

Einflussfaktoren auf die Inzidenzdichte klinischer Malaria  
von Säuglingen und Kleinkindern in Lambaréné, Gabun

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Schitke, Christof

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Martus

Meiner Familie und meinen Freunden

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Malaria	1
1.2 Stellenwert der Erkrankung mit <i>Plasmodium falciparum</i>	4
1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit	4
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1 Studiengebiet und Studienpopulation	6
2.2 Beschreibung der analysierten Studien	7
2.2.1 GMZ2_BL	7
2.2.2 GMZ2_4	8
2.2.3 MAL_050	9
2.3 Beschreibung der Analyse	11
2.3.1 Falldefinitionen klinischer Malaria	11
2.3.2 Vorgehensweise zur Ermittlung der Parasitämie	12
2.3.2.1 Bestimmung des Mikroskopfaktors MF	12
2.3.2.2 Auszählung der Parasitendichte mit der Lambarénémethode	13
2.3.2.3 Auszählung der Parasitendichte mit der WHO-Methode	14
2.3.2.4 Errechnung der endgültigen Parasitämie	14
2.3.3 Aufbau der Datenbanken	15
2.3.3.1 Aufbau der Datenbank für GMZ2_BL	15
2.3.3.2 Aufbau der Datenbank für GMZ2_4	16
2.3.3.3 Aufbau der Datenbank für MAL_050	17
2.3.4 Definition der Saisonalität	17
2.3.5 Ermittlung der Inzidenzdichte	20
2.3.6 Berechnung des Inzidenzdichteverhältnisses	21
2.3.7 Methodik der Überlebenszeitanalysen	21
2.3.8 Verwendete Programme	22
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1 Kohorte und Beobachtungszeitraum der analysierten Studien	23
3.1.1 GMZ2_BL	23
3.1.2 GMZ2_4	23
3.1.3 MAL_050	24

3.2 Fallzahlen und Parasitämien klinischer Malaria mit <i>P. falciparum</i>	25
3.3 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse klinischer Malaria	26
3.3.1 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse zwischen den Studien	26
3.3.2 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse nach Saison	27
3.3.3 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse nach Geschlecht	30
3.3.4 Inzidenzdichte in Abhängigkeit vom Alter	32
3.3.5 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnis der MAL_050 Subpopulationen	33
3.4 Survivalanalysen	34
3.4.1 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen Studien	34
3.4.2 Cox-Regressionsanalysen	36
<b>4. Diskussion</b>	<b>38</b>
4.1 Einfluss der Einzelfaktoren auf die Inzidenzdichte	38
4.1.1 Geschlechtszugehörigkeit	38
4.1.2 Saisonalität	39
4.1.3 Alter	41
4.1.4 Zeitpunkt der Studiendurchführung	43
4.1.5 Intervention	44
4.2 Empfehlungen zur Ermittlung realitätsnaher epidemiologischer Daten	45
4.3 Schlussfolgerungen für die globale Malariabekämpfung	46
4.4 Methodenkritik	49
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>7. Bilderverzeichnis</b>	<b>57</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

**a** - Jahr(e)

**Abb.** - Abbildung

**ACD** - active case detection, aktive Weiterverfolgung

**ARDS** – Acute Respiratory Distress Syndrome

**CERMEL** - Centre de Recherches Médicales de Lambaréné

**CS** - Circumsporozoite

**d** - Tag(e)

**DTP** - Diphtherie Tetanus Pertussis

**EDTA** - Ethylendiamintetraessigsäure

**EIR** – entomologische Inokulationsrate

**EPI** - Expanded Program of Immunization

**FD** - Falldefinition

**GLURP** - Glutamate-rich protein

**HBsAg** - Hepatitis B surface antigen

**HepB** - Hepatitis B

**Hib** - Haemophilus influenzae b

**HR** – Hazard Ratio

**ID** – Inzidenzdichte

**IDV** – Inzidenzdichteverhältnis

**IN** - Anzahl der Erkrankungsfälle (incl. Mehrfacherkrankungen eines Individuums) innerhalb eines Bezugszeitraumes

**incl.** - inklusive

**IQA** – Interquartilsabstand

**ITN** - Insecticide Treated Nets

**KI** - Konfidenzintervall

**m** - männlich

**MF** - Mikroskopfaktor

**min** - Minute(n)

**µl** - Mikroliter

**N** - Gesamtzahl der Individuen in einer Studie

**OPV** - Orale Poliovakzine

**PCD** - passive case detection, passive Weiterverfolgung

**PfEMP1** - *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1

**P** - Plasmodium

**PZ** - Gesamtpersonenzeit als Summe aller  $t_i$  innerhalb eines Bezugszeitraumes

**Q** - Quantil(e)

**RZ** – Regenzeit

**SOP** - Standard Operating Procedure

**StdA** - Standardabweichung

**t** - Körpertemperatur

$t_i$  - Personenzeit eines Individuums innerhalb eines Bezugszeitraumes

**TZ** – Trockenzeit

**VAC (-)** - ungeimpfte Kontrollgruppe

**VAC (+)** - geimpfte Interventionsgruppe

**VE** - vaccine efficacy

**w** - weiblich

**WHO** - World Health Organisation



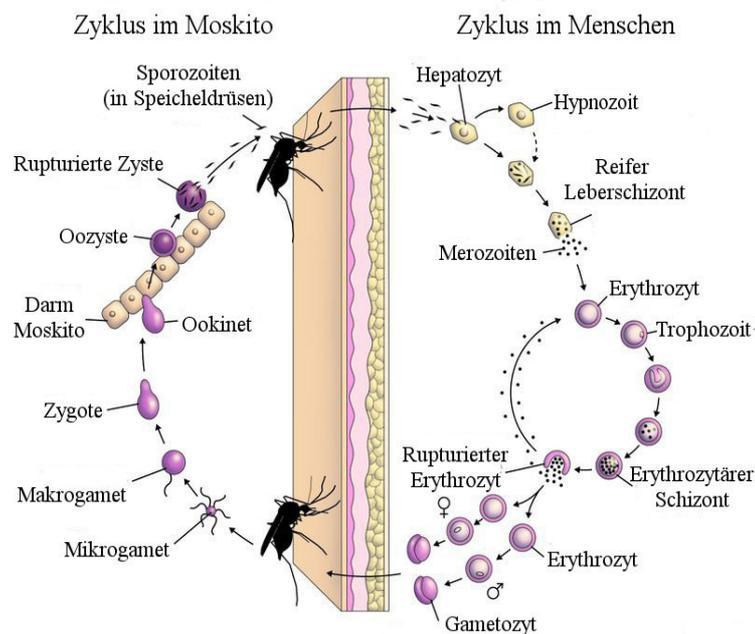
# 1. Einleitung

## 1.1 Malaria

Die Malaria ist eine durch Vektoren übertragene Infektionskrankheit, welche durch Protozoen der Gattung Plasmodium verursacht wird. Die Übertragung erfolgt über Stechmücken der Gattung Anopheles, deren Weibchen durch ihren Stich die infektiösen Sporozoiten in die Blutbahn des Menschen inokulieren können. Bisher sind 5 humanpathogene Plasmodienarten bekannt: *P. vivax* und *P. ovale* als Erreger der Malaria tertiana, *P. malariae* als Erreger der Malaria quartana, *P. falciparum* als Erreger der Malaria tropica sowie *P. knowlesi*, dessen Krankheitsbild Schnittmengen mit Infektionen durch *P. vivax* und *P. falciparum* aufweist.<sup>[1]</sup>

Während der Blutmahlzeit eines mit Plasmodien infizierten Anophelesweibchens gelangen die motilen Formen der Parasiten, die Sporozoiten, in den Blutkreislauf des Menschen und befallen das Leberparenchym. Hier kommt es zur ersten ungeschlechtlichen Vermehrung der Plasmodien (Schizogonie), wobei bei den Gattungen *P. vivax* und *P. ovale* ein Teil der Sporozoiten in eine intrahepatozytäre Ruhephase eintritt und als Hypnozoiten bezeichnet wird. Durch die massive Vermehrung innerhalb der Leberschizontenphase rupturieren die Hepatozyten, wodurch aus einer Leberzelle zehntausende Merozoiten in die Blutbahn gelangen können. Diese dringen in die Erythrozyten ein und wachsen unter Hämoglobinverbrauch zu den für die Malaria typischen, ringförmigen Trophozoitenformen heran, bis sie schließlich unter erneuten Teilungen den gesamten Erythrozyten ausfüllen (Blutschizontenphase). Am Ende dieser Wachstums- und Teilungsphase rupturiert die Zelle und entlässt die neu gebildeten Merozoiten in die Blutbahn. Diese befallen nun erneut einen Erythrozyten und entwickeln sich wieder zu Trophozoiten oder differenzieren sich zu Gametozyten, den ersten sexuellen Formen der Plasmodien, welche im Blut persistieren und über einen erneuten

Stich durch Anopheles spp. aufgenommen werden können. Im Darm der Mücke entwickeln sich die weiblichen Makrogametozyten zu Makrogameten, indem sie sich von dem sie noch umgebenden Erythrozytenrest befreien. In den männlichen Mikrogametozyten kommt es zu Kernteilungen und Ausbildung von Plasmafilamenten, in die jeweils ein Kern einwandert. Dieser so gebildete Mikrogamet trennt sich vom Rest des Zelleibes und fusioniert mit einem Makrogameten zur Zygote, welche sich als Ookinet in der Darmwand der Mücke festsetzt und dort zur Zyste weiterreift. Diese vergrößert sich durch asexuelle Teilung, rupturiert und setzt zehntausende Sporozoiten frei, welche über die Zirkulation der Mücke in deren Speicheldrüsen gelangen und bei einem erneuten Stich eines Menschen diesen infizieren können.<sup>[2]</sup>



**Abbildung 1:** Malariazyklus<sup>[1]</sup>

Für die Symptome der Malaria verantwortlich ist die Blutschizontenphase mit der anschließenden Ruptur des Erythrozyten. Leitsymptom ist das hohe Fieber (oft über 40°C, ggf. mit Fieberkrampf), welches bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* einen typischen, schubweisen Verlauf (etwa alle 48 h) zeigt und bei

den bekannten *P. knowlesi* Infektionen täglich auftritt. Der Fieberverlauf von *P. falciparum* und *P. malariae* Infektionen ist dagegen unregelmäßiger und lässt eine rein klinische Diagnose aufgrund oft unspezifischer Begleitsymptome nicht zu. Zu diesen gehören Schüttelfrost, abdominelle Beschwerden, Kopfschmerzen, Arthralgien und Myalgien sowie anämische Folgeerscheinungen durch die durch *P. falciparum* und *P. knowlesi* bedingten, teilweise sehr hohen Parasitämien. Eine chronische Anämie sowie eine Splenomegalie ist häufig in holoendemischen Malariagebieten. Ursache für die schwer verlaufende Form der Malaria tropica ist die durch PfEMP1 vermittelte Fähigkeit zur Endothelzelladhärenz befallener Erythrozyten, welche zu Mikrozirkulationsstörungen in lebenswichtigen Organen führen kann. Mögliche Folgen sind Hypoglykämie, Laktatazidose, Verbrauchskoagulopathie mit Folgeblutungen, akutes Nierenversagen sowie zerebrale Krampfanfälle und Eintrübung bis zum Koma. Die Ursache eines nicht kardiogenen Lungenödems, welches zum ARDS führen kann und gelegentlich auch für schwere Verläufe durch *P. vivax* und *P. knowlesi* verantwortlich ist, ist ungeklärt.<sup>[1],[3]</sup>

Im Jahr 2010 lebten weltweit 3,2 Milliarden Menschen in Malariaendemiegebieten (davon 1,2 Milliarden in Hochendemiegebieten), das entspricht 57 % der Weltbevölkerung (21% in Hochendemiegebieten). Laut WHO Statistik wurden 2010 weltweit 216 Millionen Malariafälle registriert. Diese Zahl stellt im Vergleich zu 2005 mit 244 Millionen Fällen einen deutlichen Rückgang dar und bedeutet den niedrigsten Wert überhaupt innerhalb des Erfassungszeitraumes im WHO Malaria Report 2011. Die Fallzahlen mit letalem Ausgang sind seit dem Jahre 2000 mit geschätzten 985.000 Fällen im Jahre 2010 mit 655.000 Fällen stetig gesunken.<sup>[4]</sup> Allerdings sind die epidemiologischen Zahlen zur Malariamorbidity und -mortality je nach Studie und Methodik uneinheitlich.<sup>[5],[6],[7]</sup>

Der Fokus ist auf die WHO Region Afrika zu richten, wo 2010 81 % der weltweiten Malariaerkrankungen und 91 % der durch Malaria bedingten Todesfälle registriert wurden. Hier leben ca. 575 Millionen Menschen in

Hochendemiegebieten, was einem weltweiten Anteil von 47% aller in Hochendemiegebieten lebender Menschen entspricht.<sup>[4]</sup>

Besonders betroffen von der Malaria sind Kinder und Säuglinge im Alter von 0-5 Jahren. Im Jahr 2008 war die Erkrankung in dieser Altersgruppe die Ursache von 8 % der Todesfälle weltweit. Zieht man die Neonatalsterblichkeit ab, erreicht dieser Wert sogar 14 %. Er unterliegt starken natürlichen regionalen Schwankungen und erreichen in der WHO Region Afrika 16 % (bzw. 23 % ohne Neonatalsterblichkeit).<sup>[8]</sup>

## **1.2 Stellenwert der Erkrankung mit *Plasmodium falciparum***

Während schwerwiegende Krankheitsverläufe bei Infektionen durch andere Plasmodienarten die Ausnahme sind, ist die Erkrankung mit *P. falciparum* für die überwiegende Anzahl der durch Malaria verursachten Todesfälle verantwortlich. Ursache dafür sind die hohen Parasitämien mit den damit zusammenhängenden Komplikationen in lebenswichtigen Organsystemen wie Anämie, akutes Nierenversagen sowie pulmonalen und zerebralen Funktionsstörungen. Dieser Sachverhalt spiegelt sich ebenfalls in epidemiologischen Daten wider: 596.000 der geschätzten 655.000 weltweiten Todesfälle durch Malaria 2010 betrafen die Bevölkerung des afrikanischen Kontinents, wo *P. falciparum* für nahezu alle (98 %) Malariaerkrankungen verantwortlich ist.<sup>[4]</sup>

## **1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand gleicher Kriterien die Inzidenzdichte klinischer Malaria innerhalb 3 prospektiver Studien zu errechnen, welche am Centre de Recherches Médicales de Lambaréné, Gabun, in verschiedenen Zeiträumen mit verschiedenen Kohorten und Interventionen durchgeführt wurden. Anhand der gewonnenen Daten sollen die Inzidenzdichten verglichen

und die Faktoren Geschlechtszugehörigkeit, Saisonalität, Alter, Zeitpunkt der Studiendurchführung und Intervention als mögliche Gründe für Unterschiede in der Inzidenzdichte zwischen den einzelnen Studien diskutiert werden.

Die Inzidenzdichte ist eine wichtige epidemiologische Größe, welche Änderungen des Auftretens einer Erkrankung innerhalb einer Bevölkerungsgruppe sicher erfasst. Die Detektion von Einflussfaktoren auf die Inzidenzdichte klinischer Malaria hilft, die Dynamik dieser Krankheit besser zu verstehen, gefühlte Schwankungen im klinischen Alltag zu objektivieren und Studien zum Malariaaufkommen kohortenspezifisch zu planen. Darüber hinaus lassen sich so mögliche Ursachen finden, die die große Unsicherheit erklären, realistische epidemiologische Daten zur Malariamorbidität und -mortalität aufzustellen und Malariakontrollprojekte und -eradikationsbemühungen sinnvoll zu überwachen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiengebiet und Studienpopulationen

Studiengebiet: Alle 3 Studien werden bzw. wurden am Centre de Recherches Médicales de Lambaréné, Gabun durchgeführt. Gabun liegt in Zentralafrika und wird im Westen vom Atlantischen Ozean, im Süden und Osten von der Republik Kongo sowie im Norden von Kamerun und Äquatorialguinea begrenzt. Gabun besitzt Landesteile sowohl nördlich als auch südlich des Äquators. Das Klima ist tropisch bei einer Jahresdurchschnittstemperatur von 25,2 °C. Die Niederschlagsrate ist saisonalen Schwankungen unterlegen und ist niedrig in der langen Trockenzeit von Juni bis September im Vergleich zur Regenzeit, welche durch eine kurze Trockenzeit Mitte Dezember bis Januar in eine kurze (Oktober bis Mitte Dezember) und lange (Februar bis Mai) Regenzeit unterteilt wird.

Lambaréné ist eine Stadt mit etwa 20.000 Einwohnern und liegt in der Provinz Moyen-Ogooué ca. 180 km südöstlich der Hauptstadt Libreville an der Nationalstraße N1. Das Rekrutierungsgebiet des CERMEL erstreckt sich von Lambaréné in nördlicher Richtung bis zum etwa 80 km entfernt gelegenen Ort Bifoun sowie dem vor Bifoun aber abseits der N1 gelegenen Ort Makouké und in südlicher Richtung bis zur ebenfalls etwa 80 km entfernt gelegenen Kleinstadt Fougamou sowie dem vor Fougamou aber abseits der N1 gelegenen Dorf Sindara. Diese Region umfasst schätzungsweise eine Gesamtpopulation von 35.000 - 40.000 Einwohner und schließt urbane (Lambaréné) und ländliche (Peripherie von Lambaréné) Gebiete ein. Sie stellt ein typisches zentralafrikanisches Regenwaldgebiet dar und ist, wie ganz Gabun, ein Hochrisikogebiet für Infektionen mit *P. falciparum*. Hauptvektor ist *Anopheles gambiae*, gefolgt von *Anopheles moucheti* und *Anopheles funestus*.<sup>[9] [4]</sup> Da in Gabun nahezu ausschließlich Infektionen mit *P. falciparum* vorkommen (s.o.), wird nachfolgend der Begriff Malaria mit der Erkrankung an *Malaria tropica* gleichgesetzt.

Studienpopulation: Alle beschriebenen Studien haben Studienteilnehmer in der gesamten Region rekrutiert. Eingeschlossen wurden Kinder bzw. Säuglinge ohne schwerwiegende akute oder chronische Krankheiten beider Geschlechter im Alter von 6 bis 12 Wochen (MAL\_050, s.u.) bzw. von 12 bis 60 Monate (GMZ2\_BL, GMZ2\_4, s.u.). Diese Altersgrenzen gelten in den Interventionsstudien MAL\_050 und GMZ2\_4 für den Zeitpunkt der ersten Impfvizite, für GMZ2\_BL für den Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie.

## **2.2 Beschreibung der analysierten Studien**

Daten folgender Studien wurden für die vorliegende Arbeit analysiert:

*Baseline epidemiological study in preparation for a phase IIb proof of concept efficacy study of GMZ 2 candidate malaria vaccine in children aged 1-5 years.*  
(nachfolgend GMZ2\_BL genannt)

*A phase IIb, randomized, controlled, double-blind, multi-centre study to evaluate the efficacy, safety, and immunogenicity of three (3) doses of GMZ2 candidate malaria vaccine in Gabonese, Burkinabe, Ghanaian and Ugandan children aged 12 – 60 months.* (nachfolgend GMZ2\_4 genannt)

*Safety and immunogenicity study of GSK Biologicals' malaria vaccine 257049, when incorporated into an Expanded Program on Immunization (EPI) regimen that includes Tritanrix HepB/Hib, OPV, measles and yellow fever vaccination in infants* (nachfolgend MAL\_050 genannt)

### **2.2.1 GMZ2\_BL**

GMZ2\_BL war eine interventionsfreie, multizentrische, epidemiologische Studie, welche 2010 an Forschungszentren in Gambia, Gabun, Uganda und Burkina Faso durchgeführt wurde. Zentrum in Gabun war das CERMEC des Albert

Schweitzer Hospitals. Hauptanliegen der Studie war, aktuelle epidemiologische Daten zum Malariaaufkommen in den jeweiligen Studiengebieten zu erheben, welche als Grundlage für die Fallzahlplanung nachfolgender Interventionsstudien mit dem Antimalariaimpfstoff GMZ2 dienen sollten. Weiteres Ziel der Studie war, Strukturen und Arbeitsabläufe zur Durchführung eben jener Nachfolgestudien an den jeweiligen Zentren aufzubauen und zu etablieren, sowie potentielle Unterschiede in der Ermittlung epidemiologischer Daten durch aktive Weiterverfolgung (active case detection = ACD) und passive Weiterverfolgung (passive case detection = PCD) der Studienteilnehmer zu eruieren. Dazu wurden die Studienteilnehmer in 2 Kohorten randomisiert, von denen jeweils eine durch ACD und eine durch PCD weiterverfolgt wurde. Bei der PCD wurden Episoden klinischer Malaria erfasst, indem die Eltern der Studienteilnehmer gebeten wurden, im Krankheitsfall des Kindes dieses am CERMEC vorzustellen, um es im Falle einer fiebrigen Erkrankung einer Malariadiagnostik zu unterziehen. Bei der ACD wurden die Studienteilnehmer zweimalig pro Woche im häuslichen Umfeld besucht, um sie im Falle einer febrilen Erkrankung ebenfalls einer Malariadiagnostik zu unterziehen. Bei einem Follow-Up-Zeitraum von maximal 24 Wochen sollten 300 Kinder in die ACD-Kohorte und 300 Kinder in die PCD-Kohorte eingeschlossen werden. Der primäre Endpunkt der Studie war die Inzidenz von Malaria. Im Zeitraum vom 07.01.2010 bis 19.07.2010 wurden 610 Kinder in die Studie eingeschlossen, das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen.

### **2.2.2 GMZ2\_4**

GMZ2\_4 ist eine seit Ende 2010 laufende, randomisierte, kontrollierte, doppelblinde, multizentrische Phase IIb Studie, deren Ziel es ist, die Wirksamkeit des Malariaimpfstoffes GMZ2 zu eruieren. Als Maß der Wirksamkeit wird der Prozentsatz der Verminderung des Auftretens klinischer Malaria innerhalb der Interventionsgruppe ermittelt werden. Die Studie wird in den Ländern Ghana, Gabun, Uganda und Burkina Faso durchgeführt, das

Studienzentrum in Gabun ist das Centre de Recherches Médicales de Lambaréné. Die geplante Teilnehmerzahl der Studie in allen Zentren zusammen beträgt 1840 Kinder im Alter zwischen 12 und 60 Monaten zum Zeitpunkt der ersten Impfdosis, welche 1:1 randomisiert werden und Impfdosen nach 0, 28 und 56 Tagen entweder mit dem GMZ2 Interventionsimpfstoff oder mit einem Tollwut-Kontrollimpfstoff erhalten. Der Nachverfolgungszeitraum für jeden Teilnehmer beträgt 24 Monate, wobei Fälle klinischer Malaria mittels PCD erfasst werden. GMZ2 ist ein rekombinanter Hybridproteinimpfstoff mit den antigen wirksamen Bestandteilen Glutamate-rich protein GLURP, einem Exoantigen, sowie dem Merozoite Surface Protein 3 MSP3. Nachdem die Sicherheit und Immunogenität des Impfstoffes in mehreren vorangegangenen Studien nachgewiesen werden konnte, ist GMZ2\_4 die erste Wirksamkeitsstudie für die Vakzine.<sup>[10], [11],[12]</sup>

Zum Zeitpunkt der Durchsicht der vorliegenden Dossiers waren 463 Kinder in der Nachverfolgung der Studie, welche zwischen dem 02.11.2010 und dem 08.07.2011 in diese eingeschlossen wurden, darunter 208 Mädchen (45%) und 255 Jungen (55%).

### **2.2.3 MAL\_050**

MAL\_050 war eine randomisierte, kontrollierte, offene, multizentrische Phase II Studie zur Überprüfung der Sicherheit und Immunogenität des Malariaimpfstoffes RTS,S/AS01E, welche 2007 bis 2009 am CERMEL des Albert Schweitzer Hospitals durchgeführt wurde. Ein weiteres Ziel der Studie war es, den Impfplan von RTS,S in das WHO Expanded Program of Immunization (EPI) zu integrieren. Dafür sollten etwa 510 Säuglinge im Alter von 6-12 Wochen zum Zeitpunkt der ersten Impfdosis in die Studie eingeschlossen und 1:1:1 randomisiert werden. Die Kontrollkohorte erhielt im Alter von 6 Wochen (Monat 0 der Studie) die erste Dosis der Impfungen gegen DTP, Hib und HepB sowie die Erstdosis der OPV, die jeweils zweite und dritte Dosis im Alter von 10 Wochen (Monat 1 der Studie) bzw. 14 Wochen (Monat 2 der Studie) sowie die

Impfungen gegen Masern und Gelbfieber im Alter von 9 Monaten (Monat 7 der Studie). In der ersten Interventionsgruppe wurde der RTS,S Impfstoff zusammen mit den Impfungen im Alter von 6, 10 und 14 Wochen verabreicht, in der zweiten Interventionsgruppe zusammen mit den Impfungen im Alter von 6 und 10 Wochen sowie 9 Monaten. Die geplante Gesamtdauer der Studie je Teilnehmer betrug 19 Monate von der ersten Impfvisite bis zum Ende der Follow-Up Phase. Daten zum Malariaaufkommen wurden durch PCD erfasst, die Sicherheit durch die Rate des Auftretens schwerer unerwünschter Ereignisse in der Kontroll- bzw. den Interventionsgruppen.

RTS,S ist ein Kombinationsimpfstoff aus den antigen wirkenden Sequenzen des *P. falciparum* circumsporozoite (CS) Protein sowie dem HbsAg. Dieses Konstrukt ermöglicht eine starke Immunogenität sowohl gegen CS Protein als auch gegen HbsAg. Entwickelt wurde der Impfstoff ursprünglich mit dem Adjuvans AS02 und wurde in vorangegangenen Studien an Erwachsenen, Kindern und auch Säuglingen bereits als sicher und immunogen eingeschätzt. Eine erste Wirksamkeitsstudie ergab eine Impfwirksamkeit von 32,8 % gegen jede Form von Malaria, sowie 48,6 % gegen Fälle schwerer Malaria. Parallel wurde RTS,S mit dem Adjuvans AS01 getestet und ebenfalls als sicher eingestuft, wobei erste Daten dafür sprachen, dass RTS,S/AS01 eine bessere VE vorweisen kann.

MAL\_050 war die erste Studie, in der RTS,S/AS01E an Säuglingen getestet wurde, nachdem die Kombination zuvor ebenfalls in Studien mit Erwachsenen und Kindern als sicher eingestuft werden konnte. Die im Oktober 2010 veröffentlichten Ergebnisse bestätigen die Sicherheit des Impfstoffes auch in der Säuglingskohorte. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit läuft die Studie Malaria-055 mit der Kombination RTS,S/AS01E, eine erste große, multizentrische Phase III Studie zur Wirksamkeit des Impfstoffes in Säuglings- und Kinderkohorten.<sup>[13],[14]</sup>

In den Daten von MAL\_050 finden sich Angaben von 220 Säuglingen, welche zwischen dem 30.04.2007 und dem 08.01.2008 in die Studie eingeschlossen wurden. Das Geschlechterverhältnis war exakt ausgeglichen.

Einen Überblick über die Charakteristika der analysierten Studien gibt Tabelle 1:

**Tabelle 1:** Charakteristika der analysierten Studien

	<b>GMZ2_BL</b>	<b>GMZ2_4</b>	<b>MAL_050</b>
<b>Intervention</b>	nein	Ja, GMZ2 Vakzine	Ja, RTS,S Vakzine
<b>Studienbeginn</b>	Jan 2010	Nov 2010	Apr 2007
<b>N</b>	610	463	220
<b>weiblich</b>	313 (51%)	208 (45%)	110 (50%)

## 2.3 Beschreibung der Analyse

### 2.3.1 Falldefinitionen klinischer Malaria

Die vorliegende Arbeit definiert 2 verschiedene Falldefinitionen für das Vorliegen klinischer Malaria:

Falldefinition 1: Eine Episode klinischer Malaria ist definiert als subjektives Unwohlsein eines der Studienteilnehmer, wegen dem dieser im CERMEL zur klinischen Konsultation vorgestellt wurde, eine zur Konsultation oder anamnestisch innerhalb der letzten 24 Stunden gemessene Körpertemperatur von  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  und eine mikroskopisch nachgewiesene Parasitämie durch Plasmodien der Gattung *P. falciparum* von  $\geq 5000/\mu\text{l}$ .

Falldefinition 2: Eine Episode klinischer Malaria ist definiert als subjektives Unwohlsein eines der Studienteilnehmer, wegen dem dieser im CERMEL zur klinischen Konsultation vorgestellt wurde, eine zur Konsultation oder anamnestisch innerhalb der letzten 24 Stunden gemessene Körpertemperatur von  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  und eine mikroskopisch nachgewiesene Parasitämie durch Plasmodien der Gattung *P. falciparum* von  $> 0/\mu\text{l}$ .

### 2.3.2 Vorgehensweise zur Ermittlung der Parasitämie

Von jedem Studienteilnehmer, der am CERMEI mit einer fiebrigen Erkrankung vorgestellt wurde, wurde eine Malariadiagnostik, bestehend aus einem Schnelltest (Paracheck Pf, Orchid Biomedical Systems, Indien) und der Anfertigung eines dicken Tropfens nach WHO- und/oder Lambarénémethode eingeleitet. Einen Überblick über die Fieberdefinitionen der einzelnen Studienprotokolle sowie die verwendete Methode zur Auszählung der Parasitendichte gibt Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Fieberdefinitionen und Methoden zur Bestimmung der Parasitämie

<b>Studie</b>	<b>Fieberdefinition</b>	<b>Methode zur Bestimmung der Parasitämie</b>
<b>GMZ2_BL</b>	t ≥ 38°C	WHO Methode, Lambarénémethode
<b>GMZ2_4</b>	t ≥ 38°C	WHO Methode, Lambarénémethode
<b>MAL_050</b>	t > 37,5°C	Lambarénémethode

#### 2.3.2.1 Bestimmung des Mikroskopfaktors MF

Für die durch die SOP *Determination of the "Microscope Factor"* standardisierte Bestimmung der Parasitendichte mit der Lambarénémethode ist es wichtig, den Mikroskopfaktor des Mikroskopes zu bestimmen, welches zur Auszählung der Plasmodien verwendet wird. Dieser entspricht der Anzahl der Sichtfelder pro µl Blut innerhalb des 1,8 cm<sup>2</sup> großen Rechteckes, in welchem das Blut bei dieser Methode ausgestrichen wird. Dadurch entfällt das simultane Zählen von Leukozyten.

Der Mikroskopfaktor MF lässt sich berechnen, wenn der Blickfelddurchmesser des Mikroskopes d (in µm) bekannt ist:

$$\mathbf{MF} = \frac{4 * 1,8 * 10^7}{(\pi * d^2)}$$

Alternativ dazu kann man die Leukozytenkonzentration von EDTA Blut in einem Haematologieanalysegerät bestimmen. Mit der gleichen Probe wird ein dicker Tropfen nach der Lambarénémethode (s.u.) angefertigt und die Anzahl der Leukozyten pro Feld durch Auszählung von 20 Blickfeldern errechnet. Der MF ergibt sich dann wie folgt:

$$\mathbf{MF} = \frac{\text{Leukozyten (Haematologieanalysegerät) pro } \mu\text{l}}{\text{Leukozyten pro Blickfeld}}$$

### 2.3.2.2 Auszählung der Parasitendichte mit der Lambarénémethode

Mit einer Pipette werden 10  $\mu\text{l}$  Kapillarblut oder venöses EDTA Blut auf einen Objektträger pipettiert und mit der Pipettenspitze auf einem 1,8 \* 1 cm großen Rechteck gleichmäßig ausgestrichen. Danach wird der Objektträger in einem Inkubator bei 40°C oder an der Luft getrocknet und 20 Minuten in 20%iger Giemsalösung, bestehend aus 20 ml Giemsa und 80 ml Pufferlösung (pH = 7,2), gefärbt. Anschließend wird der Objektträger durch leichtes Schwenken in klarem Wasser von Färbelösungsresten befreit und bei 40°C in vertikaler Position im Inkubator getrocknet. Der trockene Objektträger wird mit 100facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl mikroskopiert und die Anzahl der Parasiten pro Blickfeld ausgezählt. Beträgt diese  $\geq 50$  pro Feld, wird die Zählung nach Durchsicht von 20 Feldern beendet, beträgt sie nach Durchsicht von 20 Feldern durchschnittlich 5-49 pro Feld, müssen 10 weitere Felder ausgezählt werden, beträgt sie nach Durchsicht von 20 Feldern  $< 5$  pro Feld, müssen insgesamt 100 Felder ausgezählt werden. Die Bestimmung der Plasmodiengattung erfolgt anhand aushängender Bildvorlagen der WHO. Die Lesung gilt als negativ, wenn nach Durchsicht von 100 Feldern kein Parasit gefunden werden konnte. Die Parasitendichte im Blut ergibt sich wie folgt:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Parasiten} * \text{MF}}{\text{Anzahl der ausgezählten Felder}} = \frac{\text{Parasiten (asexuelle Formen)}}{\mu\text{l Blut}}$$

Dieses Verfahren ist durch die SOP *Plasmodium Determination and Counting Procedures/"Lambaréné Method"* standardisiert.

### 2.3.2.3 Auszählung der Parasitendichte mit der WHO-Methode

Die Erstellung des dicken Tropfens sowie die Färbung entspricht dem Vorgehen der Lambarénémethode, nur dass das Blut nicht auf einer Rechtecksfläche ausgestrichen wird, sondern als kreisrunder Tropfen aus der Pipette zentral auf den Objektträger aufgebracht und nicht weiter manipuliert wird. Der Tropfen wird mit 100facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl mäanderförmig mikroskopiert, mit einer Zähluhr werden die Leukozyten, mit einer zweiten die Plasmodien pro Blickfeld gezählt. Wenn nach dem Zählen von 200 Leukozyten mindestens 10 Parasiten gefunden wurden, kann die Lesung abgebrochen werden, wenn 1-9 Parasiten gefunden wurden, muss sie bis zur Zählung von 500 Leukozyten fortgesetzt werden. Um eine Lesung als negativ zu werten, sind mindestens 100 Blickfelder auszuzählen. Die absolute Leukozytenkonzentration pro  $\mu\text{l}$  Blut der Probe wird mittels Haematologieanalysegerät bestimmt. Die Anzahl der Parasiten pro  $\mu\text{l}$  Blut errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{gezählte Parasiten} * \text{absolute Leukozytenzahl}}{\text{gezählte Leukozyten}} = \frac{\text{Parasiten}}{\mu\text{l Blut}}$$

Ist die absolute Leukozytenkonzentration unbekannt, wird diese als 8000 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut angenommen. Dieses Verfahren ist durch die SOP *WHO Method - Plasmodium Counting Procedure* standardisiert.

### 2.3.2.4 Errechnung der endgültigen Parasitämie

In allen Studien wurde die Parasitämie durch Doppellesung der dicken Tropfen durch zwei unabhängige Leser bestimmt. Die finale Parasitämie errechnet sich,

gemäß den Kriterien der SOP *WHO Method - Plasmodium Counting Procedure* aus dem arithmetischen Mittel der zwei Lesungen, außer wenn ein Kriterium für eine Drittlung erfüllt wird. Diese wird veranlasst, wenn

- der Quotient aus dem höheren Lesewertes geteilt durch den niedrigeren Lesewert  $> 2$  beträgt
- beide Lesungen eine Parasitendichte von  $< 300$  pro  $\mu\text{l}$  ergeben haben und die absolute Differenz beider Ergebnisse  $> 100$  Parasiten beträgt.
- eine Lesung positiv und die andere Lesung negativ ausfällt

Im Falle einer Drittlung errechnet sich die finale Parasitämie aus dem arithmetischen Mittel der beiden Lesungen, deren Differenz am geringsten ist. Sind zwei Lesungen positiv und eine negativ, ergibt sie sich aus dem arithmetischen Mittel der beiden positiven Lesungen, sind zwei Lesungen negativ und eine positiv, so wird das Endergebnis als negativ angesehen.

### **2.3.3 Aufbau der Datenbanken**

#### 2.3.3.1 Aufbau der Datenbank für GMZ2\_BL

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung war die Studie bereits abgeschlossen, das Material aber nur teilweise in Datenbanken gespeichert: Daten der Screeningvisite sowie Daten einer zu Beginn der Studie am Tag des Screenings oder einige Tage danach durchgeführten Querschnittsstudie waren bereits im Datenbanksystem OpenClinica erfasst. Ebenfalls bereits eingetragen waren die geplanten Heimvisiten innerhalb der ACD und PCD in jeweils unterschiedlichen Intervallen. Die für diese Arbeit relevanten Werte, wie Geburtsdatum und Geschlecht der Studienteilnehmer, Datum des Einschlusses in die Studie sowie Teilnehmeridentifikationsnummer konnten der Screeningdatei entnommen werden. Bei 4 Teilnehmern war nur das Alter, nicht aber das exakte Geburtsdatum bekannt.

Fehlend waren die Daten zu den ambulanten und stationären Besuchen der Studienteilnehmer am CERMEL und im Albert Schweitzer Krankenhaus aufgrund von Erkrankungen aller Art und sämtliche Lesungen der dicken Tropfen. Zur Erfassung dieser Daten wurden die einzelnen Dossiers jedes Teilnehmers manuell durchgesehen und sämtliche Fälle mit Temperaturen  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  oder anamnestisch bestimmtem Fieber in den vorangegangenen 24 Stunden als potentielle Malariaerkrankungen erfasst. Die Ergebnisse der Erst- und Zweitlesung sowie gegebenenfalls der Drittlung des dicken Tropfens wurden aus den Logbüchern des Labores in eine Datenbank übernommen und fehlende Lesungen veranlasst. Anhand des Datums und der Teilnehmernummer wurden die Ergebnisse den einzelnen Konsultationen zugeordnet.

In einigen wenigen Fällen konnte kein dicker Tropfen zu den jeweiligen Konsultationen gefunden werden. Dies mag einerseits daran liegen, dass der Schwellenwert zur Einleitung einer Malariadiagnostik bei GMZ2\_BL und GMZ2\_4 bei  $38,0^{\circ}\text{C}$  statt  $37,5^{\circ}\text{C}$  Körpertemperatur liegt, andererseits daran, dass trotz Notwendigkeit keine Malariadiagnostik eingeleitet wurde.

In Fällen, in denen nur eine Erstlesung vorhanden war, allerdings aufgrund dessen, dass der dicke Tropfen nicht wieder aufgefunden wurde, keine Zweitlesung veranlasst werden konnte, wurden bei Erstlesung negativ gelesene Proben auch im Endergebnis negativ gewertet. Bei Erstlesung positive Parasitämien mit fehlender Zweitlesung und Doppellesungen mit einer positiv-negativ Diskrepanz bei fehlender Drittlung wurden von der Analyse ausgeschlossen. Konnte keine notwendige Drittlung im Falle zweier positiver Leseergebnisse durchgeführt werden, wurde die finale Parasitämie aus dem arithmetischen Mittel der Erst- und Zweitlesung ermittelt.

#### 2.3.3.2 Aufbau der Datenbank für GMZ2\_4

Da GMZ2\_4 eine zum Zeitpunkt der Datenerhebung für diese Arbeit noch laufende Studie ist, konnte lediglich ein Teildatensatz analysiert werden.

Zwischen dem 01.07.2011 und dem 08.09.2011 wurden alle bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Dossiers durchgesehen. Die Basisdaten Geschlecht, Geburtsdatum, Teilnehmeridentifikation und Screeningdatum sowie alle darauffolgenden geplanten und ungeplanten Konsultationen und stationären Fälle mit einer Körpertemperatur von  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  oder anamnestisch aufgetretenem Fieber wurden als potentielle Malariaerkrankungen registriert. Diesen wurden die in einer separaten Datenbank gespeicherten Ergebnisse der Lesungen des dicken Tropfens zugeordnet, wobei mit zum Abschluss der Datenbankerstellung am 14.02.2012 noch fehlenden Lesungen entsprechend den fehlenden Lesungen von GMZ2\_BL verfahren wurde.

#### 2.3.3.3 Aufbau der Datenbank für MAL\_050

Für die Analyse von MAL\_050 wurden die unverblindeten Finaldaten mit den bereits nach o.g. Kriterien errechneten Parasitämien verwendet. Die Datenbank wurde durch GlaxoSmithKline für diese Arbeit zur Verfügung gestellt und besteht aus 2 Teilen: einem Teil mit Basisinformationen der Teilnehmer sowie einem Follow-Up Teil mit sämtlichen Konsultationen mit gemessener Körpertemperatur oder der anamnestischen Angabe einer Fieberepisode im Zeitraum der vorangegangenen 24 Stunden und dem Ergebnis dicken Tropfens, sofern dieser angefertigt wurde. Dieser zweite Teil des Datensatzes wurde entsprechend den Anforderungen der vorliegenden Arbeit auf jene Konsultationen beschnitten, bei denen bei den Studienteilnehmern eine Körpertemperatur von  $> 37,5^{\circ}\text{C}$  gemessen oder in der Anamnese Fieber angegeben wurde.

#### **2.3.4 Definition der Saisonalität**

In der vorliegenden Arbeit wird die Inzidenzdichte klinischer Malaria in Abhängigkeit von saisonalen klimatischen Schwankungen errechnet. Sie wird separat für die Expositionsmonate der Trockenzeit sowie die Expositionsmonate

der Regenzeit bestimmt. In vergangenen Veröffentlichungen gab es keine einheitliche Vorgehensweise, in welchem Zeitraum die Trocken- bzw. die Regenzeit zu definieren ist.<sup>[15]</sup> Daher werden in der vorliegenden Arbeit die Regen- bzw. Trockenzeiten anhand aktueller Klimadaten definiert.

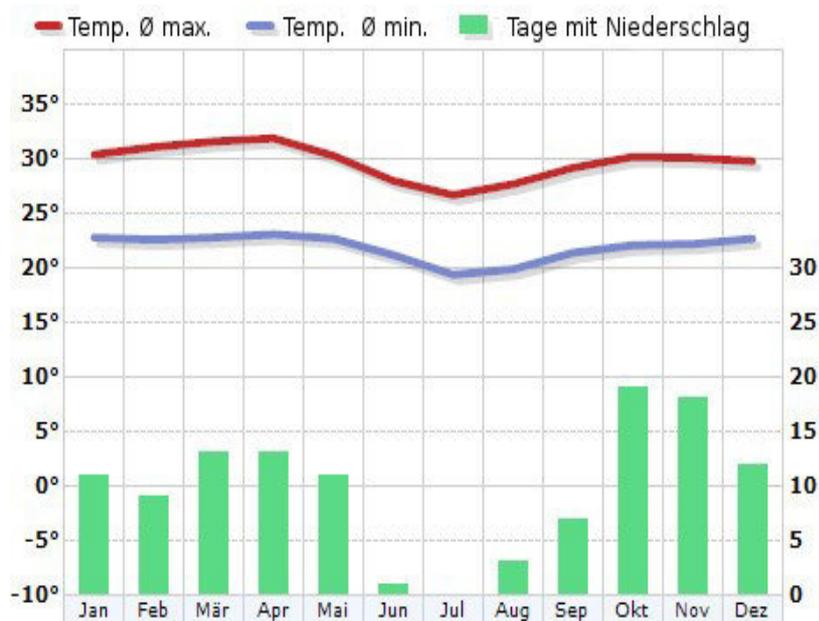


Abbildung 2: Klimadiagramm Lambaréné<sup>[11]</sup>

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die aus dem Klimadiagramm abgeleiteten Datumsgrenzen der Saisonintervalle:

**Tabelle 3:** Datumsgrenzen der Saisonintervalle (\* im Schaltjahr 2008)

Klimaperiode	Datumsgrenzen	Dauer (Tage)
Kurze Regenzeit	01.10. - 14.12.	75
Kurze Trockenzeit	15.12. - 31.01.	48
Lange Regenzeit	01.02. - 31.05.	120/121*
Lange Trockenzeit	01.06. - 30.09.	122

Für die einzelnen Studien ergeben sich daraus folgende Saisonintervalle:

**Tabelle 4:** Saisonintervalle der einzelnen Studien

**GMZ2\_BL**

<b>Saisonabschnitt</b>	<b>Jahr</b>	<b>Datumsgrenzen</b>
Kurze Trockenzeit	2009	15.12.2009 – 31.01.2010
Lange Regenzeit	2010	01.02.2010 – 31.05.2010
Lange Trockenzeit	2010	01.06.2010 – 30.09.2010
Kurze Regenzeit	2010	01.10.2010 – 14.12.2010
Kurze Trockenzeit	2010	15.12.2010 – 31.01.2011
Lange Regenzeit	2011	01.02.2011 – 31.05.2011

**GMZ2\_4**

<b>Saisonabschnitt</b>	<b>Jahr</b>	<b>Datumsgrenzen</b>
Kurze Regenzeit	2010	01.10.2010 – 14.12.2010
Kurze Trockenzeit	2010	15.12.2010 – 31.01.2011
Lange Regenzeit	2011	01.02.2011 – 31.05.2011
Lange Trockenzeit	2011	01.06.2011 – 30.09.2011

**MAL\_050**

<b>Saisonabschnitt</b>	<b>Jahr</b>	<b>Datumsgrenzen</b>
Lange Regenzeit	2007	01.02.2007 – 31.05.2007
Lange Trockenzeit	2007	01.06.2007 – 30.09.2007
Kurze Regenzeit	2007	01.10.2007 – 14.12.2007
Kurze Trockenzeit	2007	15.12.2007 – 31.01.2008
Lange Regenzeit	2008	01.02.2008 – 31.05.2008
Lange Trockenzeit	2008	01.06.2008 – 30.09.2008
Kurze Regenzeit	2008	01.10.2008 – 14.12.2008
Kurze Trockenzeit	2008	15.12.2008 – 31.01.2009
Lange Regenzeit	2009	01.02.2009 – 31.05.2009
Lange Trockenzeit	2009	01.06.2009 – 30.09.2009

### 2.3.5 Ermittlung der Inzidenzdichte

Die in den jeweiligen Studien eingeschlossenen Teilnehmer wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Studien aufgenommen und unterschiedlich lange nachverfolgt. Sie bilden daher dynamische Populationen hoher Fluktuationen mit unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen unter Risiko, an Malaria zu erkranken in Bezug auf die Gesamtdauer und den Anteil des jeweiligen Nachverfolgungszeitraumes an der Regen- bzw. Trockenzeit. Daher wird für die einzelnen Studienzeiträume die Gesamtpersonenzeit PZ ermittelt, die sich aus der Summe der individuellen Beobachtungszeiträume der einzelnen Studienteilnehmer innerhalb der jeweiligen Studie zusammensetzt.

$$PZ = \sum_{i=1}^N t(i)$$

$t(i)$  = Zeitraum, in der sich das Individuum  $i$  im Bezugszeitraum befand

$N$  = Gesamtzahl der Individuen innerhalb des Bezugszeitraumes

$PZ$  = Summe der Zeiträume  $t$  aller  $N$  Personen innerhalb des Bezugszeitraumes

Ermittelt wird die Inzidenzdichte ID als die Erkrankungsfälle pro Jahr Personenzeit, wobei Mehrfacherkrankungen eines Individuums innerhalb des Nachverfolgungszeitraumes als neue Erkrankungen gewertet und bei der Analyse berücksichtigt werden. Die Inzidenzdichte errechnet sich wie folgt:

$$ID = \frac{n}{PZ}$$

ID = Inzidenzdichte

$n$  = Anzahl der Erkrankungsfälle (incl. Mehrfacherkrankungen eines Individuums) innerhalb des Bezugszeitraumes

$PZ$  = Gesamtpersonenzeit innerhalb des Bezugszeitraumes

### 2.3.6 Berechnung des Inzidenzdichteverhältnisses

Zur Objektivierung der Unterschiede der Inzidenzdichte von Malaria innerhalb zweier zu vergleichender Populationen wird deren Inzidenzdichteverhältnis berechnet. Dieses ergibt sich aus dem Quotienten der Inzidenzdichte einer Population A geteilt durch die Inzidenzdichte einer Population B:

$$IDV = \frac{ID(A)}{ID(B)}$$

Es ist als relative Rate der Inzidenzdichte der Population A an der Inzidenzdichte der Population B eine dimensionslose Größe. Die Population B ist dabei die Referenzpopulation.

### 2.3.7 Methodik der Überlebenszeitanalysen

Von den analysierten Studien werden Überlebenszeitdaten erstellt. Das interessierende Ereignis ist dabei die Ersterkrankung eines Studienteilnehmers an klinischer Malaria innerhalb seines Nachbeobachtungszeitraumes. Teilnehmer, die nicht an Malaria erkranken, gelten zum Zeitpunkt ihrer letzten Studienvisite als zensiert. Aus den ermittelten Überlebenszeitdaten wird in den Kaplan-Meier-Kurven der jeweiligen Studien die Überlebenswahrscheinlichkeit über den Zeitverlauf der Studien dargestellt, welche der Nichterkrankungswahrscheinlichkeit an Malaria entspricht.

Die Hazardfunktion beschreibt die Wahrscheinlichkeit für eine Person, innerhalb eines definierten Zeitintervalls das Zielereignis zu erfahren und ist wie folgt definiert:

$$h(T) = \frac{\text{Anzahl Personen mit Zielereignis innerhalb des bei } T \text{ beginnendem Intervalls}}{(\text{Anzahl der Personen, die bis } T \text{ überleben}) * \text{Intervallbreite}}$$

Daraus ergibt sich die Hazard Ratio als

$$\mathbf{HR} = \frac{hA(T)}{hB(T)} = \text{konstant}$$

mit

$hA(T)$  = Hazardfunktion der Population A und

$hB(T)$  = Hazardfunktion der Population B,

wobei die Population B die Referenzpopulation darstellt. Bei der Errechnung der Hazard Ratios werden im Cox-Regressionsmodell alle weiteren potentiell das Zielereignis beeinflussenden Variablen zum Modell hinzugefügt, wodurch eine präzise Interpretation der Rolle dieser Einflussgröße auf das Eintreten des zu untersuchenden Zielereignisses ermöglicht wird. Voraussetzung ist, dass der Einfluss der Variablen auf die Überlebensrate über die Zeit konstant bleibt.

Bei den vorliegenden Studien ist das Geschlecht der Teilnehmer der einzige Einflussfaktor, welcher einer Subgruppenanalyse durch Ermittlung kontinuierliche Überlebenszeitdaten zugänglich ist.

### **2.3.8 Verwendete Programme**

Alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten wurden mit dem Statistikprogramm *R* Version 3.1.1 ausgewertet. Die deskriptive Analyse der Parasitämien, die Berechnung der Inzidenzdichte sowie des Inzidenzdichteverhältnisses erfolgte unter Zuhilfenahme des Paketes *epiR*, die Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven erfolgte unter Verwendung der OpenSource-Funktion *ggkm* von Matt Cooper auf Basis der Pakete *ggplot2* und *survival*. Die Cox-Regressionsanalysen wurden mit der Funktion *coxph* des Paketes *survival* durchgeführt.<sup>[40],[41]</sup>

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Kohorte und Beobachtungszeitraum der analysierten Studien**

##### **3.1.1 GMZ2\_BL**

Die letzte Studienvisite fand am 19.02.2011 statt, die Gesamtdauer der Studie betrug damit 1,1 Jahre. Das Alter der eingeschlossenen Kinder zum Zeitpunkt des Screenings betrug 1-5 Jahre bei einem arithmetischen Mittel von 2,9 Jahren. Die Nachverfolgungszeit der einzelnen Teilnehmer errechnet sich aus dem Zeitraum vom Tag der Screeninguntersuchung bis zum Tag der letzten durchgeführten Konsultation des Studienteilnehmers am CERMEL oder (im Falle der ACD) in dessen häuslichen Umfeld und betrug im Mittel 132 Tage. Die Summe der Nachbeobachtungszeiträume aller Teilnehmer ergibt eine Gesamtpersonenzeit PZ von 221 Jahren.

##### **3.1.2 GMZ2\_4**

Die letzte in dieser Arbeit erfasste Studienvisite fand am 08.09.2011 statt, allerdings wurde als Tag des Endes der Nachverfolgung eines jeden Teilnehmers jener Tag angenommen, an welchem das jeweilige Dossier durchgesehen wurde. Daraus ergibt sich zwischen dem Tag der ersten Teilnehmerrekrutierung und dem Tag der Durchsicht des letztes Dossiers eine erfasste Studiendauer von 0,9 Jahren. Zum Zeitpunkt des Screenings betrug das Altersminimum ein Jahr und das Altersmaximum 5 Jahre bei einem arithmetischen Mittel von 3,0 Jahren. Die Nachverfolgungszeit der einzelnen Teilnehmer betrug im Mittel 165 Tage, die Summe der Nachbeobachtungszeiträume aller Teilnehmer ergibt eine Gesamtpersonenzeit PZ von 210 Jahren.

### 3.1.3 MAL\_050

Die letzte in der Datenbank vorhandene Studienvisite ist auf den 07.08.2009 datiert, woraus sich eine Gesamtstudiendauer von 2,3 Jahren ergibt. Das Alter der eingeschlossenen Kinder zum Zeitpunkt des Screenings lag zwischen 1,7 und 9,4 Wochen bei einem arithmetischen Mittel von 5,9 Wochen. Die Nachverfolgungszeit der einzelnen Teilnehmer ergibt sich aus dem Zeitraum vom Tag der Screeninguntersuchung bis zum letzten in der Datenbank registrierten Tag einer Studienvisite und lag im Mittel bei 476 Tagen. Die Summe der Nachbeobachtungszeiträume aller Teilnehmer ergibt eine Gesamtpersonenzeit PZ von 287 Jahren.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Kohorte und den Beobachtungszeitraum der analysierten Studien:

**Tabelle 5:** Kohorte und Beobachtungszeitraum der analysierten Studien

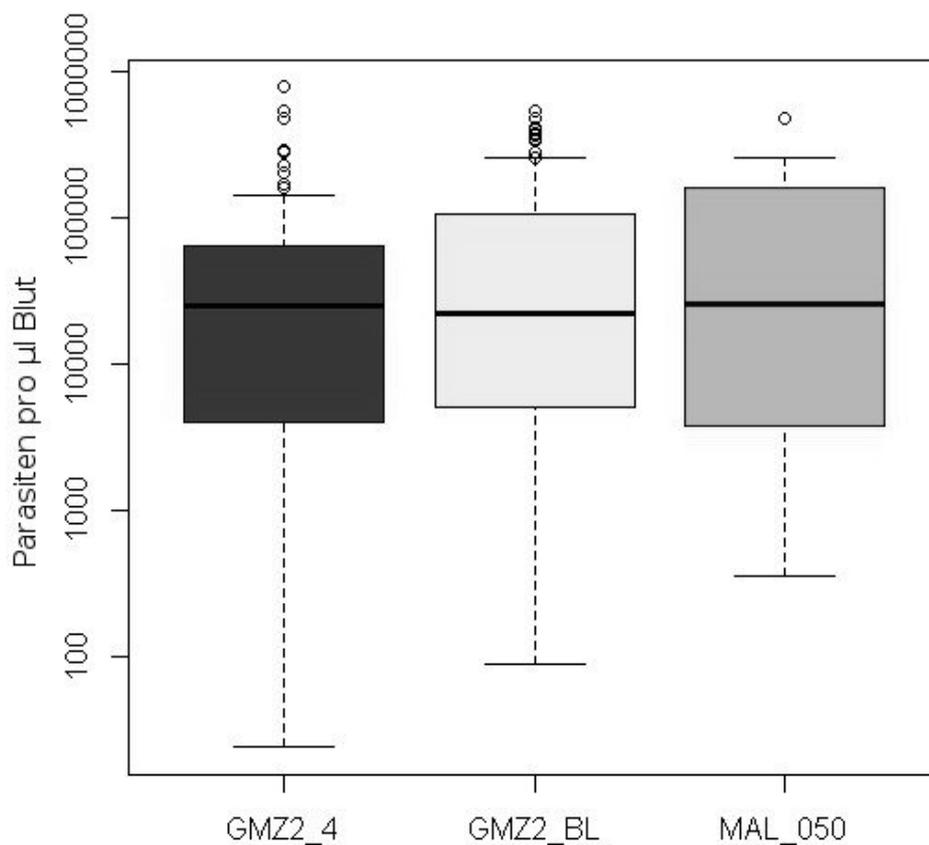
		<b>GMZ2_BL</b>	<b>GMZ2_4</b>	<b>MAL_050</b>
<b>N</b>		610	463	220
<b>weiblich</b>		313 (51%)	208 (45%)	110 (50%)
Alter beim Screening (Jahre)	Intervall	1,0 – 5,0	1,0 – 5,0	
	Mittel (StdA)	2,9 (1,1)	3,0 (1,2)	
Alter beim Screening (Wochen)	Intervall			1,7 – 9,4
	Mittel (StdA)			5,9 (1,0)
<b>Studiendauer (Jahre)</b>		1,1	0,9	2,3
<b>Mittlere Beobachtungszeit (Tage)</b>		132	165	476
<b>Personenzeit (Jahre)</b>		221	210	287

### 3.2 Fallzahlen und Parasitämien klinischer Malaria mit *P. falciparum*

In die Analyse der Fallzahlen und Parasitämien fließen ausschließlich die Daten der Falldefinition 2 ein. Diese sind in Tabelle 6 und Abbildung 3 dargestellt.

**Tabelle 6:** Malaria Fallzahlen

Studie	Fälle absolut		Parasiten / $\mu\text{l}$ Blut (FD 2)					
	FD 1	FD 2	min	max	Q 25 %	Q 50 %	Q 75 %	IQA
<b>GMZ_BL</b>	106	141	90	539600	5032	22270	105285	100253
<b>GMZ2_4</b>	103	144	24	774774	4007	24760	63281	59274
<b>MAL_50</b>	9	13	353	477096	3812	25456	160916	157104



**Abbildung 3:** Parasitämien (logarithmische Skala)

Die Parasitenzahlen pro  $\mu\text{l}$  Blut zeigen eine sehr heterogenes Verteilungsmuster. GMZ2\_4 hat den geringsten IQA bei allerdings sehr hohen Einzelwerten, während die Werte bei MAL\_050 bei einem großen IQA insgesamt stärker streuen, aber weniger extreme Werte erreichen. Dies ist aber auf die insgesamt niedrige Fallzahl zurückzuführen. Insgesamt lassen sich zwischen den Studien keine Trends bezüglich Gemeinsamkeiten oder Unterschiede innerhalb der Parasitämien erkennen.

### 3.3 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse klinischer Malaria

#### 3.3.1 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse zwischen den Studien

Die Inzidenzdichte klinischer Malaria für die einzelnen Studien sowie das Inzidenzdichteverhältnis zwischen den Studien nach der jeweiligen Falldefinition sind in den Tabelle 7 und 8 dargestellt. Zur Ermittlung der Inzidenzdichteverhältnisse wurde die Population der Studie GMZ2\_BL als Referenz definiert.

**Tabelle 7:** Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnis, Falldefinition 1

Studie	Inzidenzdichte (95% KI)	Inzidenzdichteverhältnis (95% KI)	p-Wert IDV
GMZ2_BL	0,48 (0,40 – 0,58)	Referenz	Referenz
GMZ2_4	0,49 (0,40 – 0,59)	1,02 (0,77 - 1,35)	0,89
MAL_050	0,03 (0,02 – 0,06)	0,07 (0,03 – 0,13)	< 0,001

**Tabelle 8:** Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnis, Falldefinition 2

Studie	Inzidenzdichte (95% KI)	Inzidenzdichteverhältnis (95% KI)	p-Wert IDV
GMZ2_BL	0,64 (0,54 – 0,75)	Referenz	Referenz
GMZ2_4	0,69 (0,58 – 0,81)	1,07 (0,85 – 1,37)	0,64
MAL_050	0,05 (0,03 – 0,08)	0,07 (0,04 – 0,13)	< 0,001

Die Inzidenzdichte innerhalb der GMZ2\_BL-Population ist mit 0,48 Fällen pro Jahr Personenzeit (bzw. 0,64 nach FD 2) vergleichbar mit der von GMZ2\_4 (0,49 nach FD 1 bzw. 0,69 nach FD 2). In der Population von MAL\_050 ist sie dagegen mit 0,03 Fällen pro Jahr Personenzeit (bzw. 0,05 nach FD 2) sehr viel geringer.

Bezogen auf die Inzidenzdichte von GMZ2\_BL zeigt die Population von GMZ2\_4 ein um 2 % erhöhtes Malariaaufkommen in FD 1 und ein um 7 % erhöhtes Malariaaufkommen in FD 2. Dagegen sind die Fallzahlen in der MAL\_050 Population um 93 % (FD 1 und FD 2) geringer.

### 3.3.2 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse nach Saison

Die Inzidenzdichte der einzelnen Saisonintervalle innerhalb der Nachbeobachtungszeit der analysierten Studien sind in Tabelle 9 gelistet.

**Tabelle 9:** Inzidenzdichte der einzelnen Saisonintervalle der analysierten Studien

<b>GMZ2_BL</b>					
<b>Saisonabschnitt</b>	<b>PZ (a)</b>	<b>Fälle FD 1</b>	<b>Fälle FD 2</b>	<b>ID FD 1 (95% KI)</b>	<b>ID FD 2 (95% KI)</b>
<b>Kurze TZ 2009</b>	5	0	0	0 (0,00 – 0,74)	0 (0,00 – 0,74)
<b>Lange RZ 2010</b>	101	49	73	0,48 (0,37 – 0,64)	0,72 (0,58 – 0,91)
<b>Lange TZ 2010</b>	109	41	51	0,38 (0,28 – 0,51)	0,47 (0,36 – 0,62)
<b>Kurze RZ 2010</b>	5	16	17	3,20 (1,98 – 5,20)	3,40 (2,13 – 5,44)
<b>Kurze TZ 2010</b>	0,13	0	0	0 (0,00 – 28,38)	0 (0,00 – 28,38)
<b>Lange RZ 2011</b>	0,05	0	0	0 (0,00 – 73,78)	0 (0,00 – 73,78)
<b>RZ gesamt</b>	106	65	90	0,61 (0,48 – 0,78)	0,85 (0,69 – 1,04)
<b>TZ gesamt</b>	114	41	51	0,36 (0,27 – 0,49)	0,45 (0,34 – 0,59)
<b>GMZ2_BL</b>	221	106	141	0,48 (0,40 – 0,58)	0,64 (0,54 – 0,75)

Tabelle 9 (Fortsetzung)

<b>GMZ2_4</b>					
<b>Saisonabschnitt</b>	<b>PZ (a)</b>	<b>Fälle FD 1</b>	<b>Fälle FD 2</b>	<b>ID FD 1 (95% KI)</b>	<b>ID FD 2 (95% KI)</b>
<b>Kurze RZ 2010</b>	12	8	10	0,67 (0,34 – 1,31)	0,83 (0,46 – 1,53)
<b>Kurze TZ 2010</b>	23	27	36	1,17 (0,81 – 1,71)	1,57 (1,13 – 2,17)
<b>Lange RZ 2011</b>	128	55	76	0,43 (0,33 – 0,56)	0,59 (0,47 – 0,74)
<b>Lange TZ 2011</b>	46	13	22	0,28 (0,17 – 0,48)	0,48 (0,32 – 0,72)
<b>RZ gesamt</b>	140	63	86	0,45 (0,35 – 0,58)	0,61 (0,50 – 0,76)
<b>TZ gesamt</b>	69	40	58	0,58 (0,43 – 0,79)	0,84 (0,65 – 1,09)
<b>GMZ2_4</b>	210	103	144	0,49 (0,40 – 0,59)	0,69 (0,58 – 0,81)

<b>MAL_050</b>					
<b>Saisonabschnitt</b>	<b>PZ (a)</b>	<b>Fälle FD 1</b>	<b>Fälle FD 2</b>	<b>ID FD 1 (95% KI)</b>	<b>ID FD 2 (95% KI)</b>
<b>Lange RZ 2007</b>	0,91	0	0	0 (0,00 – 4,05)	0 (0,00 – 4,05)
<b>Lange TZ 2007</b>	28	0	0	0 (0,00 – 0,13)	0 (0,00 – 0,13)
<b>Kurze RZ 2007</b>	32	0	0	0 (0,00 – 0,12)	0 (0,00 – 0,12)
<b>Kurze TZ 2007</b>	26	0	0	0 (0,00 – 0,14)	0 (0,00 – 0,14)
<b>Lange RZ 2008</b>	65	1	3	0,02 (0,00 – 0,09)	0,05 (0,02 – 0,13)
<b>Lange TZ 2008</b>	61	3	5	0,05 (0,02 – 0,14)	0,08 (0,04 – 0,19)
<b>Kurze RZ 2008</b>	34	4	4	0,12 (0,05 – 0,30)	0,12 (0,05 – 0,30)
<b>Kurze TZ 2008</b>	16	0	0	0 (0,00 – 0,23)	0 (0,00 – 0,23)
<b>Lange RZ 2009</b>	21	1	1	0,05 (0,01 – 0,27)	0,05 (0,01 – 0,27)
<b>Lange TZ 2009</b>	2	0	0	0 (0,00 – 1,84)	0 (0,00 – 1,84)
<b>RZ gesamt</b>	154	6	8	0,04 (0,02 – 0,08)	0,05 (0,03 – 0,10)
<b>TZ gesamt</b>	133	3	5	0,02 (0,01 – 0,07)	0,04 (0,02 – 0,09)
<b>MAL_050</b>	287	9	13	0,03 (0,02 – 0,06)	0,05 (0,03 – 0,08)

Während in den Populationen von GMZ2\_BL und MAL\_050 die Inzidenzdichte klinischer Malaria in der Regenzeit über der globalen Inzidenzdichte der Studien und über jener der Trockenzeit liegt, ist die Malariarate über den analysierten Studienverlauf von GMZ2\_4 in der Trockenzeit höher als in der Studie

insgesamt. Bei der Analyse der Einzelintervalle ist studienübergreifend ein leichter Trend zu erkennen, dass das Malariaaufkommen in der Trockenzeit geringer ist als in der Regenzeit: Betrachtet man die Inzidenzdichte jener Intervalle mit einer Personenzzeit von > 10 Jahren nach FD 1, ist in drei Regenzeitintervallen die Inzidenzdichte höher als in der dazugehörigen Studie insgesamt, in drei Regenzeitintervallen ist sie niedriger, in einem entspricht sie der Inzidenzdichte der Studie. Dem gegenüber ist sie in zwei Trockenzeitintervallen höher als in der dazugehörigen Studie, in fünf Trockenzeitintervallen jedoch geringer.

Ein klarer Trend jedoch lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht ableiten, sie sind geprägt von Ausreißerintervallen. So traten in der kurzen Regenzeit 2010 innerhalb GMZ2\_BL (ID = 3,20 nach FD 1), der kurzen Trockenzeit 2010 innerhalb GMZ2\_4 (ID = 1,17 nach FD 1) sowie der kurzen Regenzeit 2008 innerhalb MAL\_050 (ID = 0,12 nach FD 1) verhältnismäßig viele Malariafälle auf, welche einen starken Einfluss auf den studieninternen Trend haben, allerdings nur durch saisonale Schwankungen nicht zu erklären sind.

Einen Überblick über das Inzidenzdichteverhältnis zwischen Regen- und Trockenzeit der jeweiligen Studien gibt Tabelle 10.

**Tabelle 10:** Inzidenzdichteverhältnis klinischer Malaria nach Saison

Studie	Saison	Inzidenzdichteverhältnis (95 % KI)	
		Falldefinition 1	Falldefinition 2
GMZ2_BL	Regenzeit	Referenz	Referenz
	Trockenzeit	0,59 (0,39 – 0,88)	0,53 (0,37 - 0,75)
GMZ2_4	Regenzeit	Referenz	Referenz
	Trockenzeit	1,29 (0,84 – 1,94)	1,37 (0,96 – 1,93)
MAL_050	Regenzeit	Referenz	Referenz
	Trockenzeit	0,58 (0,09 – 2,71)	0,72 (0,19 – 2,51)

Die absoluten Zahlen zur Inzidenzdichte spiegeln sich in denen der Inzidenzdichteverhältnisse wider. Innerhalb GMZ2\_BL ist das Malariaaufkommen in der Trockenzeit nach FD 1 um 41 % (47 % nach FD 2) geringer als in der Regenzeit, während es in der GMZ2\_4-Population in der Trockenzeit nach FD 1 um 29 % (37 % nach FD 2) über dem Regenzeitniveau liegt. Innerhalb MAL\_050 wiederum ist die Erkrankungsrate in der Trockenzeit nach FD 1 um 42 % (28 % nach FD 2) geringer als in der Regenzeit.

### 3.3.3 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnisse nach Geschlecht

Tabelle 11 gibt einen nach Geschlechterzugehörigkeit differenzierten Überblick über die Inzidenzdichte innerhalb der einzelnen Studien.

**Tabelle 11:** Geschlechtsspezifische Inzidenzdichte klinischer Malaria

Geschlecht	PZ (a)	Fälle		Inzidenzdichte (95 % KI)	
		FD 1	FD 2	FD 1	FD 2
<b>GMZ2_BL</b>					
<b>m</b>	113	47	75	0,42 (0,31 – 0,55)	0,66 (0,53 – 0,83)
<b>w</b>	108	59	66	0,55 (0,42 – 0,70)	0,61 (0,48 – 0,78)
<b>gesamt</b>	221	106	141	0,48 (0,40 – 0,58)	0,64 (0,54 – 0,75)
<b>GMZ2_4</b>					
<b>m</b>	117	63	84	0,54 (0,42 – 0,69)	0,72 (0,58 – 0,89)
<b>w</b>	93	40	60	0,43 (0,32 – 0,59)	0,65 (0,50 – 0,83)
<b>gesamt</b>	210	103	144	0,49 (0,40 – 0,59)	0,69 (0,58 – 0,81)
<b>MAL_050</b>					
<b>m</b>	142	4	6	0,03 (0,01 – 0,07)	0,04 (0,02 – 0,09)
<b>w</b>	145	5	7	0,03 (0,02 – 0,08)	0,05 (0,02 – 0,10)
<b>gesamt</b>	287	9	13	0,03 (0,02 – 0,06)	0,05 (0,03 – 0,08)

Die geschlechtsspezifische Inzidenzdichte streut in allen Studien inhomogen um den Globalwert. Während bei GMZ2\_BL nach FD 1 geringfügig mehr Mädchen von Malaria betroffen sind, sind es nach FD 2 etwas mehr Jungen. In

der Population von GMZ2\_4 sind nach beiden Falldefinitionen mehr Jungen erkrankt. Die Zahlen zur geschlechtsspezifischen Inzidenzdichte der MAL\_050 Kohorte sowie die dazugehörigen Konfidenzintervalle legen nahe, dass in dieser Population beide Geschlechter nahezu gleich von Malaria betroffen sind.

Das Inzidenzdichteverhältnis zwischen den Geschlechtern innerhalb der einzelnen Studien ist in Tabelle 12 dargestellt.

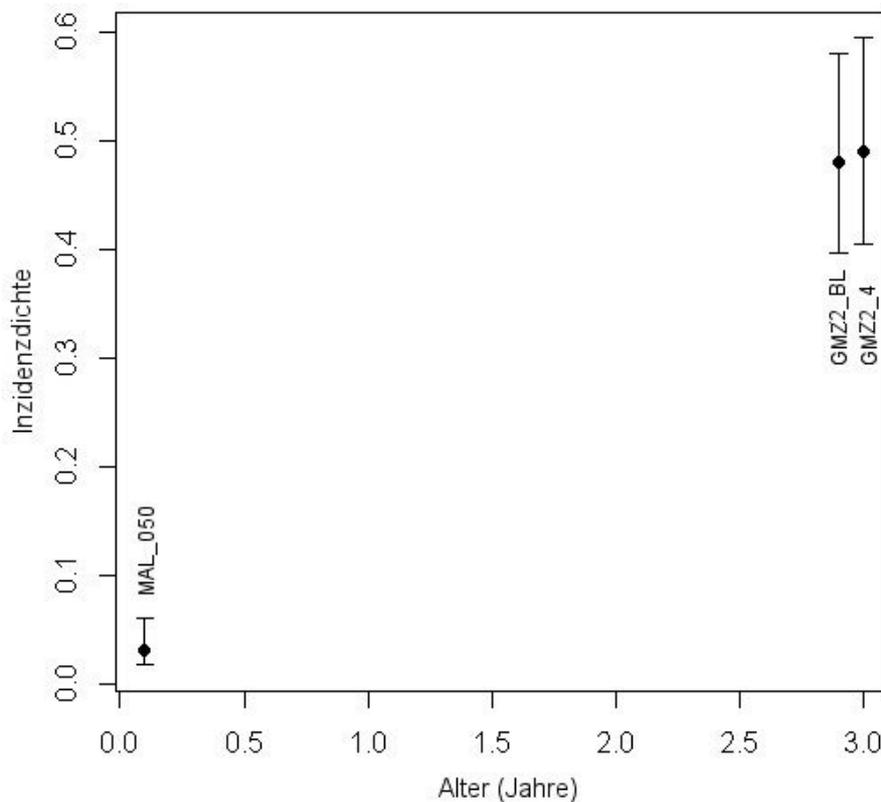
**Tabelle 12:** Inzidenzdichteverhältnis klinischer Malaria nach Geschlecht

	Geschlecht	Inzidenzdichteverhältnis (95 % KI)	
		Falldefinition 1	Falldefinition 2
GMZ2_BL	männlich	Referenz	Referenz
	weiblich	1,31 (0,88 – 1,97)	0,92 (0,65 – 1,3)
GMZ2_4	männlich	Referenz	Referenz
	weiblich	0,8 (0,52 – 1,21)	0,9 (0,63 – 1,27)
MAL_050	männlich	Referenz	Referenz
	weiblich	1,22 (0,26 – 6,17)	1,14 (0,33 – 4,12)

Innerhalb der GMZ2\_BL Kohorte sind nach FD 1 31 % mehr Mädchen als Jungen an Malaria erkrankt, nach FD 2 sind es 8 % mehr Jungen als Mädchen. In der Population von GMZ2\_4 sind in beiden Falldefinitionen mehr Jungen betroffen: 20 % nach FD1 und 10 % nach FD 2. Dagegen ist das Malariaaufkommen in der weiblichen Subkohorte bei MAL\_050 nach FD 1 um 22 % höher (14 % nach FD 2). Allerdings liegen die ermittelten Werte in einem sehr großen Unsicherheitsbereich, die Konfidenzintervalle schließen immer auch die gegenteiligen Aussagen ein. Studienübergreifend lässt sich kein Trend ableiten, dass ein Geschlecht anfälliger für die Erkrankung an Malaria ist.

### 3.3.4 Inzidenzdichte in Abhängigkeit vom Alter

Die analysierten Studien wurden zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Die Einschlusskriterien für das Alter sind dabei innerhalb der GMZ2-Studien deckungsgleich und unterscheiden sich stark von denen der MAL\_050-Population. Es ergibt sich eine analysierte Gesamtkohorte in zwei Altersgruppen im Säuglings und Kleinkindalter, die einer statistischen Auswertung nicht näher zugänglich ist. In Abbildung 4 ist die ermittelte Inzidenzdichte gegenüber dem mittleren Alter der Studienkohorten dargestellt.



**Abbildung 4:** Inzidenzdichte in Abhängigkeit vom Alter

Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang, wobei die nahezu identische Altersstruktur der GMZ2-Kohorten zu nahezu identischen Werten in der Inzidenzdichte führt, während das viel geringere Durchschnittsalter der MAL\_050-Kohorte mit einer sehr viel geringeren Inzidenzdichte einhergeht.

### 3.3.5 Inzidenzdichte und Inzidenzdichteverhältnis der MAL\_050

#### Subpopulationen

Um einen potentiellen Effekt einer Intervention in Form einer Malaria-Kandidatenvakzine auf die Inzidenzdichte zu ermitteln, ist es notwendig, die Teilinzidenzen der Interventionssubpopulation und die der Kontrollpopulation zu ermitteln. Dies ist bei noch laufender GMZ2\_4 Studie und fehlender Intervention bei GMZ2\_BL nur für die MAL\_050-Kohorten möglich. Dabei werden die beiden Interventionsarme zu einer gemeinsamen Teilpopulation zusammengefasst. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13:** Inzidenzdichte der geimpften und nichtgeimpften Teilkohorte MAL\_050

Subkohorte	PZ (a)	Fälle		Inzidenzdichte (95% KI)	
		FD 1	FD 2	Falldefinition 1	Falldefinition 2
VAC (+)	194	4	6	0,02 (0,01 – 0,05)	0,03 (0,01 – 0,07)
VAC (-)	92	5	7	0,05 (0,02 – 0,13)	0,08 (0,04 – 0,16)

Einen Überblick über das Inzidenzdichteverhältnis zwischen der Kontrollgruppe und den gepoolten Interventionsgruppen von Mal\_050 gibt Tabelle 14:

**Tabelle 14:** Inzidenzdichteverhältnis der geimpften und nichtgeimpften Teilkohorte MAL\_050

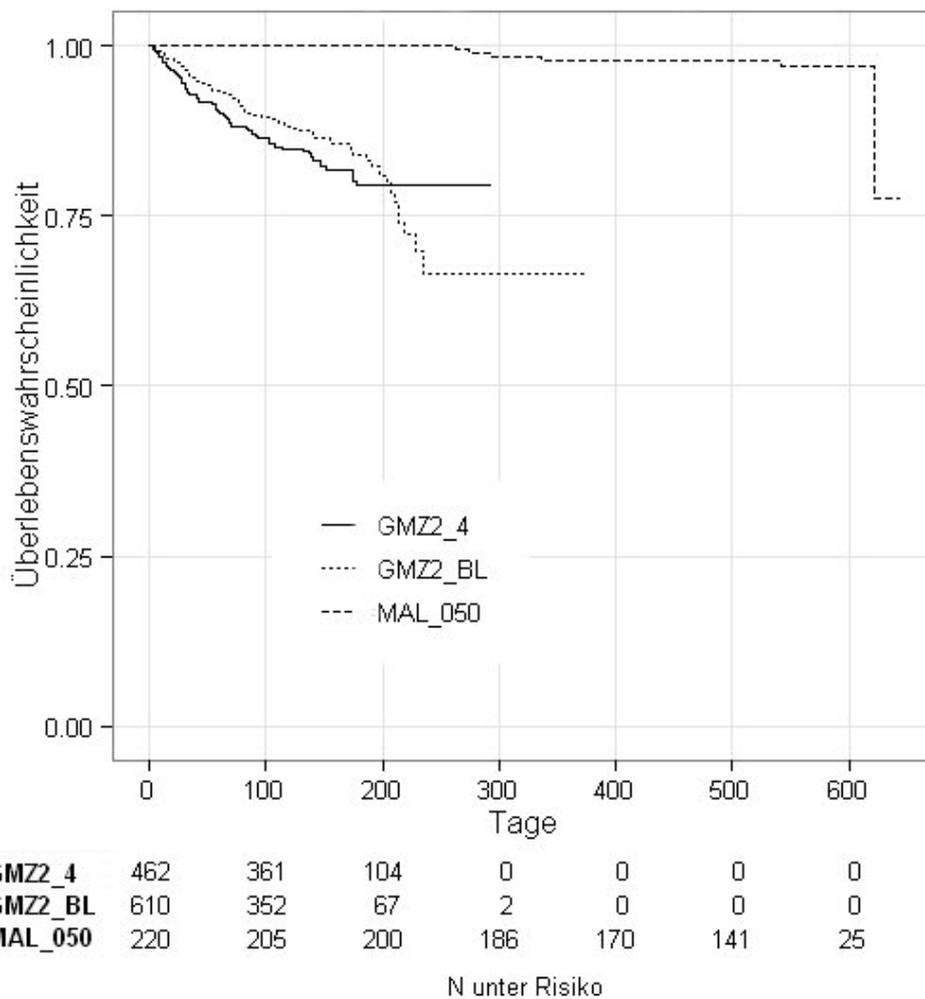
Subkohorte	IDV FD 1 (95% KI)	IDV FD 2 (95% KI)
VAC (+)		Referenz
VAC (-)	2,64 (0,57 – 13,28)	2,46 (0,71 – 8,86)

Es zeigt sich, dass die nichtgeimpfte Kontrollpopulation in beiden Falldefinitionen eine wesentlich höhere Inzidenzdichte aufweist. Bildet man das Verhältnis, so liegt sie bei mehr als dem doppelten der Referenzpopulation geimpfter Studienteilnehmer.

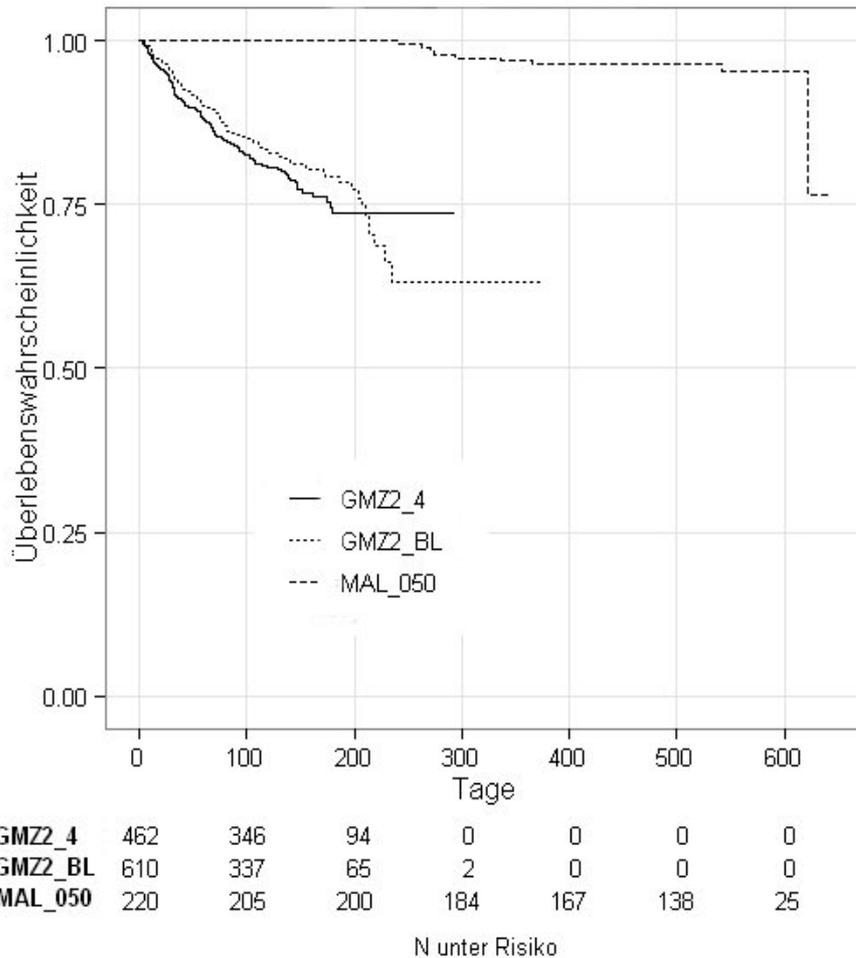
### 3.4 Survivalanalysen

#### 3.4.1 Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen Studien

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Überlebenszeitkurven der analysierten Studien, wenn die Ersterkrankung an klinischer Malaria der jeweiligen Falldefinition als das interessierende Ereignis angesehen wird. Studienteilnehmer, welche zum Ende ihrer Nachbeobachtungszeit nicht an Malaria erkrankt sind, gelten als zensiert.



**Abbildung 5:** Überlebenszeitkurven Falldefinition 1



**Abbildung 6:** Überlebenszeitkurven Falldefinition 2

Beide Grafiken zeigen ein ähnliches Bild: Die Kurven der Studien GMZ2\_BL und GMZ2\_4 verlaufen anfangs bei hohen N-Werten und folglich guter Wiedergabe der Realität fast deckungsgleich in den Graphen beider Falldefinitionen.

Die Kurve der Studie MAL\_050 verläuft in beiden Graphen erwartungsgemäß sehr viel flacher als jene der GMZ2-Studien. Hier spiegeln sich die sehr viel niedrigeren Fallzahlen klinischer Malaria in einem guten Langzeitüberleben wider. Der Knick am Ende der beiden MAL\_050-Kurven ist durch ein noch spät eingetretenes Einzelereignis bei einer sehr geringen Restpopulation unter Risiko zu erklären, das Konfidenzintervall unter Annahme der Falldefinition 1

vergrößert sich von Nachbeobachtungstag 541 mit N = 112 (95 % KI = 0,944 – 0,997) zum Nachbeobachtungstag 622 mit N = 5 ( 95 % KI = 0,5 – 1,0) erheblich.

### 3.4.2 Cox-Regressionsanalysen

Die Cox-Regression erlaubt eine nähere Analyse des Einflussfaktors Studienzugehörigkeit unter Berücksichtigung des Co-Faktors Geschlecht sowie eine nähere Analyse des Einflussfaktors Geschlecht unter Berücksichtigung des Co-Faktors Studienzugehörigkeit auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Tabellen 15 und 16 geben einen Überblick über die entsprechenden Hazard Ratios.

**Tabelle 15:** Hazard Ratios, Einflussfaktor Studienzugehörigkeit

	Falldefinition 1		Falldefinition 2	
	HR (95 % KI)	p-Wert	HR (95 % KI)	p-Wert
<b>GMZ2_BL</b>	Referenz			
<b>GMZ2_4</b>	1,11 (0,81 – 1,52)	0,5	1,09 (0,82 – 1,43)	0,56
<b>MAL_50</b>	0,04 (0,01 – 0,12)	< 0,001	0,05 (0,02 – 0,13)	< 0,001

Im Vergleich zu GMZ2\_BL ergibt sich für die Studienteilnehmer von GMZ2\_BL unter Annahme der Falldefinition 1 ein um 11% erhöhtes Risiko, an Malaria zu erkranken (9 % unter FD 2), welches allerdings nicht signifikant ist. In der MAL\_50 Kohorte ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit um 96% (FD 1) bzw. 95 % (FD 2) signifikant geringer.

**Tabelle 16:** Hazard Ratios, Einflussfaktor Geschlecht

	Falldefinition 1		Falldefinition 2	
	HR (95 % KI)	p-Wert	HR (95 % KI)	p-Wert
<b>Männlich</b>	Referenz			
<b>Weiblich</b>	1,03 (0,76 – 1,4)	0,85	1,09 (0,70 – 1,2)	0,53

Unabhängig von der Studienzugehörigkeit ist das Risiko für Mädchen, innerhalb der analysierten Kohorten an Malaria zu erkranken um 3 % (FD 1) bzw. 9 % (FD 2) erhöht. Dieser Unterschied ist gering und erreicht keine statistische Signifikanz.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluss der Einzelfaktoren auf die Inzidenzdichte

#### 4.1.1 Geschlechtszugehörigkeit

Die geschlechterspezifische Inzidenzdichte zeigt zwischen den Studien und in der GMZ2\_BL-Kohorte sogar studienintern zwischen den beiden verschiedenen Falldefinitionen erhebliche Unterschiede ohne klare Tendenz, dass ein Geschlecht stärker von Malaria betroffen sein könnte. Klar wird dies bei Betrachtung des jeweiligen Inzidenzdichteverhältnisses. Innerhalb der MAL\_050-Kohorte sind etwas mehr Mädchen von Malaria betroffen, innerhalb der GMZ2\_4-Kohorte etwas mehr Jungen. In der GMZ2\_BL-Population sind es nach FD1 etwas mehr Mädchen, nach FD2 allerdings etwas mehr Jungen. Das Konfidenzintervall ist bei allen errechneten Inzidenzdichteverhältnissen sehr breit und schließt in allen Berechnungen sowohl Werte  $> 1$  als auch Werte  $< 1$  ein. Daraus lässt sich ableiten, dass die Geschlechtszugehörigkeit kein Risikofaktor für die Erkrankung an Malaria darstellt. Untermuert werden diese Ergebnisse durch die Cox-Regressionsanalyse. Hier zeigt sich bei ebenfalls sehr breiten Konfidenzintervallen ein minimal erhöhtes Auftreten der Malaria in der weiblichen Gesamtkohorte aller 3 Studien ohne statistische Signifikanz.

Diese Ergebnisse erscheinen zunächst plausibel. An keinem Punkt des Infektions- und Krankheitsverlaufes der Malaria finden sich eindeutige pathophysiologische Angriffspunkte, die eine erhöhte Vulnerabilität des männlichen oder des weiblichen Geschlechts für eine Erkrankung erklären könnten. Dennoch finden sich in vergangenen Veröffentlichungen divergierende Angaben zur erhöhten Suszeptibilität des männlichen Geschlechtes für Plasmodieninfektionen und/oder Malariaerkrankungen.<sup>[16], [17], [18], [19]</sup>

Interessanterweise widersprechen sich diese Aussagen nicht, da sich die Veröffentlichungen, welche keine geschlechterspezifischen Unterschiede

ausmachen können, auf Daten aus Kinderkohorten berufen.<sup>[18],[19]</sup> Jene Veröffentlichungen allerdings, welche eine erhöhte Anfälligkeit des männlichen Geschlechtes für Malariaerkrankungen beschreiben, stimmen in Ihren Analysen dahingehend überein, dass die Ursache für diesen Unterschied in postpubertären männlichen Subkohorten zu finden ist.<sup>[16],[17]</sup> Als Begründung dieses Effektes wird einerseits die Annahme herangezogen, dass heranwachsende Männer aufgrund ihrer gesellschaftlichen Rolle einer erhöhten Vektorexposition ausgesetzt sind<sup>[16]</sup>, andererseits ein Einfluss des ansteigenden Testosteronspiegels während der männlichen Pubertät diskutiert.<sup>[17], [20],[21]</sup> Diese Frage nach der Ursache sowie die Frage nach der Stärke der Ausprägung dieses Effektes auch in holoendemischen Gebieten bleibt Gegenstand weitergehender Forschung, die sich konkret der Beantwortung dieser Fragestellung widmet. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Annahme, dass es im Säuglings- und Kleinkindalter keine geschlechtsspezifisch erhöhte Suszeptibilität für Malariaerkrankungen gibt.

#### **4.1.2 Saisonalität**

Malaria tritt, abhängig von klimatischen Voraussetzungen, entweder ganzjährig mit kontinuierlich günstige Bedingungen für die Verbreitung, saisonal mit jährlich wiederkehrenden, zeitlich begrenzten Verbreitungszeiträumen oder epidemisch abhängig von unregelmäßigen Klimaveränderungen auf.<sup>[22]</sup> Für die Betrachtung saisonaler Schwankungen von Malariaerkrankungen analysiert man den zeitlichen Verlauf epidemiologische Maßzahlen abhängig von (mikro)klimatischen Einflussfaktoren. Untersuchte Messgrößen sind dabei üblicherweise die entomologische Inokulationsrate EIR, die Prävalenz von Parasitämien oder die Inzidenz als Maßzahl einer klinisch manifesten Malariaerkrankung, wobei eine eindeutige Korrelation zwischen den einzelnen Messgrößen angezweifelt werden muss.<sup>[15]</sup> Eine hohe Niederschlagsrate sowie hohe Temperaturen gehen mit einer erhöhten Malariainzidenz einher.<sup>[23]</sup>

Für Gabun gibt es bereits Veröffentlichungen zu potentiellen Einflüssen klimatischer Schwankungen auf das Malariaaufkommen. So analysieren Jäckle und Kollegen Risikofaktoren für eine Plasmodieninfektion für Schwangere in der Region Lambaréné. Unter anderem zeigt sich in dieser Arbeit trotz ganzjähriger Transmission ein zweigipfliger Jahresverlauf der Infektionsprävalenz mit deutlich höheren Fallzahlen in den Monaten der Regenzeit.<sup>[24]</sup>

Auch in der Arbeit von Wildling und Kollegen zeigen sich saisonale Schwankungen im Jahresverlauf in der Parasitenprävalenz. So treten Infektionen mit *P. falciparum* wesentlich häufiger im November als in den Vergleichsmonaten August und April auf.<sup>[25]</sup>

Die Analyse der in dieser Arbeit vorliegenden Daten vermag keinen eindeutigen Hinweis zu geben, dass die Malarianzidenz in den Monaten der Regenzeit höher ist. Zwar ist dies in den analysierten Teilintervallen von GMZ2\_BL und MAL\_050 durchaus der Fall (bei der Errechnung des Inzidenzdichteverhältnis innerhalb GMZ2\_BL sogar mit einem KI < 1 für beide Falldefinitionen), allerdings steht das Inzidenzdichteverhältnis von GMZ2\_4 einer eindeutigen Schlussfolgerung im Wege. Sehr hohe Fallzahlen bei vergleichsweise geringer Personenzeit im Teilintervall der kurzen Trockenzeit 2010 sorgen für dieses Teil- und Gesamtergebnis. Eine hinreichende Erklärung für dieses Ausreißerintervall kann durch die vorliegenden Daten nicht gegeben werden. Mögliche Ursachen sind eine für die Jahreszeit zumindest örtlich zu hohe Niederschlagsrate und/oder zu hohe Temperaturen mit konsekutiv vermehrter Transmission. Eine weitere Erklärung wäre, dass das vorliegende Intervall als Intervall erhöhter Screeningaktivität einem überdiagnostischem Bias unterlag. So wurden zu Studienbeginn für eine Prävalenzuntersuchung alle Teilnehmer auf das Vorliegen von Malaria getestet und somit auch Erkrankungen trotz subjektiver Beschwerdefreiheit erfasst, die womöglich gar nicht oder erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Vorstellung im CERMEC geführt hätten. Selbst lokale Bewässerungsmaßnahmen sowie ein auch nur transientser Versorgungseingpass mit Repellents und/oder ITNs sind bei sehr niedriger

Personenzeit als Ursache denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich damit weder mit den Erkenntnissen von Wildling und Kollegen, noch mit denen von Jäckle und Kollegen. Allerdings ist eine abschließende Interpretation aufgrund unterschiedlicher Zielgrößen nicht möglich. Während Wildling et al. und Jäckle et al. eine Malariaepisode als Vorliegen einer Parasitämie im Blutaussstrich definieren, schließt die vorliegende Arbeit auch klinische Aspekte wie Fieber in die Definition ein.

Die Änderung der Inzidenz über definierte Zeitintervalle in Abhängigkeit von klimatischen Faktoren ist ein valides Instrument zur Detektion einer Korrelation zwischen Klimabedingungen und dem Auftreten von Malaria. Allerdings ist es notwendig, epidemiologische und klimatische Daten auch bei ganzjähriger Transmission kontinuierlich und lückenlos zu erfassen, um den Einfluss (mikro)klimatischer Veränderungen auf die Inzidenz interpretieren zu können. Die Berechnung der Inzidenz definierter Regen- bzw. Trockenzeit-Teilpersonenzeiten vermag einen Unterschied der Malariamorbidity abhängig von klimatischen Einflüssen zu beschreiben. Der Zeitraum eines Monats als kleinstauflösendes Zeitintervall und die dazugehörige Inzidenz ist allerdings wahrscheinlich besser geeignet, Langzeitverläufe auch im Vergleich zwischen den Jahren und Verschiebungen der Erkrankungsgipfel zu ermitteln.

#### **4.1.3 Alter**

Betrachtet man die Globalwerte für die Inzidenzdichte der einzelnen Studien, so fällt auf, dass die Ergebnisse der Populationen von GMZ2\_4 und GMZ2\_BL mit 0,48 bzw. 0,49 fast identisch sind, die Inzidenzdichte der MAL\_050-Population mit 0,03 jedoch wesentlich geringer ist (FD1). Noch klarer wird die Ähnlichkeit der beiden GMZ-Populationen durch ein Inzidenzdichteverhältnis von 1,02, während jenes von MAL\_050 bezogen auf GMZ2\_BL bei 0,07 liegt (FD1). Zu erklären ist dieser gravierende Unterschied bei gleichem Studienstandort und als gering einzuschätzenden saisonalen Schwankungen bei nicht parallel

durchgeführten Studien vordergründig durch die unterschiedliche Altersstruktur der Studienteilnehmer. Mit einem mittleren Alter von 2,9 bzw. 3,0 Jahren bei Studienbeginn war die Altersverteilung der Kohorten von GMZ2\_BL und GMZ2\_4 nahezu deckungsgleich, während das mittlere Alter der Studienteilnehmer von MAL\_050 bei 5,9 Wochen lag. Diese Ergebnisse sind aufgrund der Tatsache, dass es sich um verschiedene Studienpopulationen ohne Überschneidung in der Altersverteilung handelt, keiner näheren Analyse zugänglich. Dennoch lässt sich sagen, dass die Inzidenzdichte klinischer Malaria im Säuglingsalter (MAL\_050 Kohorte 6-12 Wochen) um ein Vielfaches geringer ist als jene im Kleinkindalter (GMZ-Kohorten 12-60 Monate). Das Ergebnis bestätigt sich durch nahezu parallel verlaufende Überlebenszeitkurven der GMZ-Studien, welche sehr viel steiler abfallen als die nur langsam und flach abfallende Kurve der MAL\_050-Population.

Diese Ergebnisse decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen zur Veränderung epidemiologischer Maßzahlen der Malaria in verschiedenen Altersgruppen in Hochendemiegebieten. So sind besonders Kinder im Kleinkind- und Vorschulalter von der Infektion betroffen. Die Parasitämieprävalenz erreicht ihren Höhepunkt etwa um das 5. Lebensjahr und nimmt bis ins Erwachsenenalter kontinuierlich ab.<sup>[25], [26]</sup> Bei noch fehlender Immunität gegen die Infektion liegen sowohl der Morbiditäts- als auch der Mortalitätsgipfel im frühen Kleinkindalter. Allerdings sind diese von der Transmission abhängig. In Hochendemiegebieten liegt das Alter der Ersterkrankung im zweiten bis dritten Lebensjahr, während es sich bei geringerer Transmission nach hinten verlagert. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Fällen schwerer Malaria. Während diese in hypoendemischen Gebieten überwiegend zwischen dem ersten und fünften Lebensjahr beobachtet werden und ihren Gipfel um das dritte Lebensjahr erreichen, wird ihr Maximum in Hochendemiegebieten bereits im zweiten Lebensjahr beobachtet. Auch das mittlere Mortalitätsalter verhält sich invers zur Transmission und liegt in Hochendemiegebieten um das erste Lebensjahr.<sup>[26], [27], [28]</sup>

Wenig Daten gibt es zur Morbidität und Mortalität im Säuglingsalter jenseits der Neonatalzeit. Hier ist die Erkrankungshäufigkeit, kongruent zu den in dieser Arbeit vorliegenden Daten, allerdings wesentlich geringer. Ursächlich hierfür ist die mütterliche Leihimmunität im ersten halben Lebensjahr, nach deren Verlust es zu oben genanntem rapiden Anstieg der Erkrankungswahrscheinlichkeit kommt.<sup>[29]</sup> Unter laufender Exposition nach dem Erkrankungsgipfel im Kindesalter kommt es im Verlauf der Adoleszenz zum Aufbau einer Immunität gegen den Erreger, welche die große Zahl asymptomatischer Parasitämien im Erwachsenenalter erklärt.<sup>[30]</sup>

#### **4.1.4 Zeitpunkt der Studiendurchführung**

Das Malariaaufkommen unterliegt auch in Hochendemiegebieten jahreszeitlichen Schwankungen (s.o.). Daher ist nicht auszuschließen, dass die Durchführung der einzelnen Studien in unterschiedlichen Jahren einen Einfluss auf die Inzidenzdichte ausübt. Besonders in Gebieten saisonaler Transmission zeigen vorangegangene Arbeiten stark fluktuierende Fallzahlen innerhalb einer Population im longitudinalen Verlauf.<sup>[31]</sup> Für Hochendemiegebiete wie Lambaréné ist dieser Effekt wahrscheinlich sehr viel geringer ausgeprägt. Dafür spricht die nahezu identische Inzidenzdichte der GMZ-Studien, obwohl diese in einem unterschiedlichem Erfassungszeitraum durchgeführt wurden. Lediglich die unterschiedliche Inzidenz der erfassten kurzen Regenzeit 2007 und 2008 innerhalb des MAL\_050-Nachbeobachtungszeitraumes sowie einzelne Außerreißerintervalle innerhalb der GMZ-Studien lassen das Auftreten epidemischer Spitzenmonate vermuten. Zur Objektivierung dieser Fragestellung sind allerdings longitudinale Langzeituntersuchungen über mehrere Jahre, idealerweise unter Miterfassung potentieller klimatischer Einflussfaktoren (s.o.) notwendig.

#### 4.1.5 Intervention

Sowohl GMZ2\_4 als auch MAL\_050 sind Interventionsstudien mit Malaria-Vakzinekandidaten. Das legt die Vermutung nahe, dass im Falle einer Effizienz des untersuchten Impfstoffes dieser für ein Bias bei der Analyse epidemiologischer Daten im Sinne falsch niedriger Werte für die Inzidenz sorgt. Aufgrund gleicher Globalwerte für die Inzidenzdichte der beiden GMZ-Studien ist zunächst nicht an eine epidemiologisch relevante Wirkung des GMZ2-Impfstoffes während des Untersuchungszeitraumes zu denken, auch wenn der Verlauf der Überlebenszeitkuren einen längerfristigen Effekt möglich erscheinen lässt. Objektivieren lässt sich diese Vermutung nicht, da die GMZ2\_4-Daten für diese Arbeit verblindet vorliegen und ein potentieller Einfluss des Impfstoffes durch Subgruppenanalysen nicht durchgeführt werden kann. Die unverblindeten Rohdaten von MAL\_050 sind einer Analyse dagegen zugänglich. Darüber hinaus sind die Daten der Studie bereits veröffentlicht.<sup>[32]</sup> Die Wirksamkeit („vaccine efficacy“) wird über alle Studienzentren mit 53% gegen Malaria-Erstepisoden und 59% gegen alle Malariaepisoden angegeben. Große Unterschiede ergeben sich allerdings in der Inzidenz. Diese beträgt am CERMEI lediglich 0,05, während sie an den Studienzentren in Ghana und Tansania jeweils 1,3 und 0,53 beträgt.

Zur Diskussion eines potentiellen Einflusses der Impfung auf die Studienpopulation in Lambaréné ist die Ermittlung der Subgruppeninzidenz der einzelnen Studienarme notwendig. Hier zeigt sich eine deutlich verminderte Inzidenzdichte in der Interventionsgruppe, welche sich auch im Inzidenzdichteverhältnis widerspiegelt. Demnach ist RTS,S/AS01E in der Lage, das Auftreten von Malaria in der untersuchten Alterskohorte um mehr als die Hälfte zu senken. Dieses Ergebnis deckt sich mit jenem der kompletten Multicenteranalyse. Auch wenn die Aussagekraft bei geringen Fallzahlen noch eingeschränkt ist, so legt das Ergebnis doch nahe, dass die Impfung mit RTS,S/AS01E einen deutlichen Einfluss auf die Malariainzidenz hat. Nachfolgestudien in anderen Alterspopulationen, größeren Kohorten und

längerer Nachbeobachtungszeit bestätigen diese Vermutung.<sup>[33], [34], [35]</sup>

Die in dieser Arbeit errechnete Inzidenzdichte der ungeimpften Kontrollpopulation entspricht damit am ehesten der Realität, die gepoolten Globalwerte sind impfbedingt als falsch niedrig anzusehen. Unberührt davon bleibt die Häufigkeit klinischer Malaria im Säuglingsalter auf niedrigem Niveau.

#### **4.2 Empfehlungen zur Ermittlung realitätsnaher epidemiologischer Daten**

Für die Planung und Durchführung prospektiver Studien mit epidemiologischen Zielgrößen lassen sich aus den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit folgende Empfehlungen ableiten:

- Die Inzidenz ist der valideste Marker zur Bestimmung der Malariamorbidity. Der Verlauf der Parasitenprävalenz und der entomologische Inokulationsrate korrelieren nicht notwendigerweise mit der tatsächlichen Krankheitslast über einen definierten Zeitraum
- Das Geschlecht der Studienteilnehmer im Kindesalter hat keinen Einfluss auf die Malariainzidenz. Unter Umständen sollte ab dem Jugendalter zur Vermeidung eines männlichen Bias auf ausgeglichene Kohorten geachtet werden.
- Neben dem Alter ist die Transmissionsrate der wichtigste Einflussfaktor auf die Häufigkeit des Auftretens von Malaria.
- Um dem Einfluss saisonaler Schwankungen gerecht zu werden, sollte bei der Analyse epidemiologischer Daten ein möglichst langer Nachbeobachtungszeitraum erfasst werden. Durch die Errechnung der Inzidenz pro Monat wird eine gute zeitliche Auflösung erreicht, die saisonal bedingte epidemiologische Schwankungen sicher erfasst.
- Eine geplante Abschlussvisite trägt bei der Ermittlung der Personenzzeit unter Risiko mittels PCD zur korrekten Berechnung der Gesamtpersonenzzeit bei.

### 4.3 Schlussfolgerungen für die globale Malariabekämpfung

Nachdem die Bekämpfung der Malaria in der ersten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist, konnten durch neue Erkenntnisse zur Verbreitung und zum Verlauf der Erkrankung wirksame präventive und therapeutische Maßnahmen gefunden werden, die zu einer schrittweisen Reduktion der weltweiten Morbidität und Mortalität durch Malaria geführt haben. Dies führte dazu, dass es Mitte des 20. Jahrhunderts erste Bestrebungen zur Eradikation der Krankheit gab, die besonders in den Industrienationen bereits von nachhaltigem Erfolg geprägt waren.<sup>[6], [36], [37]</sup> So gibt es, global gesehen, seit Beginn des 20. Jahrhunderts einen kontinuierlichen Abfall von Neuerkrankungen.<sup>[37]</sup>

Ausgenommen von dieser insgesamt erfreulichen Tendenz ist die epidemiologische Entwicklung der Krankheit in der Region des subsaharischen Afrika. Hier wurden seit den 1980er Jahren bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts eine steigende Anzahl Malarianeuerkrankungen und -todesfälle registriert. Dies ist insofern problematisch, als in dieser Region die überwiegende Anzahl der weltweiten Todesfälle durch Malaria auftritt, wovon besonders Kinder unter fünf Jahren betroffen sind.<sup>[4],[6]</sup>

Betrachtet man allerdings den epidemiologischen Verlauf der Erkrankung in den letzten zehn Jahren, so zeigt sich nun ein globaler Rückgang sowohl der Malariamortalität als auch -morbidität, welcher auf die Durchführung von Malariakontrollprogrammen und damit auf eine Ausweitung und Verbesserung der präventiven und therapeutischen Maßnahmen in den Endemiegebieten zurückzuführen ist.<sup>[4],[6],[24]</sup> Diese Entwicklung hat in den letzten Jahren den Ruf nach einer weltweiten Eradikation der Erkrankung erneut lauter werden lassen.<sup>[36],[38]</sup>

Problematisch allerdings gestaltet sich die Evaluation des epidemiologischen Status quo, anhand dessen man die weitere Entwicklung der Morbidität und

Mortalität nachvollziehen kann. Die unterschiedlichen Publikationen zur weltweiten Krankheitsbelastung durch Malaria aus den letzten Jahren stimmen zwar bezüglich der prinzipiellen Trends überein, unterscheiden sich aber teilweise erheblich in ihren absoluten Fallzahlen zu Erkrankung und Sterblichkeit. Diese Unterschiede sind exemplarisch an 4 Veröffentlichungen in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Unterschiede in epidemiologischen Erfassungen

Publikation	Jahr der Erfassung	Erfasste Malaria-erkrankungen	weltweit	
			Klinische Fälle	Todesfälle
Snow et al. 2005 <sup>[7]</sup>	2002	<i>P. falciparum</i>	515.000.000	
Hay et al. 2010 <sup>[5]</sup>	2007	<i>P. falciparum</i>	471.000.000	
Murray et al. 2012 <sup>[6]</sup>	2010	alle		1.238.000
WHO 2011 <sup>[4]</sup>	2010	alle	216.000.000	655.000

Die Gründe für die Inkongruenz der vorliegenden Arbeiten liegen in der Methodik der Datenaquise. So baut die WHO-Statistik vorwiegend auf Meldesystemen der Länder auf, in denen die Malaria endemisch ist. Wie im Report selbst bereits eingeräumt wird, hat diese Art der Erfassung einige Schwächen. So entgehen dem Report einerseits Fälle, die aus verschiedenen Gründen nicht durch das staatliche Gesundheitssystem erfasst werden, andererseits gibt es eine Vielzahl von Fällen, die nach klinischen Gesichtspunkten als Malaria gewertet werden, ohne dass die Diagnose durch einen Schnelltest oder die Analyse eines dicken Tropfens bestätigt wird.<sup>[4]</sup> Die Daten von Hay und Kollegen sowie von Snow und Kollegen basieren auf prospektiven Studien, welche unter Berücksichtigung von geographischen und demographischen Daten auf eine Gesamtpopulation adjustiert wurden.<sup>[5],[7]</sup> Murray und Kollegen wiederum gewinnen ihre Erkenntnisse aus der Analyse einer Vielzahl epidemiologischer Studien. Diese enthalten einerseits Arbeiten, deren Daten auf prä mortal gestellten Diagnosen beruhen („vital registration“). Andererseits gehen auch Studien mit post mortal gestellter Diagnose auf Basis

verbaler Autopsie in die Analyse ein. Anhand subgruppenspezifischer Einflussfaktoren werden von den Autoren verschiedene, teilkohortenadaptierte Modelle entwickelt, mithilfe derer die epidemiologischen Zielzahlen ermittelt werden.<sup>[6]</sup> Besonders der Einfluss von durch verbale Autopsie gewonnenen Daten ist hierbei kritisch zu sehen, da sie zu einer hohen Unschärfe der Endergebnisse beitragen. Dies spiegelt sich insbesondere in den Mortalitätsdaten älterer Kinder und Erwachsener wieder, welche in den Schätzungen von Murray und Kollegen um ein Vielfaches höher angegeben werden, als im WHO Malariareport 2011. Als plausible Ursache wird u.a. eine falsch hohe Zuschreibung der Todesursache Malaria bei sonst nicht anders erklärbarer Todesursache im Erwachsenenalter und fehlender prämortaler Diagnostik diskutiert.<sup>[39]</sup>

Es zeigt sich, dass es auf globaler Ebene nach wie vor schwierig ist, belastbare Daten zur Morbidität und Mortalität der Malaria aufzustellen. Die vorliegende Arbeit beweist, dass bereits kleine Unterschiede in der Grundannahme einer epidemiologischen Analyse zu erheblichen Unterschieden in den Ergebnissen führen können. So können beispielsweise verschiedene Falldefinition oder eine andere Altersstruktur der analysierten Kohorte bei sonst gleichen Rahmenbedingungen zu einer erheblichen Divergenz der erhaltenen Resultate führen. Ebenso ist es von großer Bedeutung, epidemiologische Daten über einen kontinuierlichen Zeitraum zu erfassen, um saisonale Schwankungen sicher erfassen zu können.

Für ein exaktes Monitoring der Fallzahlen ist es daher notwendig, diese mit einheitlichen Maßstäben zu erfassen. Als am ehesten umzusetzendes Instrument, welches belastbare und vergleichbare Daten liefert, ist eine Erfassung sämtlicher Malariafälle in den jeweiligen Endemiegebieten unter Verwendung einer einheitlichen Falldefinition mit mikroskopischer Bestätigung der Verdachtsdiagnose anzusehen. Anhand dieser absoluten Fallzahlen wird unter Zuhilfenahme der Population unter Risiko die Inzidenz berechnet, deren

Veränderung am ehesten den Trend in der weltweiten Malariamorbidity und -mortality widerzuspiegeln vermag.

Grundvoraussetzung dafür ist, dass in allen Ländern, in denen die Malaria endemisch ist, standardisierte Kontrollprogramme etabliert werden und es ein finanziell und logistisch niedrighschwellig zu erreichendes Gesundheitssystem gibt, in welchem präventive und kurative Maßnahmen für die Gesamtpopulation der Risikoländer zur Verfügung stehen. Erst dann können wir abschätzen, wie groß die weltweite Malariabelastung wirklich ist, auf aktuelle Entwicklungen reagieren und das große Ziel der Malariaeradikation umsetzen.

#### **4.4 Methodenkritik**

Die vorliegende Arbeit hat als retrospektive Analyse Schwächen in der Vergleichbarkeit der erhobenen Daten.

So wurde innerhalb der GMZ-Studien ab einer Körpertemperatur von 38,0°C eine Malariadiagnostik eingeleitet, bei MAL\_050 jedoch bereits ab 37,5°C.

Vorliegende Arbeit orientiert sich an der MAL\_050-Definition. Das hat zur Folge, dass einzelne Fälle der GMZ2-Kohorten von vorneherein keiner Malariadiagnostik zugeführt wurden, die bei Vorliegen einer Parasitämie einer oder beider Falldefinitionen dieser Arbeit entsprochen hätten. Damit sind die Fallzahlen innerhalb der GMZ2-Studien im Vergleich zu MAL\_050 tendenziell als falsch niedrig anzusehen.

Alle Studien ermitteln das Malariaaufkommen mittels PCD. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass ein in GMZ2\_BL oder MAL\_050 aufgenommener Studienteilnehmer, welcher zu keiner Zeit erkrankt und somit nicht im CERMEI vorgestellt wird, der Analyse entgeht und sich seine Beobachtungszeit unter Risiko nicht in der Berechnung der Inzidenzdichte widerspiegelt. Dadurch kommt es tendenziell zu eher falsch hohen Werten für die Inzidenzdichte.

Demgegenüber steht die Analyse von GMZ2\_4, da diese Studie bei Erstellung der Datenbanken noch in der Nachbeobachtungsphase lief. Die Personenzeit t

eines Teilnehmers, welcher seit seinem Screening nicht mehr am CERMEL vorstellig wurde und möglicherweise im Verlauf als „Lost-to-follow-up“ gewertet wird, geht vollständig in die Gesamtpersonenzeit PZ ein. Dadurch kommt es tendenziell zu eher falsch niedrigen Werten für die Inzidenzdichte.

Problematisch sind auch die willkürlich festgelegten Grenzen der Saisonintervalle anhand von aktuellen Klimadaten. Einerseits unterliegen diese jahresabhängigen Schwankungen und starre Datumsgrenzen anhand übergeordneter longitudinal erstellter Durchschnittsdaten reflektieren nicht notwendigerweise die tatsächlichen Saisonintervalle im Jahr der Studiendurchführung. Darüber hinaus führen starre Datumsgrenzen dazu, dass an den Datumsgrenzen Infektionen aus dem vorangegangenen Saisonintervall erst im neuen Saisonintervall klinisch manifest werden und dadurch letzterem zugeordnet werden. Dieser Effekt ist insgesamt wahrscheinlich vernachlässigbar, noch dazu, da er sich vermutlich selbst ausgleicht. Bei kleinen Fallzahlen allerdings sind relevante Verschiebungen denkbar. Alternativ hätte man auf die Definition von Regen- und Trockenzeit komplett verzichten, sehr viel kleinere Zeitintervalle wählen und kontinuierliche Inzidenzdichtekurven über den Jahresverlauf erstellen können. Diese Methode allerdings ist, besonders im Fall von MAL\_050, limitiert durch niedrige Fallzahlen.

## 5. Zusammenfassung

Malaria bleibt eine der globalen Hauptursachen von Morbidität und Mortalität in Entwicklungsländern mit weltweit über 200 Millionen Erkrankungsfällen. Die überwiegende Mehrzahl der Erkrankungs- und Todesfälle wird dabei in der WHO-Region Afrika registriert. Trotz der weiterhin hohen gesundheitlichen Belastung durch Malaria sind die Fallzahlen insgesamt seit ca. 10 Jahren kontinuierlich rückläufig. Allerdings bestehen erhebliche Unterschiede in den epidemiologischen Schätzwerten der Malariamorbidität und -mortalität zwischen verschiedenen Publikationen.

Die vorliegende Arbeit analysiert Einflussfaktoren auf die Inzidenzdichte klinischer Malaria im Säuglings- und Kleinkindalter in Lambaréné, Gabun. In dem Gebiet treten ganzjährig Malariaerkrankungen auf, welche nahezu ausschließlich durch *P. falciparum* verursacht sind. Dazu wurden Datensätze von drei epidemiologischen Studien analysiert: GMZ2\_BL als rein epidemiologische Grundlagenstudie sowie MAL\_050 und GMZ2\_4 als Interventionsstudien mit Malaria-Kandidatenvakzinen. Die Populationen der Studien wurden auf den Einfluss der Faktoren Saisonalität, Geschlecht, Alter und Intervention in den Impfstoffstudien auf das Auftreten klinischer Malaria untersucht. Zielgrößen sind dabei die Inzidenzdichte sowie das Inzidenzdichteverhältnis beim Vergleich zweier Subpopulationen.

Die Globalwerte für die Inzidenzdichte zwischen den GMZ2-Populationen ähneln sich. So liegt diese nach Falldefinition 1 für GMZ2\_BL bei 0,48 und für GMZ2\_4 bei 0,49. Für die MAL\_050 Population fällt sie mit 0,03 wesentlich geringer aus.

Zur Bestimmung des Einflussfaktors Saisonalität wurden die Nachbeobachtungszeiträume der Studien in Regen- und Trockenzeitperioden eingeteilt und die seasonspezifische Inzidenzdichte ermittelt. Während innerhalb der MAL\_050- und GMZ2\_BL-Populationen die Malariafälle in der

Regenzeit überwiegen, tritt die Erkrankung innerhalb der GMZ2\_4-Population häufiger in der Trockenzeit auf. Ursache dafür sind Ausreißerteilintervalle mit besonders hohen Inzidenzdichten, deren Auftreten die vorliegende Arbeit nicht zu erklären vermag. Jedenfalls lässt sich anhand der vorliegenden Daten keine saisonale Abhängigkeit der Malariahäufigkeit von saisonalen Schwankungen schlussfolgern.

Das Inzidenzdichteverhältnis zwischen den Geschlechtern variiert sowohl zwischen den Studien als auch zwischen den Falldefinitionen innerhalb der Studien. Daraus lässt sich schließen, dass die Geschlechtszugehörigkeit keinen Einfluss auf die Auftrittshäufigkeit von Malaria hat.

Als Hauptgrund für die unterschiedliche Inzidenzdichte der GMZ2-Populationen und der MAL\_050-Population ist das Alter anzusehen. In beide GMZ2-Studien wurden Kinder im Alter von 1-5 Jahren eingeschlossen, in der MAL\_050-Population lag das Alter der Teilnehmer bei Studienbeginn bei 6-12 Wochen. Auch wenn die Daten einer direkten Analyse des Einflussfaktors Alter nicht zugänglich sind, lässt sich schlussfolgern, dass die Malaria im Kleinkindalter wesentlich häufiger als im Säuglingsalter auftritt.

Die unverblindeten Daten der MAL\_050-Kohorte zeigen bei insgesamt niedrigen Fallzahlen eine wesentlich geringere Inzidenzdichte innerhalb der mit der Kandidatenvakzine geimpften Studienpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Zahlen legen eine Wirksamkeit des RTS,S Impfstoffes nahe, die durch aktuellere Studien weiter untermauert wird. Die Wirksamkeit des GMZ2-Impfstoffes lässt sich anhand der verblindeten Daten der GMZ2\_4-Population nicht direkt abschätzen. Allerdings scheint sich die Vakzine zumindest im vorliegenden Nachbeobachtungszeitraum nicht weitreichend auf die Inzidenzdichte auszuwirken, da diese innerhalb der GMZ2\_4-Population mit Intervention fast identisch zu jener der interventionsfreien GMZ2\_BL-Population ist.

In allen Analysen ergeben sich starke Unterschiede bei den ermittelten epidemiologischen Maßzahlen durch die Verwendung zweier Falldefinitionen. So ist die Inzidenzdichte in einigen Teilanalysen unter Verwendung der

Falldefinition 2 (alle Parasitämien, Fieber/Fieberanamnese) doppelt so hoch wie unter Annahme der Falldefinition 1 (Parasitämien  $\geq 5000/\mu\text{l}$ , Fieber/Fieberanamnese).

Die vorliegende Arbeit zeigt einen deutlichen Einflussfaktors des Alters sowie der Impfung mit der RTS,S/AS01E-Kandidatenvakzine auf die Inzidenzdichte klinischer Malaria. Die Anwendung unterschiedliche Falldefinitionen ergeben teilweise stark divergierende epidemiologische Zielgrößen.

Jüngste Veröffentlichungen zur weltweiten Malariamorbidität und -mortalität zeigen einen deutlichen Rückgang der Krankheitsbelastung seit Beginn des letzten Jahrzehntes. Auf dieser Grundlage ist das Ziel der Malariaeradikation wieder in den Fokus globaler Kontrollprogramme gerückt. Allerdings widersprechen sich die Studien in den Absolutzahlen zu weltweiten jährlichen Erkrankungs- und Sterbefällen. Die Ursache hierfür ist in der Methodik der Datenerfassung und -analyse zu finden. Zum Monitoring der weiteren Entwicklung der globalen Malariabelastung ist daher eine flächendeckende und einheitliche Erfassung der Erkrankungs- und Sterbefälle in den Endemiegebieten notwendig. Die Schaffung flächendeckender Kontrollprogramme sowie eines niedrigschwellig zu erreichenden Gesundheitssystems in den betroffenen Ländern ist dafür eine Grundvoraussetzung.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis. 2011;52:1356–1362.
- 2 Bray R.S., Garnham P.C. The life-cycle of primate malaria parasites. Brit. Med. Bull. 1982;38:117–122.
- 3 Dietel N., Suttorp N., Zeitz M. (Hrsg.) Harrisons Innere Medizin, 17. Auflage. McGraw-Hill ABW Wissenschaftsverlag 2008. 1583-1599
- 4 World malaria report. Geneva: World Health Organization, 2011
- 5 Hay SI, Okiro EA, Patil AP, Gething PW, Guerra CA, Tatem AJ, Snow RW. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. PLoS Med. 2010;7:e1000290.
- 6 Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, et al. (2010) Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet 379: 413–431.
- 7 Snow RW, Guerra GA, Noor AM, Myint HL, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2005;434:214–217.
- 8 Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. Lancet. 2010;375:1969–87.
- 9 Sylla EH, Kun JF, Kremsner PG. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94:652–656.
- 10 Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2—a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. Vaccine. 2009;27(49):6862–6868.
- 11 Mordmüller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, et al. (2010) Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambarene, Gabon. Vaccine 28: 6698–6703
- 12 Belard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, et al. (2011) A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. PLoS One 6: e22525.

**13** Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, Haertle S, Oyakhiromen S, et al. (2009) A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One* 4:e7611.

**14** Agnandji ST, Asante KP, Lyimo J, Vekemans J, Soulanoudjingar SS, Owusu R, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of the RTS, S/AS01E malaria candidate vaccine when integrated in the expanded program of immunization. *J Infect Dis.* 2010;202:1076–87.

**15** Roca-Feltrer A, Armstrong Schellenberg JR, Smith L, Carneiro I. A simple method for defining malaria seasonality. *Malaria J.* 2009;8:276.

**16** Karunamoorthi K, Bekele M. Prevalence of malaria from peripheral blood smears examination: a 1-year retrospective study from the Serbo Health Center, Kersa Woreda, Ethiopia. *J Infect Public Health.* 2009;2(4):171–176.

**17** Pathak S, Rege M, Gogtay NJ, Aigal U, Sharma SK, et al. (2012) Age-dependent sex bias in clinical malarial disease in hypoendemic regions. *PLoS One.* 7(4):e35592.

**18** Ikeh EI, Teclaire NN. Prevalence of malaria parasitaemia and associated factors in febrile under-5 children seen in Primary Health Care Centres in Jos, North Central Nigeria. *Niger Postgrad Med J.* 2008;15(2):65–9.

**19** Gitonga CW, Edwards T, Karanja PN, Noor AM, Snow RW, et al. (2012) Plasmodium infection, anaemia and mosquito net use among school children across different settings in Kenya. *Trop Med Int Health* 17: 858–70

**20** Wunderlich F, Marinovski P, Benten WPM, Schmitt-Wrede H, Mossmann H. Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to Plasmodium chabaudi malaria. *Parasite Immunology.* 1991;13(4):357–367.

**21** Cernetich A, Garver LS, Jedlicka AE, Klein PW, Kumar N, Scott AL, Klein SL. 2006. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. *Infect. Immun.* 74:3190–3203.

**22** Craig M. H., Snow R. W. & le Sueur D. A climate-based distribution model of malaria transmission in sub-Saharan Africa. *Parasitol. today* 15, 105–11 (1999).

**23** Ceesay SJ, Casals-Pascual C, Erskine J, Anya SE, Duah NO, Fulford AJ, Sesay SS, Abubakar I, Dunyo S, Sey O, Palmer A, Fofana M, Corrah T, Bojang KA, Whittle HC, Greenwood BM, Conway DJ. Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis. *Lancet.* 2008;372:1545–1554.

- 24** Jäckle et al.: Malaria in pregnancy in rural Gabon: a cross-sectional survey on the impact of seasonality in high-risk groups. *Malaria Journal* 2013 12:412.
- 25** Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Tropical Medicine and Parasitology*. 1995;46(2):77–82.
- 26** Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero JO, Palmer A, Weber MW, Pinder M, Nahlen B, Obonyo C, Newbold C, Gupta S, Marsh K. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet*. 1997;349:1650–1654.
- 27** Abdullah S, Adazu K, Masanja H, Diallo D, Hodgson A, Ilboudo-Sanogo E, Nhalo A, Owusu-Agyei S, Thompson R, Smith T, Binka FN. Patterns of age-specific mortality in children in endemic areas of sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(Suppl 6):99–105.
- 28** Carneiro I, Roca-Feltre A, Griffin JT, Smith L, Tanner M, Schellenberg JA, et al. Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in sub-Saharan Africa: a systematic review and pooled analysis. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e8988.10.1371/journal.pone.0008988
- 29** McGregor IA, Rowe DS, Wilson ME, Billewicz WZ. Plasma immunoglobulin concentrations in an African (Gambian) community in relation to season, malaria and other infections and pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 1970;7:51–74
- 30** Dal-Bianco MP, Koster KB, Kombila UD, et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:939–942.
- 31** Alemu A, Muluye D, Mihret M, Adugna M, Gebeyaw M. Ten year trend analysis of malaria prevalence in Kola Diba, North Gondar, Northwest Ethiopia. *Parasit Vectors*. 2012;5:173.
- 32** Asante KP, Abdulla S, Agnandji S, Lyimo J, Vekemans J, et al. (2011) Safety and efficacy of the RTS,S/AS01E candidate malaria vaccine given with expanded-programme-on-immunisation vaccines: 19 month follow-up of a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 11:741–749.
- 33** Agnandji S. T., Lell B., Soulanoudjingar S. S., Fernandes J. F., Abossolo B. P., Conzelmann C., et al. (2011). First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.* 365 1863–1875
- 34** Agnandji S. T., Lell B., Fernandes J. F., Abossolo B. P., Methogo B. G., Kabwende A. L., et al. (2012). A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N. Engl. J. Med.* 367 2284–2295.

- 35** Olotu A., Fegan G., Wambua J., Nyangweso G., Awuondo K.O., Leach A., Lievens M., Leboulleux D., Njuguna P., Peshu N. Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:1111–1120.
- 36** Tanner M, de Savigny D. Malaria eradication back on the table. *Bull World Health Organ.* 2008;86:82.
- 37** Carter R., Mendis K. (2002). Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 564–594. 10.1128/CMR.15.4.564-594.2002
- 38** Roberts L, Enserink M. Malaria. Did they really say ... eradication? *Science.* 2007;318(5856):1544–5.
- 39** Lynch M, Korenromp E, Eisele T, Newby H, Steketee R, Kachur SP, Nahlen B, Bhattarai A, Yoon S, MacArthur J, Newman R, Cibulskis R. New global estimates of malaria deaths. *Lancet.* 2012;380:559.
- 40** R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- 41** Mark Stevenson with contributions from Telmo Nunes, Cord Heuer, Jonathon Marshall, Javier Sanchez, Ron Thornton, Jenö Reiczigel, Jim Robison-Cox, Paola Sebastiani, Peter Solymos, Kazuki Yoshida and Simon Firestone (2014). epiR: An R package for the analysis of epidemiological data. R package version 0.9-59. <http://CRAN.R-project.org/package=epiR>

## **7. Bilderverzeichnis**

- [I]** <http://ocw.jhsph.edu/index.cfm/go/imageLib:il.viewImageDetails/resource-ID/438DCC50-FFE9-0B648515BF619797AA48/browseTopic/Malaria/topicID/16/>
- [II]** <http://www.wetterkontor.de/de/klima/klima2.asp?land=ga&stat=64551>

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Peter G. Kremsner, Direktor des Institutes für Tropenmedizin, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen und Dr. Bertrand Lell, Kodirektor des *Center of Medical Research Lambaréné*, Gabun.

Die Erstellung der Datenbank für GMZ2\_BL erfolgte durch mich auf Basis der Logbücher der gelesenen Blutausstriche in Abgleich mit den bereits elektronisch erfassten geplanten Studienvisiten sowie den aus der Papierdokumentation entnommenen ungeplanten ambulanten Vorstellungen der Studienteilnehmer. Die Erstellung der Datenbank für GMZ2\_4 erfolgte durch mich durch Durchsicht der zum Zeitpunkt der Datenerhebung bei noch laufender Studie bestehenden Teilnehmerdossiers in Abgleich mit den dazugehörigen Logbüchern der gelesenen Blutausstriche.

Lesungen fehlender Blutausstriche für GMZ2\_BL und GMZ2\_4 wurden von mir veranlasst und teilweise durch mich nach entsprechender Schulung gemäß den SOPs durchgeführt.

Die Datenbank von MAL\_050 mit den unverblindeten Originaldaten wurde freundlicherweise von GlaxoSmithKline für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich mittels *R* Version 3.1.1 nach Einarbeitung durch und in Zusammenarbeit mit Dr. Bertrand Lell.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Chemnitz, 23.04.2015

(Christof Schitke)