

5. Ergebnisse eigener Arbeiten

5.1. Epidemiologisch-klinische Grundlagen

5.1.1. Kinder aus Nigeria [1997]

- M3** May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U, Meyer CG. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. [Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 339-343.](#)
- M7** Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Ademowo OG, Olumese PE, Falusi AG, Grossterlinden L, Meyer CG, Bienzle U. Concentrations of chloroquine and malaria parasites in blood in Nigerian children. [Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 835-839.](#)
- M4** Mockenhaupt FP, May J, Stark K, Falusi AG, Meyer CG, Bienzle U. Serum transferrin receptor levels are increased in asymptomatic and mild *Plasmodium falciparum*-infection. [Haematologica 1999; 84: 869-873.](#)

Im Südwesten Nigerias zeigte sich, dass durch den Einsatz der PCR Infektionen mit *Plasmodium* dargestellt werden können, die der konventionellen Mikroskopie häufig entgehen. Zudem konnte durch die PCR eine hohe Prävalenz gemischter Infektionen nachgewiesen werden. Submikroskopische Infektionen gingen mit Antikörpertitern gegen *P. falciparum* einher, die eine Mittelstellung zwischen denen bei nicht-infizierten und parasitärischen Probanden einnahmen. Eine Splenomegalie war bei Probanden mit submikroskopischer Infektion selten, bei gemischten Infektionen jedoch deutlich gehäuft anzutreffen. Mit zunehmendem Alter wurde eine Abnahme der Parasitendichten beobachtet, wohingegen die Prävalenzen von *P. falciparum*, *P. malariae* und *P. ovale* anstiegen. Während dies für *P. falciparum* relativ konstant der Fall war, zeigte sich eine Zunahme von *P. malariae* und *P. ovale* erst ab dem fünften Lebensjahr.

Die höhere Prävalenz gemischter Infektionen im ländlichen Raum konnte u. a. durch den selteneren Nachweis von Chloroquin im Blut erklärt werden. Vorwiegend subprophylaktische Chloroquin-Spiegel wurden bei der Mehrheit der untersuchten Kinder beobachtet. Dabei fielen mit zunehmendem Alter sowohl Prävalenz als auch Konzentration von Chloroquin im Blut ab. Submikroskopische Infektionen waren bei Anwesenheit von Chloroquin im Blut gehäuft und nahmen bei ansteigenden Konzentrationen des Medikaments weiter zu. Auch sehr niedrige Medikamentenspiegel gingen mit Abwesenheit von *P. malariae* und *P. ovale*

einher. Dagegen waren nahezu zwei Drittel der Kinder mit als prophylaktisch geltenden Konzentrationen mit *P. falciparum* infiziert.

Die Konzentrationen des löslichen Serumtransferrinrezeptors (sTfR) bei Kindern mit asymptomatischer oder milder unkomplizierter Malaria waren erhöht und korrelierten mit den Parasitendichten. Kinder mit submikroskopischen Infektionen wiesen signifikant reduzierte Hb-Konzentrationen und erhöhte Spiegel von sTfR auf, was auf den Beitrag submikroskopischer Infektionen zur Anämie und auf Hämolyse als Ursache hinweist.

5.1.2. Schwangere [1998] und Gebärende [2000] aus Agogo, Ghana

- M8** Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, Thompson WN, Bienzle U. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. [*Trop Med Int Health* 2000; 5: 167-173.](#)
- M15** Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U. Diagnosis of placental malaria. [*J Clin Microbiol* 2002; 40: 306-308.](#)

Im holoendemischen Süden Ghanas wurde bei 530 Schwangeren aller Paritäten und Gestationsalter *P. falciparum* bei nahezu zwei Dritteln der Frauen im peripheren Blut nachgewiesen. Die Hälfte dieser Infektionen lag unterhalb der Nachweisgrenze der Mikroskopie und wurde mittels PCR diagnostiziert. Mit zunehmender Zahl vorangegangener Schwangerschaften nahmen die Prävalenz von *P. falciparum* und die Parasitendichten ab, der Anteil submikroskopischer Infektionen dagegen zu. *P. malariae* und *P. ovale* wurden von der Schwangerschaftszahl nicht beeinflusst. Der Nachweis der Einnahme von Pyrimethamin und/oder Chloroquin war nicht mit Parasitendichten aber mit einer Verdopplung der Wahrscheinlichkeit einer submikroskopischen Infektion bei infizierten Frauen assoziiert. Mikroskopisch nachweisbare Infektionen waren mit Anämie, Fieber und einer Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP) vergesellschaftet. Bei submikroskopischen Infektionen wurden eine leichte Reduktion der Hb-Spiegel und eine deutliche der CRP-Konzentrationen beobachtet.

In einer Anschlussstudie zeigte sich, dass den im peripheren Blut als submikroskopisch imponierenden Infektionen in der Regel plazentar sequestrierte Parasiten zugrunde liegen. Die Sensitivität der Mikroskopie peripherer Blutausstriche zum Nachweis einer plazentaren *P. falciparum*-Parasitämie in der Schwangerschaft erwies sich als unzureichend, wohingegen ein Antigennachweistest (ICT Malaria Pf/Pv) eine zufriedenstellende und die PCR eine nahezu vollständige Sensitivität aufwiesen.

5.1.3. Kinder mit schwerer Malaria aus Tamale, Ghana [2002]

M22 Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Burkhardt J, Bosomtwe SY, Layrea S, Anemana SD, Otchwemah RN, Cramer J, Gellert S, Bienzle U. Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern Ghana. [Am J Trop Med Hyg 2004; 71: 167-172.](#)

Die schwere Malaria manifestierte sich bei 290 Kindern aus Tamale, Nordghana, in einer für ein hyperendemisches Gebiet klassischen Weise. Dafür sprechen das niedrige Manifestationsalter, das Überwiegen von schwerer Anämie als definierendes Symptom und das relativ seltene Auftreten zerebraler Malaria. Das Alter der Kinder beeinflusste die Symptomatik insofern als schwere Anämie gehäuft bei jungen Kindern, neurologische Symptome dagegen gehäuft bei älteren Kindern auftraten. Zu den Faktoren, die in multivariater Analyse mit letalem Ausgang assoziiert waren, zählten zirkulatorischer Kollaps, Bewusstseinstörung, Hypoglykämie und Unterernährung. Das häufigste Symptom, schwere Anämie, trug *per se* nicht zur Sterblichkeit bei. Hypoglykämie, wiederholte Krampfanfälle und junges Alter waren Risikofaktoren für neurologische Sequelae.

5.2. Bedeutung von Parasitenfaktoren

5.2.1. Multiplizität der Infektion

- M6** May J, Falusi AG, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Olumese PE, Bienzle U, Meyer CG. Impact of subpatent multi-species and multi-clonal plasmodial infections on anaemia in children from Nigeria. [Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 399-403.](#)
- M14** Beck S, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Eggelte TA, Thompson WN, Stark K. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in pregnancy. [Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 631-636.](#)
- M18** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Markert M, Eggelte TA, Anemana SD, Otchwemah RN, Bienzle U. *Plasmodium falciparum* multiplicity correlates with anaemia in clinical malaria. [Trop Med Int Health 2003; 8: 857-859.](#)

Untersuchungen bei asymptomatischen nigerianischen Kindern zeigten, dass eine Anämie nicht nur mit der Zahl infizierender *Plasmodium Spp.*, Splenomegalie und Parasitendichte assoziiert war, sondern auch mit der Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum*. In multi-variater Analyse verlor sich jedoch der letztere Befund.

In der ersten diesbezüglichen Studie bei Schwangeren wurde beobachtet, dass die Multiplizität der Infektion mit zunehmender Zahl vorangegangener Schwangerschaften abfiel. Adjustiert für Parasitendichte, Schwangerschaftszahl und Trimenon war sie erst ab einer Zahl von ≥ 4 nachgewiesenen Klonen mit Anämie assoziiert. Nach Stratifizierung der Studiengruppe in Frauen mit bis zu drei bzw. mehr Schwangerschaften zeigte sich, dass dieser Zusammenhang jedoch nur in der ersteren Gruppe gegeben war.

Eindeutigere Ergebnisse erbrachte eine Untersuchung bei Kindern mit unkomplizierter Malaria aus Tamale, Nordghana. Bei diesen war eine hohe Multiplizität der Infektion ein von Alter und Parasitendichte unabhängiger Risikofaktor für niedrige Hb-Spiegel und schwere Anämie (Hb < 7 g/dL). Darüberhinaus wurden zwei parasitäre *mSP2*-Allele identifiziert, die mit einer Verdopplung bzw. einer Halbierung des Risikos einer Anämie einhergingen.

5.2.2. Medikamentenresistenzfaktoren

- M5** Mockenhaupt FP, May J, Eggelte TA, Thies FL, Ademowo OG, Bienzle U, Meyer CG. Short report: high prevalence and imbalanced age distribution of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase gene Asn108 mutation in an area of low pyrimethamine usage in Nigeria. [Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 375-377.](#)
- M12** Mockenhaupt FP, Eggelte TA, Böhme T, Thompson WN, Bienzle U. *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase alleles and pyrimethamine use in pregnant Ghanaian women. [Am J Trop Med Hyg 2001; 65:21-26.](#)
- M13** Mockenhaupt FP, Eggelte TA, Till H, Bienzle U. *Plasmodium falciparum* *pfert* and *pfmdr1* polymorphisms are associated with the *pfdhfr* N108 pyrimethamine-resistance mutation in isolates from Ghana. [Trop Med Int Health 2001; 6: 749-755.](#)
- M16** Ehrhardt S, Mockenhaupt FP, Agana-Nsiire P, Mathieu A, Anemana S, Otchwemah RA, Bienzle U. Efficacy of chloroquine in the treatment of uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria in northern Ghana. [Ann Trop Med Parasitol 2002; 96: 239-247.](#)
- M19** Ehrhardt S, Mockenhaupt FP, Eggelte TA, Agana-Nsiire P, Stollberg K, Anemana SD, Otchwemah RN, Bienzle U. Chloroquine blood concentrations and molecular markers of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in febrile children in northern Ghana [Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97: 697-701.](#)
- M20** Muehlen M, Schreiber J, Ehrhardt S, Otchwemah R, Jelinek T, Bienzle U, Mockenhaupt FP. Prevalence of mutations associated with resistance to atovaquone and to the antifolate effect of proguanil in *Plasmodium falciparum* isolates from northern Ghana. [Trop Med Int Health 2004; 9: 361-363.](#)

Die Bedeutung parasitärer Resistenz gegenüber Chloroquin und Pyrimethamin, bzw. Pyrimethamin-Sulfadoxin für die Epidemiologie und Manifestation der Malaria tropica ergibt sich aus der nahezu obligatorischen Anwesenheit dieser Medikamente im Blut von Kindern (und Schwangeren) in den Endemiegebieten. Erste Untersuchungen im ländlichen Nigeria zeigten eine weite Verbreitung von *P. falciparum*-Stämmen mit der mit Pyrimethamin- und Pyrimethamin-Sulfadoxin-Resistenz vergesellschafteten Hauptmutation *pfdhfr* N108. Während der Gebrauch von Pyrimethamin im Studiengebiet sehr selten war, wurden resistente Erreger mit zunehmendem Alter der infizierten Kinder deutlich seltener nachgewiesen.

Ein enger Zusammenhang zwischen der prophylaktischen Einnahme von Pyrimethamin und dem Auftreten Pyrimethamin-resistenter *P. falciparum* wurde dagegen bei Schwangeren in Ghana beobachtet. Der Gebrauch von Pyrimethamin war mit einer Selektion der Mutationen *pfdhfr* N108 und C59 nicht aber von C51 oder T108 assoziiert. Parasiten mit dem hochresistenten Genotyp N108-I51-C59 lagen in mehr als einem Drittel vor. Bei Schwangeren mit gesicherter Pyrimethamin-Prophylaxe wurde zudem ein Trend für häufigeres Vorliegen einer Anämie mit zunehmendem parasitären Resistenzgrad beobachtet. Die Chloroquinresistenz vermittelnde Hauptmutation *pfcr* T76 wurde bei 69% der von den Schwangeren isolierten Stämmen nachgewiesen und war bei Frauen mit Chloroquinspiegeln häufiger. *Pfmdr1* Y86 zeigte keine derartige Selektion. Durch die Anwesenheit von Chloroquin wurde der Anteil polyklonaler Infektionen reduziert. Dies war jedoch nur bei sensitiven Erregern der Fall. Bei Schwangeren mit Chloroquinspiegeln war der Anteil polyklonaler Infektionen umso höher, je stärker das Ausmass der parasitären Resistenz war. Unabhängig vom Nachweis von Chloroquin und/oder Pyrimethamin war die Wahrscheinlichkeit, dass ein Isolat mit der Pyrimethaminresistenz-Mutation *pfdhfr* N108 ebenfalls *pfcr* T76 oder *pfmdr1*Y86 aufwies, um das Dreifache erhöht.

In Tamale, Nordghana, wurde klinisches Therapieversagen von Chloroquin bei Kindern mit unkomplizierter Malaria binnen zweier Wochen in 29% beobachtet, parasitologische Resistenz sogar in 57%. Mehr als vier Fünftel der *P. falciparum*-Stämme in diesem Gebiet zeigten die *pfcr* T76 Mutation. Wie zuvor bei Schwangeren, waren Parasiten mit dieser Mutation bei Kindern mit residuellen Spiegeln von Chloroquin selektiert. Gleiches galt für Erreger mit dem *pfmdr1* Y86 Allel. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass der mit Sulfadoxin-Pyrimethamin-Resistenz einhergehende Genotyp N108-I51-C59 bei 51% der Isolate in dieser Region nachzuweisen ist.

5.3. Bedeutung von Wirtsfaktoren

- M1** Mockenhaupt FP, Falusi AG, May J, Ademowo OG, Olumese PE, Meyer CG, Bienzle U. The contribution of α^+ -thalassaemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission. [Trop Med Int Health 1999; 4: 302-307.](#)
- M2** Mockenhaupt FP, Bienzle U, May J, Falusi AG, Ademowo OG, Olumese PE, Meyer CG. *Plasmodium falciparum* infection: influence on hemoglobin levels in alpha-thalassaemia and microcytosis. [J Infect Dis 1999; 180: 925-928.](#)
- M9** Mockenhaupt FP, Rong B, Günther M, Beck S, Till H, Kohne E, Thompson WN, Bienzle U. Anaemia in pregnant Ghanaian women: importance of malaria, iron deficiency, and haemoglobinopathies. [Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 477-483.](#)
- M10** Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Meyer CG, Falusi AG, Bienzle U. Evidence for a reduced effect of chloroquine against *Plasmodium falciparum* in alpha-thalassaemic children. [Trop Med Int Health 2001; 6: 102-107.](#)
- M11** Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Thompson WN, Bienzle U. Short report: Increased susceptibility to *Plasmodium malariae* in pregnant α^+ -thalassaemic women. [Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 6-8.](#)
- M17** Mockenhaupt FP, Mandelkow J, Till H, Ehrhardt S, Eggelte TA, Bienzle U. Reduced prevalence of *Plasmodium falciparum*-infection and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency. [Trop Med Int Health 2003; 8: 118-124.](#)
- M21** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Otchwemah R, Eggelte TA, Anemana SD, Stark K, Bienzle U, Kohne E. Limited influence of haemoglobin variants on *Plasmodium falciparum msp1* and *msp2* alleles in symptomatic malaria. [Trans R Soc Trop Med Hyg 2004; 98: 302-310.](#)
- M23** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Cramer J, Otchwemah RN, Anemana SD, Goltz K, Mylius F, Dietz E, Eggelte TA, Bienzle U. Hemoglobin C confers relative resistance to severe malaria in Ghanaian children. [J Infect Dis 2004; 190: 1006-1009.](#)
- M24** Cramer J, Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Burkhardt J, Otchwemah RN, Dietz E, Gellert S, Bienzle U. *iNOS* promoter variants and severe malaria in Ghanaian children. [Trop Med Int Health 2004; 9: 1074-1080.](#)
- M25** Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S, Otchwemah RN, Dietz E, Anemana SD, Bienzle U. α^+ -thalassaemia protects from severe malaria in African children. [Blood 2004; 104: 2003-2006.](#)

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der α^+ -Thalassämie. Die Anwendung von Verfahren der PCR zeigte, dass ihre Prävalenz in Westafrika unterschätzt wurde. Bis zu 33% der ghanaischen und bis zu 46% der nigerianischen Probanden waren α^+ -thalassämisch. Die homozygote Variante wurde in diesen Ländern als häufige Ursache einer mikrozytären Anämie identifiziert. Weder bei Kindern aus Nigeria, Schwangeren aus Ghana noch bei Kindern aus Nordghana hatte die α^+ -Thalassämie einen Einfluss auf das Risiko einer Infektion mit *P. falciparum per se* oder auf die Parasitendichten. In Nigeria war eine Mikrozytose, nicht aber eine α^+ -Thalassämie an sich, mit einer verminderten Reduktion der Hb-Konzentrationen durch die *P. falciparum*-Infektion assoziiert. In Ghana wurde ein solcher Effekt bei Schwangeren mit α^+ -Thalassämie beobachtet. Zudem zeigten α^+ -thalassämische, *P. falciparum*-infizierte Schwangere seltener Fieber und CRP-Erhöhung als nicht-thalassämische Frauen. Dafür war die Prävalenz gemischter Infektionen mit *P. malariae* erhöht. In Nordghana liess sich erstmals in Afrika zeigen, dass die heterozygote α^+ -Thalassämie mit einer 26-48%igen Reduktion des Risikos einer schweren Malaria einhergeht. Kein solcher protektiver Einfluss wurde für die homozygote Anlage beobachtet. Die Letalität an schwerer Malaria wurde durch die α^+ -Thalassämie nicht verändert. Weitere Effekte der α^+ -Thalassämie auf die Infektion mit *P. falciparum* zeigten sich bei der Analyse von Chloroquinspiegeln und Parasitengenotypen. Gleiche Chloroquinkonzentrationen gingen bei α^+ -thalassämischen Kindern in Nigeria mit höheren Parasitendichten als bei nicht-thalassämischen einher. Zudem wiesen homozygote Kinder signifikant häufiger Chloroquin im Blut auf. Bei ghanaischen Kindern wurde zwar die Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum* durch den α -Globin-Genotyp nicht beeinflusst. Es wurde jedoch ein selteneres Auftreten von Parasiten des *mSP1*-Typs Mad20 und ein häufigeres des *mSP2*-Typs IC beobachtet.

HbAS und HbAC zeigten bei ghanaischen Schwangeren keinen Effekt auf die Prävalenz der *P. falciparum*-Infektion; Frauen mit der Sichelzellanlage hatten sogar höhere Parasitendichten als Hb-normale Schwangere. Probandinnen mit erhöhtem HbF wiesen eine reduzierte Prävalenz von Parasitämie auf. Weder HbAS noch HbAC gingen bei Kindern in Nordghana mit einer von Patienten mit HbAA signifikanten Abweichung malariologischer Indizes wie Infektionsprävalenz, Parasitendichten oder Multiplizität der Infektion einher. In einem nur sehr geringen Masse war eine Selektion parasitärer Genotypen durch HbAS und HbAC zu verzeichnen. Dessen ungeachtet vermittelten beide Hämoglobinopathien bei Kindern in Nordghana signifikanten Schutz vor schwerer Malaria. Die dort vorherrschende Hämoglobin-

variante HbAC war im Vergleich mit asymptomatisch infizierten Kindern mit einer ca. 47%igen Reduktion des Risikos schwerer Malaria assoziiert. Insbesondere reduzierte HbAC die Wahrscheinlichkeit von schwerer Anämie, von Prostration, von multiplen Krampfanfällen und letalen Ausgangs. Keine Effekte von HbAS oder HbAC bestanden dagegen hinsichtlich der Parasitendichte oder der Infektion mit *P. falciparum per se*.

Die Bedeutung des G6PD-Mangels für die Malaria in der Schwangerschaft wurde in Südhana untersucht. In multivariater Analyse zeigte sich bei Erstschwangeren ein durch den Enzymmangel vermittelter Schutz vor der Infektion mit *P. falciparum*. Bei Frauen mit mehreren vorangegangenen Schwangerschaften war der G6PD-Mangel mit einer reduzierten Häufigkeit von Anämie assoziiert.

Keine der vorbeschriebenen Zusammenhänge zwischen dem Risiko einer schweren Malaria und den Promoterpolymorphismen des NOS2 Gens konnten bei ghanaischen Kindern verifiziert werden. Die Prävalenzen von NOS2^{-954 G→C}, von NOS2^{-1173 C→T}, und des kurzen Pentanukleotid-*Repeats* (CCTTT)₁₁ unterschieden sich nicht zwischen Kinder mit schwerer Malaria und parasitärischen bzw. gesunden Kontrollen. Starke Assoziationen zwischen NOS2^{-954 G→C} und NOS2^{-1173 C→T} einerseits und CCTTT₍₈₎ und CCTTT₍₁₃₎ andererseits legen entsprechende Haplotypen nahe. Auch diese waren nicht mit schwerer Malaria assoziiert. Der Haplotyp NOS2^{-1173 C→T}/CCTTT₍₁₃₎ war vielmehr mit einer sechsfachen Erhöhung des Risikos, an schwerer Malaria zu sterben, vergesellschaftet.