drei Monate. 290 Kinder wurden eingeschlossen. Der Beginn einer Therapie insbesondere bei schwerstkranken Kindern war unabhängig von diesem Vorgehen.

Zur Behandlung der schweren Malaria wurde Artesunat (Plasmotrim, Mepha Pharma, Schweiz) in einer Dosis von 5 mg/kg KG über fünf Tage verwendet (doppelte Dosis am ersten Tag). Die Verabreichung erfolgte abhängig vom Zustand des Kindes *per os*, als Suppositorium, oder *via* nasogastrale Sonde. Weitere spezifische Massnahmen beinhalteten Transfusion, i.v.-Rehydrierung, die Gabe von Glukose, Diazepam oder Phenobarbital nach Bedarf und klinischer Entscheidung. Zwei (-3) Tage nach Aufnahme wurde eine standardisierte Nachuntersuchung durchgeführt, Blut entnommen, und Parasitämie sowie gegebenenfalls Glukose und Laktat kontrolliert. Dabei wurden insbesondere neurologische Auffälligkeiten erfasst. Behandlung und diagnostische Verfahren, nicht aber die Krankenhausgebühren waren für Studienteilnehmer kostenfrei. Dies zusammen mit dem sehr hohen täglichen Patientenaufkommen führte dazu, dass ein Grossteil der klinisch gebesserten Kinder nach nur zwei oder drei Tagen stationären Aufenthalts die Klinik verliessen.

Die Studie zur schweren Malaria wurde in Zusammenarbeit mit der *School of Medicine and Health Sciences, University for Development Studies* durchgeführt. Prüfung und Freigabe erfolgte durch die Ethikkomitees der *Regional Health Administration, Northern Region* und der *University for Development Studies*.

## 3.2. Materialien

### 3.2.1. Proben

*Venöse Blutproben* wurden aus der *V. cubitalis* oder bei sehr jungen Kindern aus dem *Rete venosum dorsalis manus* gewonnen. Als Antikoagulanzen diente EDTA.

*Plazentare Blutproben* wurden sofort nach Expulsion der Plazenta oder nach maximal sechs Stunden Lagerung bei +4°C gewonnen. Um dabei eine Vermischung von plazentarem und Nabelschnurblut zu minimieren, wurde dieser Schritt vor der Ermittlung des Plazentanettopes, d.h. vor dem Abtrennen von Nabelschnur und Amnionhülle, durchgeführt. Nach Entfernen oberflächlicher Blutkoagel wurde parazentral eine ca. 2 cm tiefe und ca. 4 cm lange Inzision gesetzt, Blut in den Schnitt ausgestrichen, mit einer Injektionsspritze aufgezo-gen und in ein EDTA-haltiges Röhrchen überführt. Um DNA-Kontaminationen zu verhin-dern, wurden alle verwendeten Instrumente und Behältnisse nach jeder Plazentablutgewin-nung mit zweimolarer NaOH-Lösung dekontaminiert.

*Plasma- und Serumproben* wurden durch Zentrifugation (10 min, 8000 UpM) abgetrennt.

### 3.2.2. Asservierung, Aufbereitung und Transport von Proben

Der Lagerung von Plasma- und Serumproben erfolgte bei –20°C, der Transport nach Berlin auf Trockeneis. Blutproben wurden für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen unterschiedlich gelagert bzw. stabilisiert:

- Nigeria [1997]: Versetzung von Vollblut mit gleichem Volumen 8-molarer Harnstofflösung.
- Agogo, Ghana [1998]: Lagerung und Transport von Vollblut bei +4°C.
- Agogo und Tamale, Ghana [2000]: Nach Zentrifugation und Entnahme von Plasma erfolgte Resuspendierung des Sediments mit einem Teil PBS und zwei Teilen eines Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Puffers (AS1, Qiagen).
- Tamale, Ghana [2002]: Versetzung von Vollblut mit gleichem Volumen eines Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Puffers (AS1, Qiagen).

Der Transport von stabilisierten und Vollblutproben nach Berlin fand bei +4°C statt. DNA aus kernhaltigen Leukozyten oder erythrozytären Parasiten wurde dort mittels kommerzieller Verfahren (Qiamp Blood Kit, Qiagen) extrahiert.



### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Nachweis von *Plasmodium*

**Mikroskopie.** Plasmodien wurden in der nigerianischen Studie mittels der Mikroskopie von 100 Gesichtsfeldern (1000x Vergrößerung) nach Giemsa gefärbter Dicker Tropfen ausgezählt. Bei den Studien in Ghana kam ein zweischrittiges Verfahren zur Anwendung. Von jeder Blutprobe wurden zwei Dicke Tropfen angefertigt. Das erste Präparat wurde mittels eines Haartrockners getrocknet, schnellgefärbt (5-10 min., 10% Giemsa, pH 7,2), abgespült und wiederum mit dem Haartrockner getrocknet. Das mikroskopische Ergebnis lag bei diesem Verfahren innerhalb von ca. 20 min. vor und war gegebenenfalls von therapeutischer Bedeutung. Für Studienzwecke mit höheren Ansprüche an Morphologie und Sensitivität wurden die Präparate luftgetrocknet und regulär gefärbt (30 min., 4% Giemsa, pH 7,2). Die Auszählung erfolgte pro 200 bis 500 Leukozyten; über gemessene oder gesetzte Leukozytenzahlen ergab sich die Parasitendichte/ $\mu\text{L}$ .

Die Bestimmung der Parasitämien in plazentaren Blutproben erfolgte durch die Zählung asexueller Parasiten pro 100 mikroskopische Gesichtsfelder. Die Anwesenheit von Malaria-pigment in Leukozyten wurde dokumentiert. Die Infektionsstadien wurden nach Bulmer *et al.* (1993) und der Modifizierung nach Fried *et al.* (1998) eingeteilt in:

- *keine Infektion:* keine Parasiten und kein Pigment nachweisbar
- *abgelaufene Infektion:* keine Parasiten aber Pigment nachweisbar
- *akut-chronische Infektion:* Parasiten und Pigment nachweisbar
- *akute Infektion:* Parasiten aber kein Pigment nachweisbar

**PCR.** In allen Studien kam ein geschachteltes PCR-Verfahren zum Nachweis von *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae* nach Snounou *et al.* (1993a) zum Einsatz. Bei diesem wie bei allen auf der Amplifizierung von DNA basierenden Verfahren wurden modifizierte Protokolle der Erstbeschreibung durch Saiki *et al.* (1985) und der jeweiligen Applikationen verwendet. Oligonukleotide wurden von einem kommerziellen Anbieter (MWG Biotech) bezogen. Amplifikate der PCR oder Fragmente aus nachgeschalteten enzymatischen Restriktionen (RFLP, *restriction length polymorphism*) wurden in der Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und dargestellt. Zur Diskriminierung kleinster Fragmente wurden hochauflösende Agarose- (GTG, Biozym) oder Polyacrylamid-Gele verwendet.

### 3.3.2. Genotypisierung von *Plasmodium falciparum*

#### **msp1 und msp2**

*P. falciparum* ist im menschlichen Wirt haploid. Die in Sequenz und Länge variablen Regionen der parasitären Gene *msp1* und *msp2* werden von konservierten Regionen umfasst, die verschiedenen Allelen zugeordnet werden können (*msp1*: Ro33, Mad20, K1; *msp2*: FC27, IC). Die Anwesenheit von mehr als zwei *msp1* oder *msp2* Allelen zeigt eine polyklonale Infektion an. Der Längenpolymorphismus der einzelnen Allele verfeinert zudem die Unterscheidung. Die Multiplizität wurde als die höhere der beiden Summen der Einzelfragmente für *msp1* oder *msp2* berechnet; dabei wurden nur Proben mit positivem Amplifikationsergebnis berücksichtigt. Das bis 1999 verwendete Protokoll (Robert *et al.*, 1996) wurde anschließend durch eine modifizierte Variante nach Snounou *et al.* (1999) ersetzt. Die visuelle Auswertung wurde zudem durch ein Computer-gestütztes System ergänzt (BioDocAnalyse, Biometra).

#### **Parasitäre Medikamentenresistenzmarker**

Mit Chloroquin-Resistenz assoziierte Allele von *pfmdr1* (Flüeck *et al.*, 2000) und *pfcr1* (URL: <http://www.medschool.umaryland.edu/CVD/nejm2001djimde.htm>) wurden ebenso mittels PCR-RFLP typisiert wie mit Pyrimethamin-Resistenz vergesellschaftete Polymorphismen des DHFR-Gens von *P. falciparum* (Duraisingh *et al.*, 1998).

### 3.3.3. Typisierung polymorpher Wirts-Gene

#### **Hämoglobinvarianten**

Nigerianische Proben wurden durch Hb-Elektrophorese auf Zellulose-Azetat-Membranen typisiert, ghanaische mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*; Nationales Hämoglobinreferenzlabor der Universität Ulm (Prof. E. Kohne)). Die Hb-Typen der Kinder des repräsentativen Querschnitts in Nord-Ghana und der Kinder mit schwerer Malaria (2002) wurden mittels PCR-RFLP bestimmt (Modiano *et al.*, 2001).

#### **$\alpha^+$ -Thalassämie**

Mit den verwendeten PCR-Verfahren kann der normale  $\alpha$ -Globin-Genotyp ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) von einer heterozygoten ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) und homozygoten ( $-\alpha/-\alpha$ )  $-\alpha^{3.7}$ -Thalassämie abgegrenzt werden. Andere Formen der  $\alpha$ -Thalassämie treten in West-Afrika nicht oder nur sporadisch auf (Flint *et al.*, 1998). Für Proben der Studien in Nigeria [1997] und in Ghana [1998] wurde eine modi-

fizierte Variante des Protokolls nach Smetanina & Huisman (1996) verwendet, bei späteren Studien dagegen ein  $-\alpha^{3.7}$  Multiplex-PCR-Verfahren (Liu *et al.*, 2000). Als Positivkontrollen dienten DNA-Proben, deren  $\alpha$ -Globin-Genotyp durch Southern-blotting bestätigt wurde (Dr. E. Baysal, Dubai).

### **G6PD-Mangel**

Die Allele Gd<sup>A-</sup>, Gd<sup>A</sup> und Gd<sup>B</sup> wurden bei nigerianischen Proben mittels Hybridisierung mit Sequenz-spezifischen, markierten Oligonukleotiden erfasst (May *et al.*, 2000a). Bei ghanaischen Proben kam ein Verfahren des PCR-RFLP zum Einsatz (Kotea *et al.*, 1996).

### **Zytokinpromoterpolymorphismen**

Das TNF<sub>-308A</sub>-Allel wurde durch PCR-RFLP (Allen *et al.*, 2001) erfasst, das IL-10<sub>-1082</sub> Allel mittels eines Allel-spezifischen PCR-Verfahrens (Karhukorpi & Karttunen, 2001).

### **NOS2-Promoterpolymorphismen**

Der NOS2<sup>-954 G→C</sup> Polymorphismus wurde mittels PCR-RFLP typisiert (Kun *et al.*, 1998b; Kun *et al.*, 2001), das NOS2<sup>-1173 C→T</sup> Allel durch ein Verfahren Allel-spezifischer PCR (Hobbs *et al.*, 2002). Die Zahl der Kopien des Pentanukleotid-*Repeats* (CCTTT)<sub>n</sub> ca. 2,5 kb vor dem Transkriptionsstartcodon stellte sich als Längenpolymorphismus PCR-generierter Fragmente dar, die auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt wurden (Xu *et al.*, 1996).

### **3.3.4. Nachweis von Chloroquin und Pyrimethamin**

Bei nigerianischen Proben wurden sowohl Chloroquin als auch sein Metabolit Desethylchloroquin in Vollblut mittels HPLC gemessen (Dr. Y. Bergqvist, Dalarna University College, Borlänge, Schweden). Die Nachweisgrenze für beide Substanzen betrug 17 nmol/L. Chloroquin und Pyrimethamin im Urin schwangerer Frauen in Agogo, Ghana [1998], wurden qualitativ mittels immunochromatographischer Teststreifen nachgewiesen (Dr. T.A. Eggelte, Division of Infectious Diseases, Tropical Medicine and AIDS, Academic Medical Centre, Amsterdam, Niederlande). Die Nachweisgrenzen betragen 120 nmol/L für Chloroquin und 250 nmol/L für Pyrimethamin. Quantitative Messung dieser Medikamente in Plasma oder Blut wurden mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) vorgenommen (Dr. T.A. Eggelte). Die dabei verwendeten monoklonalen Antikörper zeigen Kreuzreaktivität zwischen Chloroquin einerseits und Desethylchloroquin und Amodiaquin andererseits. Neben Pyri-

methamin wird auch Cycloguanil, der aktive Metabolit des Proguanil erfasst. Die Nachweisgrenzen des ELISA für Blut- und Plasmaproben liegen für Chloroquin und Pyrimethamin bei 3 nmol/L (Eggelte, 1990).

### 3.3.5. Sonstige Methoden

**Hämatogische Parameter** wie Hb, Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Mittleres Corpuskuläres Volumen und Leukozytenzahl wurden mit einem halbautomatischen Zellzähler (HC555, Clinicon) bestimmt. Ab 2000 wurden die Hb-Konzentrationen mit einem HemoCue Hb-Photometer (HemoCue, Schweden) gemessen.

**Laktat und Glukose** im Blut wurden photometrisch bestimmt (variophotometer, diaglobal).

**Körpertemperatur** wurde stets axillär gemessen und Fieber als Temperatur  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  definiert.

**Splenomegalie** wurde als *Hackett-Score* von  $\geq 2$  definiert.

**Qualitätssicherung** insbesondere hinsichtlich der parasitologischen und klinischen Befunde wurde durch wiederholte Trainingseinheiten angestrebt. Für die Untersuchungen in Ghana mussten alle mit der Mikroskopie betrauten Personen vor ihrer Teilnahme mindestens 500 Präparate mit einer Fehlerquote von weniger als 5% durchmustern. Vor Implementierung der Studien in Ghana wurden alle beteiligten Mitarbeiter für die Dauer von zwei Wochen durch den Studienleiter hinsichtlich der Abläufe und der einzelnen Arbeitsschritte instruiert. Während Studiendurchführung wurden zehn Prozent der mikroskopischen Präparate kontinuierlich kontrolliert und gegebenenfalls erneutes Training durchgeführt. Ähnliche Kontrollen bestanden für Datenerhebung, klinische Untersuchungen und Heimbesuche durch Gemeindearbeiter. Während laufender Feldstudien fand mindestens zweimal wöchentlich ein Mitarbeitertreffen statt, um die Arbeitsabläufe zu optimieren und gegebenenfalls entsprechendes Training zu wiederholen.

**Daten** wurden primär schriftlich dokumentiert. Die Eingabe in Datenbanken erfolgte mittels der Programme Excel (Microsoft, Seattle, USA) oder EpiInfo 6.0 (Center for Disease Control, Atlanta, USA). Die Sichtung der Datenbanken hinsichtlich inhaltlicher Konsistenz erfolgte durch den Studienleiter.

**Statistische Berechnungen** wurden mit Hilfe der Programme StatView (SAS, Cary, USA) und EpiInfo 6.0 vorgenommen. Parasitendichten wurden in der Regel logarithmisch transformiert und als Geometrisches Mittel der Parasitendichte (GMPD) mit dazugehörigem 95%-Konfidenzintervall angegeben. Unterschiede stetiger Variablen zwischen Merkmalen nominalen Charakters wurden mittels Student's t-Test, Varianzanalyse (ANOVA: *analysis of vari-*

*ance*), Mann-Whitney U-Test oder Kruskal-Wallis-Test erfasst. Überzufällige Assoziationen zwischen nominalen Merkmalen wurden durch  $\chi^2$ - oder  $\chi^2$  für Trend-Tests ermittelt. Univariate Risiko- oder Faktorenanalyse geschah mittels  $\chi^2$ -Tests. Dabei als signifikant assoziiert erkannte Faktoren wurden in multivariaten logistischen Regressionsmodellen mit schrittweiser Rücknahme überprüft. Gematchte Fall-Kontroll-Studien wurden mit dem McNemar-Test gegebenenfalls mit Stratifizierung analysiert. Zwei- oder mehrseitige ANOVA-Modelle zeigten Interaktionen von nominalen Merkmalen bei ihren Effekten auf normalverteilte, stetige Parameter auf. Einflüsse stetiger und umcodierter nominaler Variablen auf abhängige stetige Parameter wurden in multiplen linearen Regressionsmodellen überprüft.