

Aus der Abteilung für Infektions-und Tropenmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. FRCP. Michael Hölscher

an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martin Reincke

**Geno-und Phänotypisierung des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-
Mangels zur Mutations-und Prävalenzbestimmung
in der äthiopischen Bevölkerung der Jimma Region, Äthiopien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nora Juliane Irma Kießling
aus Filderstadt

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	PD Dr. med. Nicole Berens-Riha, MSc
Mitberichterstatter:	PD Dr. Stephan Böse-O'Reilly Prof. Dr. Ortrud Steinlein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Michael Pritsch
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	09.05.2019

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit

Kießling N, Brintrup J, Zeynudin A, Abdusalam N, Götz S, Mack M, Pritsch M, Wieser A, Kohne E, Berens-Riha N: Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity measured by spectrophotometry and associated genetic variants from the Oromiya zone, Ethiopia. *Malaria journal*, 2018, 17:358.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorgestellt:

Kongress

Enzyme activity and genetic polymorphisms of G6PD in Southern Ethiopia

N Kießling, J Brintrup, A Zeynudin, N Abdusalam, W Adissu, S Götz, M Mack, T Löscher, M Pritsch, A Wieser, E Kohne, N Berens-Riha

13th Malaria Meeting 2015, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)	1
1.1.1 Funktion	1
1.1.2 Aufbau	2
1.1.3 Pentosephosphatweg.....	2
1.1.4 Glutathion (GSH)	3
1.2 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel	4
1.2.1 Geschichte	5
1.2.2 Genetik und molekulare Grundlagen	6
1.2.3 Häufige genetische Varianten und Phänotypen.....	9
1.2.4 Prävalenz	12
1.2.5 Diagnostik	14
1.2.6 Klinische Manifestation	17
1.2.6.1 Die Medikamenten-assoziierte hämolytische Anämie	18
1.2.6.2 Die Infektions-assoziierte hämolytische Anämie.....	18
1.2.6.3 Favismus.....	19
1.2.6.4 Neonataler Ikterus.....	20
1.2.6.5 Angeborene nicht-sphärozytisch hämolytische Anämie (CNSHA)	21
1.2.6.6 Genetische Modulatoren.....	21
1.2.7 Therapie und Management	21
1.3 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel und Malaria	23
1.3.1 Prävalenz beider Erkrankungen	23
1.3.2 Malaria	23
1.3.2.1 Entwicklungszyklus der Plasmodien.....	24
1.3.2.1.1 Sporogonie.....	24
1.3.2.1.2 Schizogonie.....	25
1.3.2.1.2.1 Prä-erythrozytäre Phase (Gewebeschizogonie).....	25
1.3.2.1.2.2 Erythrozytäre Phase.....	25
1.3.2.2 Klinik	26
1.3.2.3 Plasmodium vivax.....	27
1.3.2.4 Plasmodium falciparum.....	28
1.3.2.5 Therapie.....	28
2. Fragestellung und Zielsetzung	30
3. Patienten, Material und Methoden	30
3.1 Studienort, Patienten, Proben	30
3.1.1 Studienort Jimma und Umgebung	30
3.1.2 Patientenauswahl, Einschlusskriterien und Fragebogen.....	31
3.1.3 Procedere und Probenentnahme	32
3.2 Material	32
3.2.1 Labormaterial	32
3.2.2 Chemikalien	33
3.2.3 Geräte und Software.....	34
3.3 Methoden und Durchführung	34
3.3.1 Hämoglobinmessung	34
3.3.2 Blutausstrich	35
3.3.2.1 Dicker Tropfen.....	35
3.3.2.2 Dünner Tropfen	35

3.3.3 Filterpapier	35
3.3.4 Malaria-Schnelltest	35
3.3.5 G6PD-Schnelltest (RDT-Rapid diagnostic test).....	36
3.3.6 Hämoglobinelektrophorese.....	38
3.3.6.1 Grundprinzip.....	38
3.3.6.2 Durchführung	38
3.3.7 Spektrophotometrie.....	38
3.3.7.1 Grundprinzip.....	38
3.3.8.2 Durchführung	38
3.3.8 Genotypisierung.....	39
3.3.8.1 Grundprinzip.....	39
3.3.8.2 Durchführung	40
3.3.9 Statistik.....	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Studienpopulation und Fragebogen.....	43
4.2 Hämoglobinmessung.....	44
4.3 Blutausstrich.....	44
4.4 Malaria-Schnelltest.....	44
4.5 G6PD-Schnelltest	44
4.6 Hämoglobinelektrophorese.....	45
4.7 Spektrophotometrie	45
4.8 Genotypisierung.....	46
5. Diskussion	52
5.1 Prävalenz des Enzymmangels und relevanter Mutationen in Äthiopien im Vergleich zu anderen afrikanischen Ländern und weltweit.....	52
5.2 Vergleich der klassischen Methode Spektrophotometrie und G6PD.....	54
5.3 Malariatherapie mit Primaquin und G6PD-Mangel.....	57
5.4 Prävalenz relevanter Hämoglobinopathien in Äthiopien im Vergleich zu anderen afrikanischen Ländern und weltweit.....	60
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	61
6. Zusammenfassung.....	63
7. Literaturverzeichnis	67
8. Abkürzungsverzeichnis	78
9. Abbildungsverzeichnis	79
10. Tabellenverzeichnis	80
11. Anhang.....	81
11.1 Verwendete Fragebögen.....	81
11.2 Einverständniserklärungen mit Aufklärung.....	88
11.3 G6PD-Ausweis.....	91
11.3.1 Englisch.....	91
11.3.2 Oromo	92
11.3.3 Amharisch.....	94
11.4. Bekannte Mutationen	96
11.5 Poster.....	101
12. Danksagung	102

13. Curriculum Vitae	104
14. Eidesstaatliche Versicherung	107

1. Einleitung

1.1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)

Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (MIM 305900, EC 1.1.1.49) katalysiert den ersten Schritt des Pentosephosphatweges. Dieser alternative Abbauweg der Glucose stellt die Reduktion von Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADP) zu reduziertem Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) und somit die Reduktion von Gluthaiondisulfid (GSSG) zu Glutathion (GSH) sicher (s. Abb. 1 und 3). Das sogenannte „Schrittmacherezym“ des alternativen Abbauweges schützt besonders die mitochondrienfreien Erythrozyten vor oxidativen Prozessen.

1.1.1 Funktion

Im ersten Schritt des Pentosephosphatweges wird Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat umgewandelt. Bei dieser Reaktion wird NADP zu NADPH reduziert. Das anfallende NADPH wird unter anderem als Co-Faktor für die Reduktion und somit Regeneration des Glutathions (GSH) mittels der Glutathionreduktase benötigt. Bei diesem Schritt wird Glutathiondisulfid (GSSG) zu GSH reduziert. Das reduzierte GSH schützt die Erythrozytenmembran vor oxidativem Stress und Radikalen indem es das durch Oxidantien entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2), in unschädliches Wasser (H_2O) reduziert [1, 2].

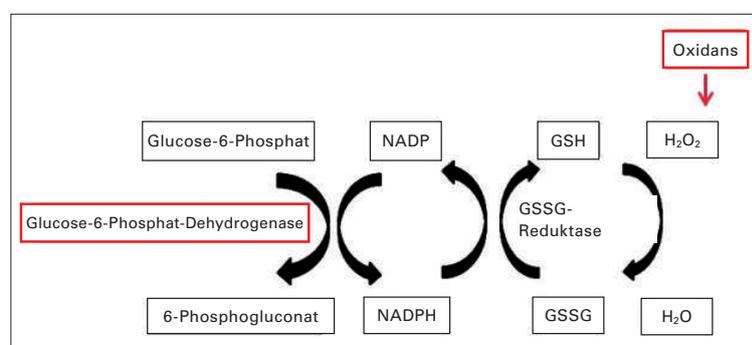


Abb. 1: Der Pentosephosphatweg aus Swiss Medical Forum- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, 2016 [1]

1.1.2 Aufbau

Die G6PD besteht aus 515 Aminosäuren und weist ein molekulares Gewicht von ca 59 kDa auf. Das Enzym existiert in zwei Isoformen, einer kurzen Isoform, die 515 Aminosäuren und einer langen Isoform, die 249 Aminosäuren umfasst [3]. Ein dreidimensionales Modell wurde bereits 1996 von Naylor *et al.* beschrieben [4]. Das Enzym befindet sich in einem Gleichgewicht zwischen Tetramer und Dimer, wobei bei physiologischen pH, die dimere Form überwiegt [3, 5]. Jedes Monomer besteht aus zwei Domänen die über eine α -Helix miteinander verbunden sind. In jeder Untereinheit des Tetramers findet sich ein NADP Molekül nahe der Dimer-Oberfläche. Die Stabilität der aktiven quartären Struktur, ist für eine ausreichende G6PD-Aktivität wesentlich [3]. Wie Battistuzzi *et al.* beschrieben haben, variiert die Konzentration der G6PD in verschiedenen Geweben. Es lassen sich niedrige Konzentrationen in der Skelettmuskulatur und sehr hohe Konzentrationen im Gehirn und den Nebennieren finden [6].

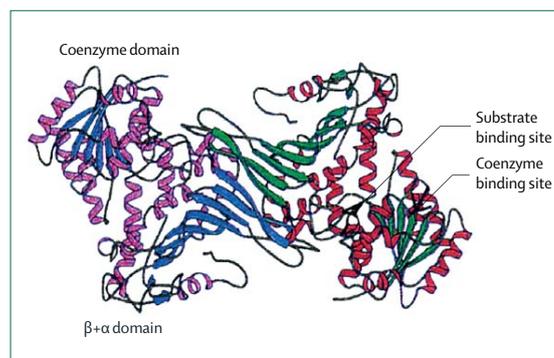


Abb. 2: Dreidimensionales Modell des G6PD- Enzyms aus Cappellini und Fiorelli (2008) [3]

1.1.3 Pentosephosphatweg

Der Pentosephosphatweg (s. Abb. 1 und 3), auch Hexomonophosphatweg genannt, wird in einen oxidativen (irreversiblen) und einen nichtoxidativen (reversiblen) Abschnitt unterteilt. Er wird für die Bildung von Pentosen und die Bildung von

NADPH benötigt. Die Pentose, Ribose-5-Phosphat wird für die Bildung von Nucleotiden wie beispielsweise DNA, RNA, NADH, FAD oder Co-A benötigt. NADPH ist in den Hepatozyten für die Synthese von Fettsäuren essentiell [7]. In Erythrozyten ist der Pentosephosphatweg die einzige Quelle für NADPH, da diese keine Mitochondrien und somit keine Atmungskette besitzen [3].

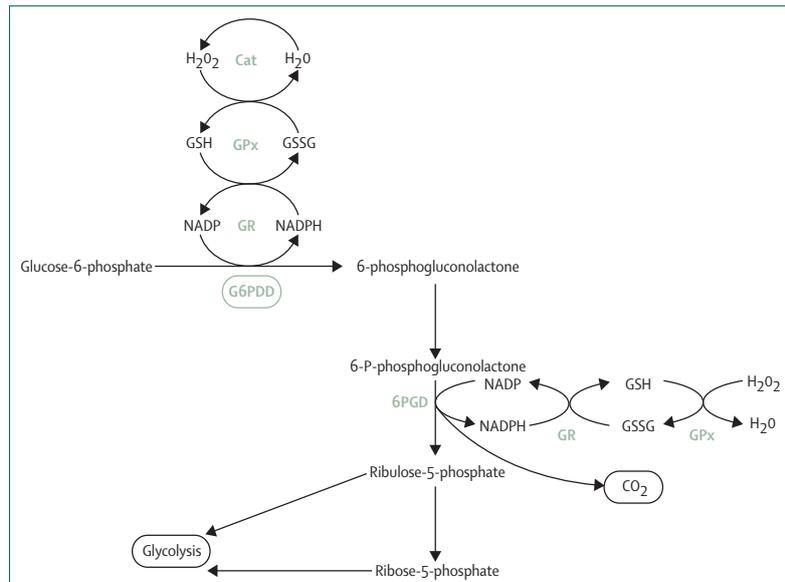


Abb. 3: Der Pentosephosphatweg aus Cappellini und Fiorelli (2008) [3]

1.1.4 Glutathion (GSH)

Das in allen Zellen vorkommende Tripeptid dient in den Erythrozyten im Allgemeinen als Reduktionsmittel und als Schutz vor freien Radikalen. Das anfallende NADPH wird unter anderem als Co-Faktor für die Reduktion und somit Regeneration des GSHs mittels der Glutathionreduktase benötigt. Bei diesem Schritt wird GSSG zu GSH reduziert. Hierdurch schützt das reduzierte GSH die Erythrozytenmembran vor oxidativem Stress und Radikalen, indem es das durch Oxidantien entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in unschädliches Wasser (H_2O) reduziert [1, 8].

1.2 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel

Der höchstwahrscheinlich vor Malaria schützende Mangel betrifft über 400 Millionen Menschen weltweit und zählt somit zu den häufigsten bekannten Enzymopathien. Obwohl der Mangel in den meisten betroffenen Menschen keine Symptome auslöst, kann er zu akuten Hämolyse, neonataler Hyperbilirubinämie sowie zu chronischen Anämien führen. Im Falle einer reduzierten Enzymaktivität kann bei Aussetzung gegenüber oxidativem Stress, das GSH nicht ausreichend reduziert werden und der antioxidative Zyklus nicht adäquat aufrecht erhalten werden [3, 9, 10].

Dies führt zur Zerstörung der Erythrozyten. Es genügen bereits kleine Mengen an Oxidantien wie Primaquin oder Fava-Bohnen sowie vielen anderen oxidativen Stressoren, um diesen Effekt auszulösen (s. Tab. 1) [11].

Tab. 1: Bekannte oxidative Stressoren, die eine Hämolyse in G6PD-defizienten Patienten auslösen können [3, 11]

Medikamentenkategorie	Vorhersehbare Hämolyse	Mögliche Hämolyse
Antimalariamedikamente	Dapsone Primaquin Methylenblau	Chloroquine Quinine
Analgetika/ Antipyretika	Phenazopyridine	Aspirin (In hoher Dosis) Paracetamol
Antibakterielle Substanzen	Cotrimoxazol Sulfadiazine Quinolone Nitrofurantoin	Sulfasalazine
Andere	Rasburicase Anilinfarbstoff Naphtalen (Mottenkugeln) Henna Favabohnen (<i>Vicia Fava</i>)	Chloamphenicol Isoniazid Ascorbinsäure Glibenclamid Vitamin K Isosorbide Dinitrate

1.2.1 Geschichte

Der sogenannte Favismus, der nach Verzehr von Fava-Bohnen auftritt, war bereits in der Antike bekannt. Bereits der griechische Philosoph und Mathematiker Pythagoras untersagte seinen Schülern den Verzehr der Bohnen. Für Jahrhunderte wurde der Favismus fälschlicher Weise als allergische Reaktion fehlgedeutet [11]. Im Jahre 1926 berichtete Cordes über das Auftreten von akuten Hämolysen in Patienten, deren Malaria-Infektion mit 6-Methoxy-8-Aminoquinolen behandelt wurde. Es dauerte jedoch weitere 30 Jahre, um den Mechanismus und Zusammenhang zwischen der Einnahme des Anti-Malariamittels und der Hämolyse zu verstehen. In dieser Zeit wurde unter der flächendeckenden Anwendung von Primaquin (PQ) beim Militär von einem sogenannten „*Primaquin-sensitiven-Syndrom*“ berichtet [12, 13]. Carson und Kollegen stellten letztlich 1956 eine erniedrigte G6PD-Aktivität in den Patienten fest, die eine Hämolyse nach Einnahme von PQ zur Malariatherapie entwickelt hatten. Der Enzymdefekt war damit als Pathomechanismus entdeckt [14]. Nachdem sich der G6PD-Mangel als klinische Erkrankung etablierte, wurde seine phänotypische Ausprägung als heterogen beschrieben [15].

Im Jahre 1967 veröffentlichte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die ersten Empfehlungen für eine Charakterisierung des G6PD-Mangels, welche seither immer weiter verbessert und aktualisiert werden [16].

Durch Ernest Beutler wurde 1984 der G6PD-Mangel biochemisch beschrieben und unter Einschluss von physikalischen und chemischen sowie kinetischen Variablen seither definiert. Im Jahre 1986 erfolgte durch Takizawa *et al.* die Klonierung und Sequenzierung des *g6pd* Genes [17]. Naylor *et al.* entwickelte 1996 ein dreidimensionales Modell der menschlichen G6PD [4].

Basierend auf der Enzymaktivität und der klinischen Manifestation, wurden die Varianten des G6PD-Mangels, in 5 Klassen eingeteilt [16].

WHO Klassifikation [16] :

- **Klasse I:** Schwerer Mangel (<10% Aktivität) mit chronischer hämolytischer Anämie
- **Klasse II:** Schwerer Mangel (<10% Aktivität), mit intermittierenden Hämolysen
- **Klasse III:** Milder Mangel (10-60% Aktivität), Hämolyse durch Stressauslösende Faktoren
- **Klasse IV:** Nicht-defiziente Variante, ohne klinische Folgeerkrankung
- **Klasse V:** Ansteigende Enzymaktivität

Klasse I repräsentiert die schwerste Form des G6PD-Mangels, in welcher eine Enzymaktivität von unter 10% vorliegt und die Betroffenen an chronischen hämolytischen Anämien leiden. In Klasse II liegt ein schwerer Mangel mit Enzymaktivitäten von unter 10% mit klinisch intermittierenden Hämolysen vor. Die Klasse III umfasst den milden Mangel mit Enzymaktivitäten von 10-60%, in welcher Patienten durch bekannte oxidative Stressoren unter Hämolyse leiden. In Klasse IV und V, die klinisch nicht relevant sind, ist keine mangelnde Enzymaktivität nachzuweisen, beziehungsweise eine ansteigende Aktivität zu beobachten [16]. Es besteht niemals ein vollständiger G6PD-Mangel, da dieser letal wäre [18].

Der Enzym-Mangel kann verursacht werden durch die Reduzierung der Enzym-Moleküle und/oder einer Strukturänderung des Enzyms. Eine genauere Untersuchung der Varianten des *g6pd* Gens zeigt, dass Aminosäuresubstitutionen in verschiedene Lokalisationen zu einer Destabilisierung des Enzym-Moleküls führen [3]. Inzwischen sind mehr als 217 Mutationen des *g6pd* Gens und über 400 verschiedene Enzymvarianten bekannt [19].

1.2.2 Genetik und molekulare Grundlagen

Beim G6PD-Mangel handelt es sich um einen X-chromosomal rezessiven Erbgang. Da Männern nur ein X-Chromosom besitzen, liegt bei ihnen entweder die defiziente oder die normale Enzymfunktion vor. Frauen können jedoch drei Genotypen aufweisen: den homozygoten normalen, den homozygoten defizienten

und den heterozygoten Typ [20]. In Populationen, in denen die Häufigkeit des *g6pd*-defizienten Allels sehr groß ist, sind weibliche heterozygote Frauen nicht selten. Heterozygote Frauen weisen ein genetisches Mosaik auf, welches auf der Inaktivierung des X-Chromosoms basiert. Sie können somit Aktivitätsspektren aufweisen, die von einem Mangel bis zu einer normalen Enzymaktivität reichen. Obwohl heterozygote Frauen im Vergleich zu hemizygoten Männern eine deutlich weniger schwere Symptomatik aufweisen, können auch sie hämolytische Krisen entwickeln [3, 12, 21-23].

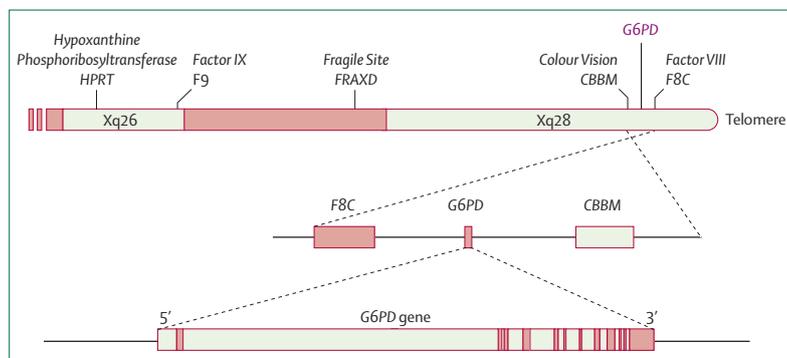


Abb. 4: Lokalisation des *g6pd* Gens aus Cappellini und Fiorelli (2008) [3]

Das *g6pd* Gen besitzt eine Größe von 18,5 kb und besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Es ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Genlocus Xq28) lokalisiert (S. Abb. 4 und 5). Alle bekannten G6PD-Varianten, außer *G6PD A* sind mit einer mehr oder weniger schweren Defizienz assoziiert, jedoch nie mit einem kompletten Verlust der Aktivität [20]. Die häufigsten Enzymvarianten sind *Mediterranean*, *A-* (202A), *A-* (968C), *Seattle* und *Union* [3]. Minuzzi et al. berichteten 2012 von insgesamt 186 Mutationen (s. Liste im Anhang). Darunter sind 159 (85,4%) Einzelnukleotidsubstitutionen (Missense-Mutationen), 15 (8,0%) zeigen mehrfache Mutationen (mit zwei oder mehreren Substitutionen), 10 (5,3%) sind Deletionen und 2 (1,0 %) Mutationen betreffen die Introns [24].

Gomez et al. berichteten 2016, über 31 weitere Mutationen (s. Liste im Anhang). Basierend auf den Mutationstypen weisen 23 eine Variation

Einzelnukleotidsubstitutionen, (Missense-Mutationen), eine Deletion und vier multiple Mutationen auf. Drei sind neue Mutationen, welche die Introns betreffen. Unter Berücksichtigung dieser weiteren Mutationen beträgt die Anzahl der bekannten Mutationen 217, die folgende Verteilung aufweisen: 182 (83,9%) Einzelnukleotidsubstitutionen (Missense-Mutation), 19 (8,7%) mehrfache Mutationen (mehr als 2), 11 (5,1%) Deletionen und 5 (2,3%) Mutationen, welche Introns betreffen.

Um ein genaueres Bild dieser beschriebenen Mutationen zu erhalten, wurden die Punktmutationen im dreidimensionalen Modell lokalisiert. So genannte Klasse I Mutationen haben die schwerwiegendsten Auswirkungen auf die Struktur und Stabilität. Tabelle 2 zeigt die relativen Häufigkeiten der Klasse I Mutationen im Vergleich zur absoluten Anzahl der *g6pd*-Mutationen. Klasse I Mutationen betreffen häufiger das Exon 6, 10 und 13 welche die Enzymbinderegion, die Dimer Oberfläche und die NADP Strukturseite kodieren. Diese Klasse I Mutationen resultieren in einem schwerwiegenden Phänotypen des G6PD-Mangels, einer sogenannten chronischen nicht-sphärozytischen-hämolytischen Anämie (CNSHA) [19, 24].

Tab. 2: Verteilung der Einzelnukleotidsubstitutionen und ihre Assoziation mit der WHO-Klassifikation nach [24].

Exon	Anzahl der Mutationen	Phänotyp				
		I	II	III	IV	Nicht erfasst
2	5			3		2
3	4			4		
4	14	2	5	7		
5	15		6	5	1	2
6	19	7	8	3		1
7	7	4	1	2		
8	17	8	5	3		1
9	15	5	5	2	2	
10	37	32	4			
11	10	4	6			
12	12	2	4	4		2
13	4	4				
Total	159	68	44	33	3	8

1.2.3 Häufige genetische Varianten und Phänotypen

Mit mindestens 217 verschiedenen genetischen Varianten zeigt der G6PD-Mangel eine ausgesprochen große Diversität [25]. Abbildung 5, entnommen aus Gómez-Manzo et al., zeigt die nummerierten Exone mit Mutationen. Die roten Kreise sind mit einer CNSHA assoziiert (Klasse I); die lila-farbigen Kreise zeigen Mutationen, die mit einem Klasse II Phänotypen assoziiert sind; die gelben Kreise zeigen Mutationen, die mit einem milderen Phänotypen (Klasse III) assoziiert sind; die braunen Kreise zeigen Klasse IV Mutationen und die grünen Kreise markieren bisher nicht benannte Mutation [19].

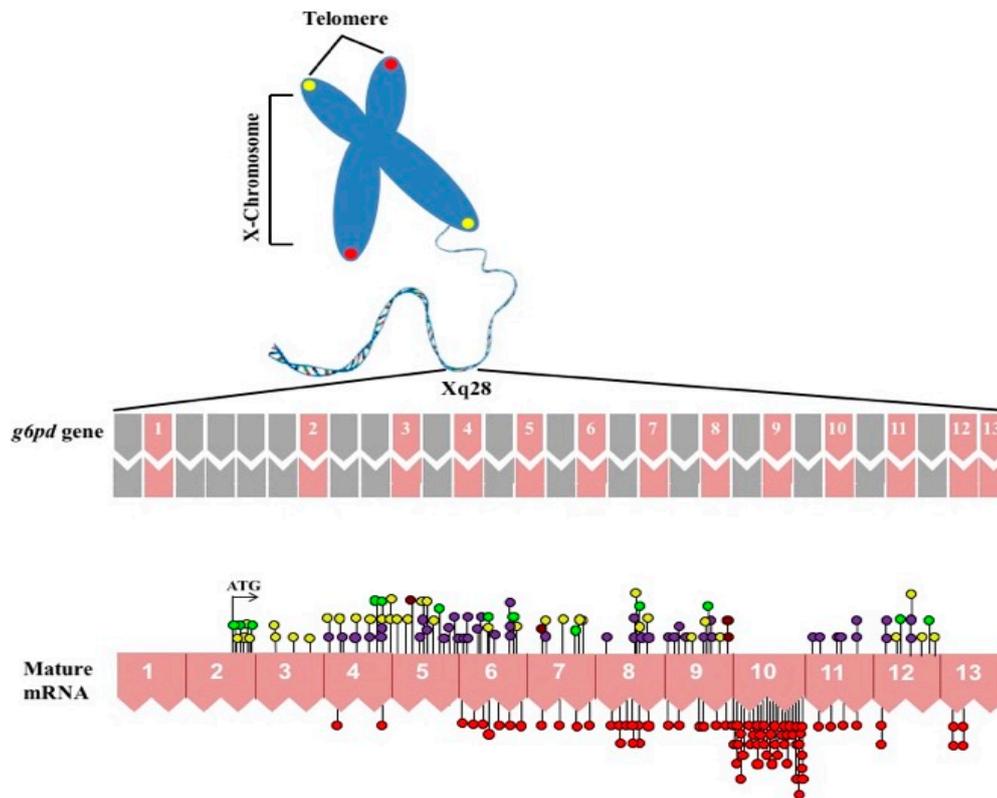


Abb. 5: Schematische Übersicht des X-Chromosoms und der Verteilung der Mutationen im *g6pd* Gen. Gezeigt sind Einzelnukleotidsubstitutionen (Missense-Varianten) aus Gómez-Manzo et al., 2016 [19]

Wie bereits erwähnt und aus der Abbildung 5 ersichtlich, betreffen Klasse I Mutationen häufiger die Exone 6, 10 und 13 [19, 24]. Gerade das Vorhandensein von Mutationen im Exon 10 beeinflusst deutlich die Stabilität des Dimers und führt zu Klasse I Varianten, die eine CNSHA mit akuten Exazerbationen verursachen. Die große Mehrheit der Mutationen sind Missense-Mutationen die zu quantitativen und qualitativen Enzymveränderungen führen. Dies führt zu einer Klassifikation, die auf dem Ausmaß des Mangels und der klinischen Manifestation basiert. Die bei der CNSHA vorliegende Retikulozytose führt zu einer erhöhten G6PD-Aktivität, weshalb Klasse I (CNSHA) und Klasse II (intermittierende Hämolysen) ähnliche Aktivitätsspektren (<10%) aufweisen (s. Tabelle 3) [16, 20, 24, 26].

In den meisten Gebieten mit hohen G6PD-Prävalenzen zeigen sich polymorphe Allele. Die von 2016 von Luzzatto et al. beschriebene weltweite Verteilung des G6PD-Mangels durch Kombination bereits publizierter Daten [16, 27, 28] (s. Abb. 6) zeigt durch verschiedene Farbtöne die Verteilung der Allelfrequenz in endemischen Malariagebieten und in malariefreien Gebieten, nach dem geostatistischen Modell von Howes et al. [27]. In tropischen Regionen werden über 90% des Enzymmangels durch die *G6PD A-* Variante verursacht. Sie ist auch in Nord- und Südamerika, den karibischen Inseln, Italien, den Kanaren, Spanien, Portugal, Ägypten, Iran und im Libanon weit verbreitet [3, 28].

Die Varianten *A-* (202A/376G) und *A+* (202/376G oder 202A/376A) sind charakterisiert durch die reduzierte Enzymaktivität und spezifisch für das subsaharische Afrika [12, 15, 29]. Die *G6PD A-* Variante ist mit einer verbleibenden Enzym-Aktivität von 5-13% und somit einer mildereren Form des Mangels assoziiert [30]. Es wurde jedoch auch von schweren hämolytischen Ereignissen berichtet, sofern der oxidative Stressor stark genug war [12, 30, 31]. Die vorherrschende Allel-Variante in Ost-Afrika, ist das *G6PD A- 202A/376G* Allel (202G>A und 376A>G) [28]. Die *G6PD A-* Variante ist ein besonderer Genotyp mit der gleichzeitigen Vorhandensein von A376G und G202A Mutationen.

Die Variante *Mediterranean* lässt sich in allen an das Mittelmeer angrenzenden Staaten, vor allem Italien mit Sardinien finden, zusätzlich in Israel, dem Mittleren

Osten, auf der arabischen Halbinsel, in Indien und in Indonesien. Sie zeigt eine Enzymaktivität von bis zu <1% und führt zu schweren hämolytischen Krisen bei Kontakt mit bekannten Stressoren wie beispielsweise Primaquin oder Fava-Bohnen. In Regionen um den persischen Golf sind beide Varianten *Mediterranean* und *A-* zu finden. Andere polymorphe Varianten sind *Seattle* und *Union*, die hauptsächlich in Süditalien, besonders Sardinien, Griechenland, den Kanaren, Algerien, Deutschland und Irland vorkommen [3, 32-34].

Die *B* Variante (*202G/376A*) ist mit einer normalen Enzymaktivität assoziiert und lässt sich weltweit in der Bevölkerung finden [21, 27].

Die G6PD *Mahidol* Variante ist, so wird angenommen, die häufigste Variante in Asien, und besonders präsent in Myanmar und Thailand [28, 35-37]

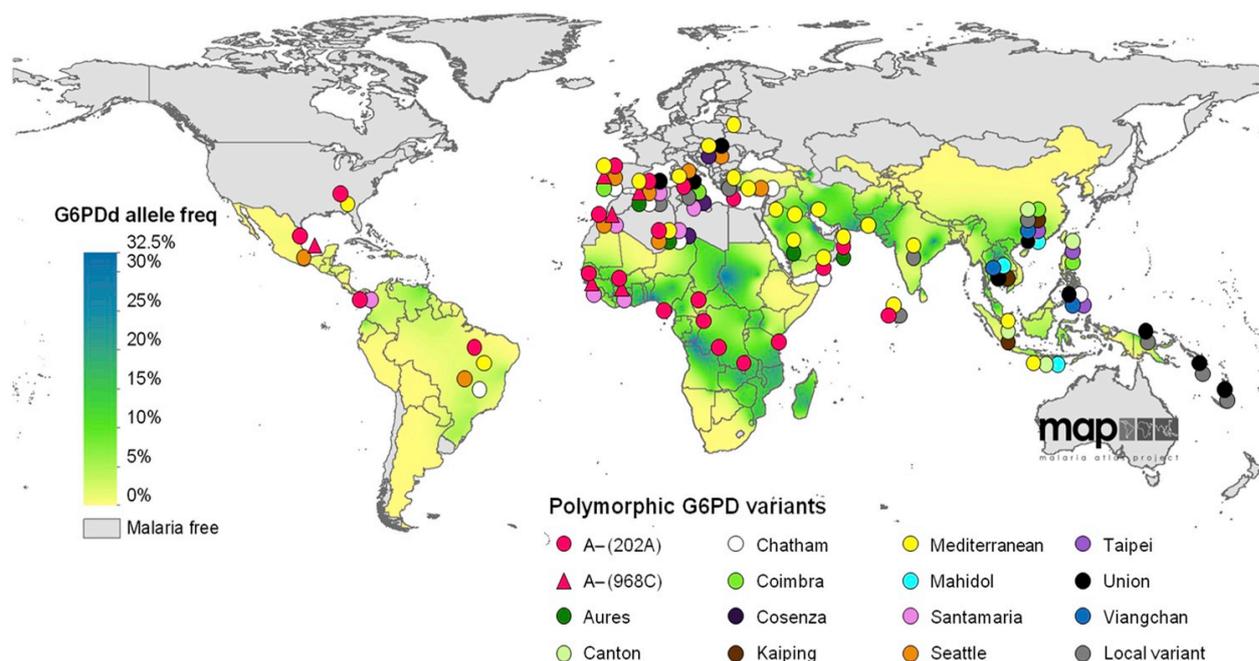


Abb. 6: Aus Luzzatto et al., 2016, die weltweite Verteilung des G6PD-Mangels durch Kombination bereits publizierter Daten [16, 27, 28]. Angegeben durch verschiedene Farbtöne die Verteilung der Allelfrequenz in endemischen Malariagebieten und in malariafreien Gebieten, nach dem geostatistischen Modell von Howes et al. [27]. Jeder farbige Kreis verdeutlicht die geographische Verteilung eines polymorphen G6PD-Allels in mehr als einer Population. Jeder graue Kreis zeigt die lokal polymorphen Varianten, die jeweils nur in einer Population gefunden wurden [20]

Tab. 3: WHO- Klassifikation mit Assoziation zu klinischer Manifestation, geographischer Verteilung und genetischer Varianten nach Minucci et al. 2012 und Luzzatto et al. 2016 [20, 24]

Klasse	Enzymaktivität	Klinische Manifestation	Häufigkeit und geographische Verteilung	Beispiele genetischer Varianten
I	< 10%	CNSHA mit akuten Exazerbationen	Selten, keine genaue geographische Verteilung	<i>Guadalajara, Nara, Sunderland</i>
II	< 10%	Akute hämolytische Anämie ausgelöst durch Fava-Bohnen oder Medikamente	Häufig, weltweite Verteilung	<i>Mediterranean, Canton, Union</i>
III	10-60%	Gelegentliche akute hämolytische Anämie	Häufig in Malariagebieten	<i>A-, Mahidol, Seattle</i>
IV	60-100%	Asymptomatisch	Unbekannte Häufigkeit	<i>A, B,</i>
V	>100%	Asymptomatisch	Unbekannte Häufigkeit	—

1.2.4 Prävalenz

Da der G6PD-Mangel höchstwahrscheinlich partiell vor einer Malaria-Infektion schützt, korreliert er mit der geographischen Verteilung der Malaria weltweit. Der G6PD-Mangel, ist über alle Kontinente verteilt [16]. Die höchsten Prävalenzen lassen sich in Afrika, den arabischen Halbinseln, dem Mittleren Osten, im tropischen und subtropischen Asien, in Papua Neu Guinea, dem Vanuatu Archipel im Pazifik und verschiedenen Regionen rund um das Mittelmeer finden [3].

Die Häufigkeit des Mangels ist sehr variabel, da sie durch natürliche Selektion und Migration maßgeblich beeinflusst wird. Die Korrelation zwischen G6PD-Mangel und der Epidemiologie der Malaria ist offensichtlich, da sich der Mangel vermehrt

in Regionen finden lässt, in denen Malaria endemisch ist oder war [27]. Er ist außerdem in Nordamerika weit verbreitet, jedoch nicht auf Grund von ehemaligen endemischen Malariagebieten, sondern vielmehr durch Migration aus Afrika, Asien und Europa [20]. In den Vereinigten Staaten von Amerika sind hauptsächlich Männer afrikanischen oder mediterranen Ursprungs betroffen. Letztere mit einer Prävalenz von ca. 10%. In Griechenland, der Türkei und in Italien reicht die Prävalenz von 2-20% und unter kurdischen Juden sogar bis zu 70% [19, 38].

Die Verteilung des G6PD-Mangels in Afrika beträgt zwischen 0,5-30% [16, 27]. Die höchste G6PD-Mangel-Prävalenz weltweit findet sich in Ländern der Sub-Sahara und auf der arabischen Halbinseln, [16, 27]. Die Prävalenz des G6PD-Mangels in der männlichen hemizygoten Bevölkerung in den folgenden afrikanischen Ländern variiert beträchtlich: Äthiopien und Somalia: 0,5-2,9 %; Sudan: 7- 9,9%; Uganda, Kenia: 10-14,9 %; Tansania, Kongo, Gabun und Kamerun: 15-26% [16].

Im WHO Report von 1989 wurde in Äthiopien von einer Prävalenz von 0,5 bis zu 2,9 % in der männlichen hemizygoten Bevölkerung ausgegangen (Abb. 7). Nach Howes et *al.*, war jedoch von einer Allelfrequenz in der männlichen Bevölkerung Äthiopiens von weniger als 1% zu rechnen [27]. Eine 2014 erschienene Studie aus Gambella, im Südwesten Äthiopiens, berichtete von deutlich höheren Prävalenzen, von bis zu 14,3% innerhalb bestimmter Ethnien [39]. Die Prävalenz in der Oromiya Region, Äthiopien, war bisher nicht bekannt.

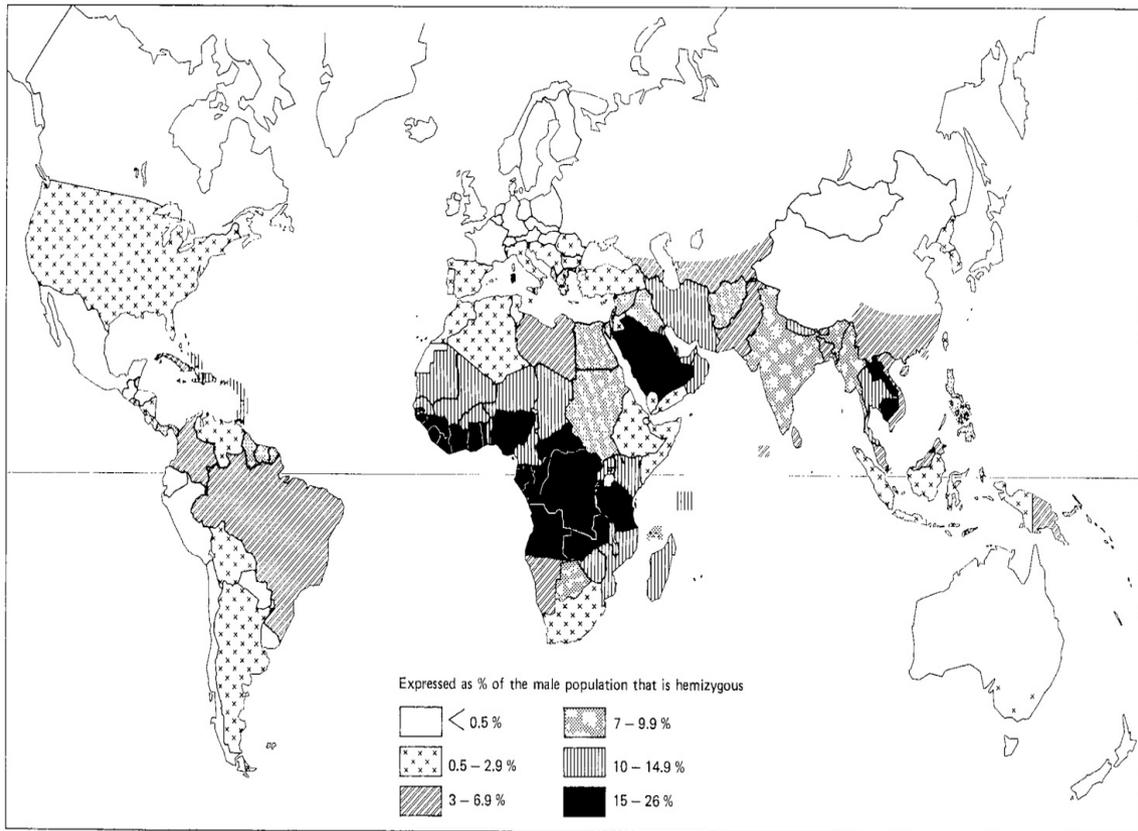


Abb. 7: Prävalenz des G6PD-Mangels weltweit aus WHO (1989) [16]

1.2.5 Diagnostik

Die Beurteilung der Enzymaktivität kann mit quantitativen, semiquantitativen oder qualitativen Untersuchungen durchgeführt werden.

Quantitative Untersuchung

Für eine definitive biochemische Diagnose ist eine quantitative Untersuchung obligat. Als Goldstandard gilt die quantitative spektrophotometrische Analyse [21]. Sie basiert auf der Untersuchung der Absorption der Lösung bei 340 nm. Die quantitative Analyse wird durch die Zugabe einer präzisen Menge von Hämolyt zu einer Assay-Mischung erzielt, welche das Substrat Glucose-6-Phosphat und seinen Co-Faktor NADP beinhaltet. Die Erzeugung von NADPH wird nun spektrophotometrisch bei 340 nm oder 366 nm gemessen. Die G6PD Aktivität wird in International Units/Red Blood Cells (IU/RBCs) und G6PD International Units/Hämoglobin-Ratios (IU/gHb) angegeben. In gesunden Erythrozyten beträgt die

G6PD-Aktivität zwischen 7-10 IU/g Hb, bei einer Messung bei 30°C und 340 nm nach Minucci et al. [21] bzw. $12 \pm 2,09$ IU/g Hb bei 37°C und 366 nm nach Beutler et al., [40] oder 4,6-13,5 U/g Hb bei 37°C und 366 nm nach TrinityBiotech [41].

Zu den semiquantitativen Tests zählt beispielsweise der 1961 entwickelte Farbstest von Motulsky. Dieser entwickelte eine Methode, mit deren Hilfe die Reduktion von NADPH mittels Brilliantcresylblau-Lösung sichtbar gemacht werden konnte [12]. Im Laufe der Zeit wurden weitere Tests, welche zur Reduktion von Substanzen wie Methylen-Blau oder MTT führen entwickelt. Diese wurden letztlich durch den semiquantitativen Fluoreszenz-Spot-Test (FST) abgelöst. Er ist der am häufigsten genutzte semiquantitative Test und ermöglicht die direkte Intensitätsmessung der Fluoreszenz mit Hilfe von UV-Licht [42]. Er wird häufig für die Testung von schweren Defizienzen genutzt, kann jedoch die Aktivitäten die zwischen einem erheblichen Mangel und einer normalen Enzymaktivität liegen, nur unzureichend erfassen [42]. Andere semiquantitative Screening Tests bestimmen die NADPH-Konzentration indirekt durch die Höhe des reduzierten Methämoglobins oder durch die Untersuchung von Heinzkörperchen und/oder der Stabilität von GSH. Die Durchführung dieser Tests ist jedoch aufwendig da sie geschultes Personal und streng kontrollierte Laborbedingungen benötigen [12, 16, 21].

Qualitative Untersuchung

Zu den qualitativen Tests gehören die sogenannten Point-of-care-Tests (PoC-Tests), zu deutsch eine „Patientennahe Labordiagnostik“, wie der in der vorliegenden Arbeit verwendete chromatographische, kommerzielle Schnelltest BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA). In den letzten Jahren wurden verschiedene qualitative Tests mit verbesserten Eigenschaften entwickelt und getestet. Die zwei chromatographischen kommerziellen Schnelltests BinaxNOW BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA) und CareStart® G6PD (CareStart Inc., Cincinnati, USA) zeigten eine Sensitivität von bis zu 98% und Spezifität von 98% [43, 44] und können Enzymaktivitäten unterhalb 30% erfassen [45]. Dieser Grenzwert ist ausreichend, um homozygote Frauen und hemizygoten Männer von

gesunden Probanden zu unterscheiden, lässt jedoch die Testung von heterozygoten Frauen nicht ausreichend zu (Ley 2017, LaRue 2014). Der gegenwärtige Grenzwert wird als ausreichend empfunden, um eine sichere Gabe von Primaquin zu gewährleisten [46]. Heterozygote Frauen sind jedoch einem erheblichen Risiko der Medikamenten-induzierten-Hämolyse ausgesetzt [45] und es bestehen Bedenken bezüglich der Sicherheit bei Gabe des lang wirkenden Tafenoquins, ein weiteres 8-Aminoquinolon, bei Enzymaktivitäten von unter 70% [47]. Für die sichere Diagnosestellung werden zusätzlich quantitative Tests benötigt.

Diagnostische Schwierigkeiten können entstehen, wenn die G6PD-Enzym-Aktivität während oder kurz nach einer hämolytischen Episode oder in Anwesenheit von extrem hohen Retikulozytenzahlen gemessen wird. Das ergibt sich aus der Tatsache, dass die G6PD-Enzymaktivität in jungen Erythrozyten höher ist als in reiferen Zellen, was wiederum zu falsch negativen Ergebnissen bei der Testung führen kann. Außerdem verringert sich durch die fehlende Proteinsynthese, die Aktivität von G6PD mit steigendem Alter der Erythrozyten [3, 21].

Der G6PD-Mangel zeigt ein typisches X-chromosomales Muster (vgl. Kapitel 1.2.2). Genetische Mosaik haben für Frauen in der Tat, die bedeutendsten medizinischen Auswirkungen. Der G6PD-Mangel bei heterozygoten Trägerinnen, kann sich biochemisch und klinisch in der Schwere stark unterscheiden [21]. Keiner der Screening-Tests kann heterozygote Frauen zuverlässig testen, da das X-chromosomale Mosaik zu einem partiellen G6PD-Mangel führt [3].

Molekulare Untersuchung

Die molekulare Analyse kann für Bevölkerungsscreenings, pränatale Diagnostik und besonders bei G6PD-heterozygoten Frauen sinnvoll sein, da sie die einzige definitive Methode zur Klärung des Status der Frau darstellt. Wie Minucci et al. beschreiben, sollte eine korrekte Laborpraxis zur molekularen Diagnose des G6PD Mangels zwei analytische Schritte beinhalten [21]. Diese sind:

1. Die Prüfung mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) und RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) der häufigsten Mutationen der jeweiligen geographischen Gebiete
2. Die zweite Prüfung auf weniger häufige und neue Mutationen, basierend auf der gesamten Gen-Sequenzierung [21]

Eine G6PD-Mangel-Testung sollte bei akuten hämolytischen Reaktionen nach bekannter Trigger-Exposition in Betracht gezogen werden. Hier sind beispielsweise Medikamente (S. Tab. 1), Infektionen oder der Verzehr von Fava-Bohnen, bei Kindern oder Erwachsenen, zu nennen (s. Kapitel 1.2.5, Klinische Manifestation). Im Speziellen, wenn diese Patienten afrikanischen, mediterranen oder asiatischen Ursprung haben. Besonders Neugeborene, die einen G6PD-Mangel aufweisen, neigen zu einem schweren neonatalen Ikterus [3].

1.2.6 Klinische Manifestation

Basierend auf der Enzymaktivität und der klinischen Manifestation, wurden wie bereits erwähnt, die Varianten des G6PD-Mangels durch die WHO in 5 Klassen eingeteilt (s. Kapitel 1.2.1)[16].

Der G6PD-Mangel manifestiert sich klinisch durch eine Medikamenten-oder Infektions-assozierte akute hämolytische Anämie, den Favismus, einen neonatalen Ikterus oder durch chronische hämolytische Anämien. Diese werden häufig von Müdigkeit, Rückenschmerzen und Ikterus begleitet [3].

Auch klinische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, ein Myokardinfarkt oder schwere körperliche Belastung können Trigger darstellen, die eine hämolytische Krise auslösen können [48-50]. Für die Schwere der Hämolyse sind das Alter der Erythrozyten, die Dosis des Medikamentes sowie die G6PD-Enzymaktivität ausschlaggebend [11].

1.2.6.1 Die Medikamenten-assoziierte hämolytische Anämie

Die Medikamenten-assoziierte Anämie bei G6PD-defizienten Patienten wurde bereits 1926 entdeckt [12]. Nachfolgend wurde die Liste der potentiell gefährlichen Medikamente vervollständigt, die in Tab. 1 (s. Seite 4) aufgeführt sind. Aufgrund der vielen verschiedenen Variationen des G6PD-Mangels ist es häufig sehr schwierig, sicher zu beweisen, welche Medikamente zu hämolytischen Krisen führen. Die individuelle Pharmakokinetik, das Vorliegen anderer Erkrankungen, wie beispielsweise Infektionen, das gleichzeitige Verabreichen von mehreren Medikamenten und die nicht immer klinisch eindeutige Hämolyse, führen unter anderem zu diesen Schwierigkeiten [3]. Durch die Einnahmen potentiell gefährlicher Medikamente kommt es durch vermehrten oxidativen Stress zu einer Erhöhung des Methämoglobins und zum Angriff auf die Sulphydryl-Gruppen des Hämoglobins. Durch Beschädigung der Membran bilden sich Heinz-Körperchen, die Erythrozyten werden durch intra-und extravaskuläre Mechanismen zerstört. Warum einzelne Medikamente zu schwereren oder leichteren Methämoglobinämien führen, ist bisher unbekannt [11].

Der klinische Nachweis der Hämolyse und des Ikterus ist typischerweise 24-72 h nach Medikamentenexposition festzustellen. Nach dem sofortigen Absetzen des Medikaments kann mit einer Erholung der Hämoglobinkonzentration innerhalb von 8-10 Tagen gerechnet werden. Typischerweise auftretende Heinz-Körperchen können mit Hilfe der Methylen-Blau-Färbung erfasst werden [3].

1.2.6.2 Die Infektions-assoziierte hämolytische Anämie

Infektionen sind vermutlich der häufigste Grund für eine hämolytische Anämie bei G6PD-defizienten Personen. Die Schwere der Hämolyse kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden: Die gleichzeitige Einnahme unterschiedlicher Medikamente, eine gestörte Leberfunktion und das Alter des Patienten. Die Erhöhung der totalen Billirubin-Konzentration kann aufgrund einer Hämolyse aber auch aufgrund einer Hepatitis erhöht sein. Dies stellt eine potentielle Fehlerquelle

in der Diagnostik dar und muss berücksichtigt werden. Bei schwerer Hämolyse kann eine zügige Transfusion schnelle Besserung verschaffen. Das akute Nierenversagen stellt eine weitere potentielle Komplikation dar. Hervorgerufen durch renale Ischämie und tubulärer Obstruktion kommt es zu tubulärer Nekrose, die eine Hämodialyse erforderlich machen kann [3].

1.2.6.3 Favismus

Der Favismus wurde bereits im 5. Jahrhundert vor Christus von Pythagoras beschrieben, der seinen Schülern den Verzehr der Fava-Bohnen (*Vicia Fava*) strengstens untersagte [12]. Alle Patienten mit Favismus weisen eine G6PD-Defizienz auf. Jedoch zeigen nicht alle G6PD-defizienten Personen klinische Symptome oder Reaktionen nach dem Verzehr der Bohnen. Dies weist darauf hin, dass verschiedene Faktoren das Auftreten der Erkrankung beeinflussen. Hier sind der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten und die Menge der verzehrten Bohnen zu nennen [21]. Die Erkrankung tritt am häufigsten nach dem Verzehr von frischen Bohnen auf. Auch Kleinkinder, die noch gestillt werden, unterliegen einem Hämolyserisiko, wenn ihre Mütter Fava-Bohnen zu sich nehmen oder Pollen inhaliert haben [3, 51, 52].

Zu den Hämolyse-auslösenden Bestandteilen der Fava-Bohne gehören Vicine und Convicine die Vorstufen von Divicine und Isomuramil [53]. Sie fungieren, wie bestimmte Medikamente oder Infektionen, als oxidative Stressoren [54].

Bereits 24 Stunden nach Bohnenverzehr kann eine akute hämolytische Anämie auftreten. Tritt eine Hämoglobinurie auf, spricht dies für einen schweren Verlauf im Vergleich zu einer hämolytischen Krise, die durch Medikamente oder Infektionen getriggert wurde. Die auftretende Anämie ist akut und schwerwiegend und kann zu akutem Nierenversagen führen [3].

Durch die oxidative Schädigung der Erythrozyten, kommt es zu morphologischen Veränderungen und im Blutausschlag zeigen sich Heinz-Körperchen und Bite-Zellen. Dies führt zu einer früheren Elimination der Erythrozyten aus dem

Blutkreislauf. Bei schweren hämolytischen Krisen können Blut-Transfusionen notwendig werden [3].

Wie Meloni et *al.* beschreiben, konnte durch Präventions-Kampagnen, neonatale Screenings und Aufklärungsinitiativen das Auftreten von Favismus in Hochrisikogebieten deutlich gesenkt werden [32].

1.2.6.4 Neonataler Ikterus

Der neonatale Ikterus ist am 1.-4. Tag postpartum ersichtlich und tritt im Vergleich zur Alloimmunisation bei Rhesusinkompatibilität zu einem späteren Zeitpunkt und mit deutlicherer Schwere auf [55]. Wird der selten auftretende Kernikterus nicht unverzüglich behandelt, kann er zu schweren irreversiblen zerebralen Schäden führen [56]. Der neonatale Ikterus und der G6PD-Mangel variieren stark in ihrer Häufigkeit und Schwere durch genetische, kulturelle und umweltbedingte Faktoren. Zu diesen Einflussfaktoren zählen die mütterliche Exposition gegenüber oxidativen Medikamenten (s. Tab. 1), pflanzliche Heilmittel und der Effekt von Naphtalen-haltigen Mottenkugeln sowie das Geburtsalter [57, 58]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass 30% der Säuglinge in den USA, die einen Kernikterus aufwiesen, G6PD-defizient waren [59].

Der Pathomechanismus des neonatalen Ikterus bei G6PD defizienten Säuglingen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Hämolyse, so scheint es, trägt weniger dazu bei als die beeinträchtigte Billirubinkonjugation der Leber [60]. Säuglinge, die zusätzlich noch eine Mutation des Uridin-Diphosphat-Glucuronosyl-Transferase 1 (UGT1A1) Gens aufweisen, welches für die Gilbert-Erkrankung verantwortlich ist, sind für einen neonatalen Ikterus besonders gefährdet [61]. Wird der G6PD-Status nicht routinemäßig untersucht, sollten Neugeborene, die eine Hyperbillirubinämie ($>150 \mu\text{mol/L}$) in den ersten 24 h entwickeln, oder Geschwister haben, welche einen neonatalen Ikterus in der Vorgeschichte zeigten, genauer untersucht werden [62].

1.2.6.5 Angeborene nicht-sphärozytisch hämolytische Anämie (CNSHA)

In manchen Patienten führen Varianten des G6PD-Mangels zu chronischer Hämolyse, der sogenannten nicht-sphärozytischen-hämolytischen Anämie (Congenital non-spherocytic haemolytic anaemia- CNSHA), die der Gruppe I der WHO-Klassifikation zugeordnet wird [16]. Diese Varianten gelten als selten und können leichte bis schwere Auswirkungen haben [63].

Die Diagnose dieser Komplikation basiert auf klinischen Befunden, welche normalerweise im Säuglingsalter oder in der Kindheit auftreten. Viele Patienten haben einen schweren neonatalen Ikterus, chronische Anämie mit Exazerbationen, eine Retikulozytose, Gallensteine und Splenomegalie in der Krankengeschichte. Laborchemisch lassen sich erhöhte Billirubin- und Lactose-Dehydrogenase-Konzentrationen bestimmen. Die Hämolyse ist im Vergleich zur akuten hämolytischen Anämie vorwiegend extravaskulär [3].

1.2.6.6 Genetische Modulatoren

Akute und chronische Hämolysen, die durch den G6PD-Mangel entstehen, können durch mitvererbte, genetisch unabhängige erythrozytäre Veränderungen, verschlimmert werden. Dazu gehören beispielsweise Membrandefekte, Thalassämien, der Glucose-6-Phosphat-Isomerase-Mangel, der Pyruvat-Kinase-Mangel und andere Dyserythropoetische Anämien [26].

1.2.7 Therapie und Management

Die effektivste Therapie und Prävention einer akuten Hämolyse in G6PD-defizienten Patienten stellt die Expositionsvermeidung von bekannten oxidativen Stressfaktoren dar. Dazu gehören beispielsweise die bereits genannten Medikamente (s. Tab. 1) oder der Verzicht auf den Verzehr von Fava-Bohnen. Die akut einsetzenden Hämolysen sind normalerweise kurzlebig und bedürfen keiner speziellen Behandlung. In seltenen Fällen, vor allem bei Kindern, kann es zu

transfusionspflichtigen Anämien kommen. Wenn eine akute intravaskuläre hämolytische G6PD assoziierte Anämie vermutete wird sollten alle als gefährlich eingestuften Medikamente abgesetzt werden und der Test nach 10-15 Tagen, oder später bei Transfusion, wiederholt werden. In solchen Fällen ist die genetische Analyse, sofern verfügbar, ratsam [21].

Bei einem neonatalen Ikterus werden Patienten, wie bei einem Ikterus anderer Genese, mit Phototherapie behandelt, wenn die Konzentration des unkonjugierten Billirubin auf über 150 $\mu\text{mol/L}$ ansteigt, um neurologischen Schäden vorzubeugen. Bei Werten von $>300 \mu\text{mol/L}$ kann der Einsatz von Bluttransfusionen notwendig sein [3, 64].

Patienten, die unter einer CNSHA leiden, sollten engmaschig überwacht werden, da jede Art der Verschlimmerung, wie beispielsweise durch Infektionen oder dem Verzehr von Fava-Bohnen, die Anämie deutlich verstärken kann. Antioxidantien wie Vitamin E und Selen scheinen einen positiven Effekt bei chronischen Hämolysen zu haben [65].

.

1.3 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel und Malaria

1.3.1 Prävalenz beider Erkrankungen

Die Malaria ist mit über 216 Millionen Neuinfektionen und rund 445 000 Todesfällen im Jahre 2016 eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen Zeit [66].

In Äthiopien ist Malaria in über 75% des Landes endemisch. Vorherrschend ist *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), gefolgt von *Plasmodium vivax* (*P. vivax*). Dies unterliegt jedoch Schwankungen und ist regional verschieden. In der Region Jimma, im Süd-Westen Äthiopiens, ist die Übertragungswahrscheinlichkeit moderat. Krankheitsgipfel zeigen sich nach der Regenzeit. Wie die Studie von Eshetu et al. zeigte, waren 36-70% der Infektionen abhängig vom Studienort in der Region Jimma, durch *P. vivax* verursacht [67].

Da der G6PD-Mangel höchstwahrscheinlich partiell vor einer Malariainfektion schützt, korreliert er mit der geographischen Verteilung der Malaria weltweit [16]. Die Korrelation zwischen G6PD-Mangel und der Malaria ist offensichtlich, da sich der Mangel vermehrt in Regionen finden lässt, in denen Malaria endemisch ist oder war. Er ist außerdem in Nordamerika weitverbreitet auf Grund von Migration aus Afrika, Asien und Europa [20, 27]. (s. Kapitel 1.2.3) Die Prävalenz der G6PD-Mangels war in der Region Jimma, Äthiopien, bisher nicht bekannt.

1.3.2 Malaria

Die Malaria zählt zu den ältesten und bedeutendsten Infektionskrankheiten der Menschheitsgeschichte. Mit über 216 Millionen Neuinfektionen und fast einer halben Millionen Todesfällen jährlich, stellt sie eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen der heutigen Zeit dar [66]. Die Bezeichnung „Malaria“ kommt aus dem lateinischen „mala aria“ und bedeutet so viel wie „schlechte Luft“. Charles Louis Alphonse Laveran identifizierte den Erreger 1888 und Ronald Ross schließlich die *Anopheles*-Mücke als Vektor im Jahre 1897 [68].

Die Malaria wird durch Protozoen der Gattung Plasmodien hervorgerufen. Im Menschen relevant sind fünf Spezies. Die Malaria quartana wird von *P. malariae*, die Malaria tertiana von *P. vivax* und *P. ovale* und die Malaria tropica von *P. falciparum* ausgelöst. *P. knowlesi*, ursprünglich eine Malaria in Affen, wird in Südostasien gebietsweise vermehrt in Menschen beobachtet. Die Plasmodien werden von weiblichen blutsaugenden *Anopheles*-Mücken übertragen [69].

1.3.2.1 Entwicklungszyklus der Plasmodien

Der Mensch dient als Zwischenwirt. In ihm erfolgt die asexuelle Phase, die sogenannte Schizogonie. Sie wird in zwei verschiedene Entwicklungsstadien unterteilt: die prä-erythrozytäre Phase in der Leber (sog. Gewebeschizogonie) und die erythrozytäre Phase in den Erythrozyten (sog. erythrozytäre Schizogonie). Die *Anopheles*-Mücke wird als Haupt-oder Endwirt bezeichnet. In ihr erfolgt die sexuelle Phase der Erreger, die sogenannte Sporogonie.

1.3.2.1.1 Sporogonie

Die *Anopheles*-Mücke saugt bevorzugt in der Abenddämmerung Blut. Trifft sie hierbei auf einen malariaerkrankten Menschen, nimmt sie beim Saugakt gametozytenhaltiges Blut auf und die sexuelle Phase die sogenannte Sporogonie beginnt. Die Gametozyten, weibliche und männliche Geschlechtsstadien der Plasmodien, wandern in den Magen der Mücke und reifen dort unter Ausbildung einer Geißel zu männlichen reifen Mikrogametozyten heran. Mikro- und Makrogamet verschmelzen zur Zygote. Die Zygote entwickelt sich weiter zur Ookinete, welche den Magen der Mücke durchsetzt und an dessen Außenwand die Oozyste bildet, die massenhaft Sporozoiten enthält. Die Oozyste rupturiert nach erfolgter Heranreifung und setzt auf diesem Wege zahlreiche Sporozoiten frei, welche in die Speicheldrüse der Mücke einwandern. Sticht die Mücke nun erneut einen Menschen um Blut zu saugen, gelangen Sporozoiten ins menschliche Blut.

Der Entwicklungszyklus ist somit geschlossen und dauert temperaturabhängig bei über 16°C 8-16 Tage [69].

1.3.2.1.2 Schizogonie

1.3.2.1.2.1 Prä-erythrozytäre Phase (Gewebeschizogonie)

Durch den Stich der *Anopheles*- Mücke gelangen Sporozoiten in die Blutbahn des Menschen, in welchem sie direkt die Hepatozyten der Leber befallen. Hier findet der so genannte extra-erythrozytäre Zyklus statt und die Sporozoiten entwickeln sich zu Schizonten. Innerhalb von 6 bis 15 Tagen reifen sie artspezifisch zu Merozoiten. Die Merozoiten verlassen die Leber und gelangen in die Blutbahn. Bei einer Infektion mit *P. falciparum*, *P. knowlesi* oder *P. malariae* reifen alle Merozoiten in der Leber aus und verursachen bei der Freisetzung ins periphere Blut eine Parasitämie. Bei einer Infektion mit *P. ovale* oder *P. vivax* verbleibt ein Teil der Plasmodien, als ruhende Form, so genannte Hypnozoiten, in der Leber. Aus ihnen können wiederum nach Monaten bis Jahren, Merozoiten heranwachsen und somit zu einem Rezidiv der Malaria führen [69].

1.3.2.1.2.2 Erythrozytäre Phase

In der Erythrozytären Phase dringen die Merozoiten in die Erythrozyten ein und werden ab diesem, dem sogenannten erythrozytären Zyklus, als Trophozoiten bezeichnet. Die Trophozoiten treten ringförmig in den Erythrozyten auf und entwickeln sich zu Schizonten. Diese teilen sich wiederum abhängig von der Art des Plasmodiums in Merozoiten. Durch die Ruptur der Erythrozyten gelangen die Merozoiten in die Blutbahn und befallen erneut Erythrozyten. Somit wird der erythrozytäre Vermehrungszyklus fortgesetzt. Die befallenen Erythrozyten unterscheiden sich morphologisch je nach Plasmodiumart voneinander. Wenige Merozoiten entwickeln sich zu den bereits erwähnten Geschlechtsformen, den

männlichen Mikrogametozyten und den weiblichen Makrogametozyten. Diese sind je nach Plasmodiumspezies morphologisch verschieden. Meist eine Woche nach dem Auftreten der Parasitämie, sind spärlich mit periodischen Schwankungen, Gametozyten im peripheren Blut zu finden. Beim Stich der Anopheles-Mücke wird nun gametozytenhaltiges Blut aufgenommen (s.o.) und der Kreislauf schließt sich [69].

1.3.2.2 Klinik

Die allgemeinen Symptome einer Malaria-Infektion sind wenig spezifisch. Es kommt zunächst zu grippe-ähnlichen Symptomen die mit Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen, Müdigkeit und gegebenenfalls Husten einhergehen. Auch Bauchschmerzen und Diarrhöen sind keine Seltenheit [70]. Im Verlauf entwickelt sich eine Anämie, eine Thrombozytopenie ist typisch.

Aufgrund komplexer Pathomechanismen kann eine Malaria-Infektion, insbesondere mit *P. falciparum*, zu vital bedrohlichen Organschäden sowie zum Tod führen. Eine schwere Malaria wird laut WHO durch klinische Merkmale, laborchemische Merkmale oder schwere Organdysfunktion definiert. Nahezu alle Todesfälle von schweren Malaria-Infektionen werden durch eine Infektion mit *P. falciparum* ausgelöst. Einen allgemeinen Überblick über die Merkmale eines schweren Verlaufs zeigt Abb. 10. Das höchste Risiko tragen Kinder aus Hoch-Risikogebieten und Touristen aller Altersklassen aus Ländern, in denen Malaria nicht endemisch ist, d.h. Nicht-Immune. Das Risiko ist außerdem im zweiten und dritten Trimester der Schwangerschaft, bei HIV positiven oder an AIDS erkrankten Patienten sowie bei splenektomierten Patienten erhöht. Laut WHO liegt eine schwere Malaria-Infektion bei den in Abb. 10 genannten klinischen Merkmalen vor. Diese können einzeln oder kombiniert auftreten [70].

Klinische Merkmale	Laborchemische Merkmale
Blutungsneigung	Schwere normozytäre Anämie <5g/dl Hämoglobin
Bewusstseinsbeeinträchtigung bis hin zu Koma	Hyperparasitämie
Erschöpfung	Hyperlactatämie > 5mmol/l
Multiple Krampfanfälle innerhalb von 24 h	Metabolische Azidose
Kussmaulatmung	Hämoglobinurie, Serum-Kreatinin > 265 µmol/l
Akutes Lungenödem und Akutes Atemnotsyndrom (ARDS)	Hypoglycämie (< 2,2 mmol/l oder < 40 mg/dl)
Schock	
Akutes Nierenversagen	
Ikterus mit Hinweis auf weitere organische Dysfunktion	

Abb. 8: Merkmale der schweren Malaria-Infektion aus [70]

Es lassen sich Unterschiede im Vergleich zu anderen Plasmodiumarten im Fiebertyp finden. Hierbei zeigt sich bei der Infektion mit *P. falciparum* kein periodisches Fieber. Im Vergleich dazu, zeigen sich bei *P. vivax* und *P. ovale* alle 48h ein Fieberschub aufgrund des Freiwerdens der Merozoiten. Bei *P. malariae* erfolgt der Fieberschub alle 72 h mit einem 2-Tägigen fieberfreien Intervall und bei *P. knowlesi* alle 24 h [69].

1.3.2.3 Plasmodium vivax

Für eine lange Zeit galt die Malaria tertiana, verursacht durch *P. vivax*, mit über 70-390 Millionen Neuinfektionen, als die harmlosere Form der Malaria [71]. Jedoch mehrten sich in den letzten Jahren die Berichte über schwere, teils tödliche Verläufe [72]. Besonders Patienten, welche weitere Grunderkrankungen aufweisen, sind einem erhöhten Risiko ausgesetzt. In einigen Regionen wird mit Abnahme der Malaria tropica in Verbindung mit der Etablierung von Artemisinin-basierten-Kombinationstherapien eine Zunahme von *P. vivax* Infektionen beobachtet [73]. Es wirken Resistenzen gegenüber Chloroquin (CQ) und die Nicht-Behandlung von Hypnozoiten einer effektiven Bekämpfung der Malaria tertiana entgegen [74].

Hypnozoiten entstehen während der ersten Infektion mit *P. vivax* und können ab dem 16. Tag bis zu mehreren Jahre nach Infektion zu Rezidiven führen. Die Zeit, bis ein Rezidiv auftritt, ist abhängig vom Stamm. In tropischen Gebieten treten

Rezidive meist innerhalb der ersten 6 Monate auf (beispielsweise der Chesson Stamm aus PNG), in subtropischen-gemäßigtem Klima meist erst später (beispielsweise der Nord-Korea Stamm) [75]. Eine sichere Unterscheidung zwischen Rezidiv und Rekrudescenz ist jedoch bei sehr frühen Rezidiven nicht möglich [76]. In moderaten Klimata ist es für den Parasiten essentiell, in den Trocken- und Kälteperioden im Wirtskörper zu überleben. Die durchschnittliche Zeit bis zum Rezidiv beträgt 6-12 Monate. In Äthiopien entwickelten 50% der *P. vivax* Patienten, in den ersten 3 Monaten nach Erstinfektion, ein Rezidiv [77].

1.3.2.4 Plasmodium falciparum

Das *P. falciparum*, Auslöser der Malaria tropica, ist hauptsächlich für tödliche Verläufe, meist in Kindern, verantwortlich [78]. *P. falciparum* befällt alle Erythrozytenstadien und kann daher zu einer unbegrenzten Parasitämie führen [69]. Gametozyten sind für die Übertragung von der Malaria zwischen Mensch und Mosquito verantwortlich. Sie entwickeln sich während der akuten Malaria-Infektion und können mindestens vier Wochen nach Infektion fortbestehen. Die Studie von Eshetu et al., 2012 mit an *P. falciparum* erkrankten Patienten aus der Region Jimma und Umgebung zeigte eine Gametozytämie bei Aufnahme von ca. 10%, die mittels Mikroskopie festgestellt wurde. Submikroskopische Entwicklungsstadien wurden nicht erfasst [67].

1.3.2.5 Therapie

Das einzige von der WHO empfohlene Medikament, für die Behandlung von Hypnozoiten bei *P. vivax*- und Gametozyten bei *P. falciparum*-Infektionen, ist das 8-Aminoquinolon Primaquin (PQ). Die WHO empfiehlt die tägliche Gabe von 0,25-0,5 mg/kg, angepasst an das Körpergewicht über 14 Tage. Die Gabe von PQ besonders in Gebieten der Sub-Sahara, ist jedoch durch schwere Nebenwirkungen bei einem gleichzeitig vorhandenen G6PD-Mangel eingeschränkt. Eine G6PD-Enzymaktivitätsmessung vor der Gabe von PQ, ist laut WHO ab einer Prävalenz des

Mangels von >3-5% unbedingt empfohlen und PQ sollte nicht gegeben werden, wenn die Enzymaktivität unter 30% liegt [79]. Für das langwirksame Tafenoquin (TQ), ein weiteres 8-Aminoquinolon welches 2018 zugelassen werden soll, liegen bisher wenige Daten vor. Der empfohlenen Grenzwert in der Zulassungsstudie lag bei einer Enzymaktivität von 70%, bei anämischen Frauen bei 90% (7-10 mg/dL) [47]. Laut Ley et al. soll der Grenzwert bei der Zulassung für TQ bei 70-80% liegen [45].

Artemisin-Kombinationspräparate (ACT) als Standard-Therapie für *P. falciparum* zeigen gute Wirksamkeit gegenüber asexuellen Formen jedoch ist der Effekt gegenüber Gametozyten limitiert [73]. Aus diesem Grund sind Patienten häufig stumme Gametozytenträger noch Wochen nach der Behandlung der akuten Infektion. Dies führt wiederum zu erneuten Infektionen. Die Häufigkeit einer asymptomatischen Parasitämie ist in der Region Jimma unbekannt. Da PQ gegen reife Gametozyten wirksam ist, wird es als Einmaldosis mit 0,25-0,5 mg/kg KG in Kombination mit ACT bei Patienten mit *P. falciparum* Malaria empfohlen, um die Übertragungswahrscheinlichkeit zu reduzieren. Diese Kombination kann in Gebieten mit niedriger Übertragungsrate auch ohne die Testung eines G6PD-Mangels gegeben werden [46, 80-82].

2. Fragestellung und Zielsetzung

Für die Behandlung der Malaria, speziell der durch *P. vivax* verursachten Form, mit PQ ist eine G6PD-Mangel-Testung unausweichlich. In der vorliegenden Studie wurde die Prävalenz des G6PD-Mangels in Freiwilligen aus der Region Oromiya, einem malaria-endemischen Gebiet in Äthiopien, erstmalig untersucht. Dabei kam der kommerzielle G6PD-Schnelltest BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA) zur Anwendung, der mit dem Goldstandard der Spektrophotometrie verglichen wurde. Ergänzend erfolgte eine Genotypisierung der Proben, die eine verminderte G6PD-Aktivität aufwiesen. Zusätzlich wurde ein Hämoglobinopathie- und Parasitämie-Screening in die Untersuchungen einbezogen.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1 Studienort, Patienten, Proben

3.1.1 Studienort Jimma und Umgebung

Jimma ist die Hauptstadt der Jimma Region im Oromyistaat, 355 km südwestlich von Addis Abeba, Äthiopien und liegt 1780 m über dem Meeresspiegel. Die Jimma Region ist ein endemisches Malariagebiet mit saisonalen Schwankungen und Übertragungsgipfeln zwischen Oktober und Dezember (major peak) sowie von April bis Mai (minor peak) [67].

Plasmodium falciparum ist landesweit die dominante Spezies, dicht gefolgt von *P. vivax*. Die Prävalenz von *P. vivax* in Jimma und der näheren Umgebung schwankt zwischen 5-70%. Die Rezidivrate ist unbekannt, ebenso die G6PD-Prävalenz.

In die Studie wurden 206 gesunde Teilnehmer ohne chronische Erkrankungen und unbekanntem G6PD-Status aufgenommen. Sie wurden an der Jimma University in Jimma zwischen März und Juni 2014 rekrutiert. Die Teilnahme an der Studie war

freiwillig. Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung und einem schriftlichen Einverständnis wurden Fragebögen ausgefüllt und Blutproben abgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommissionen der Jimma University und der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und genehmigt.

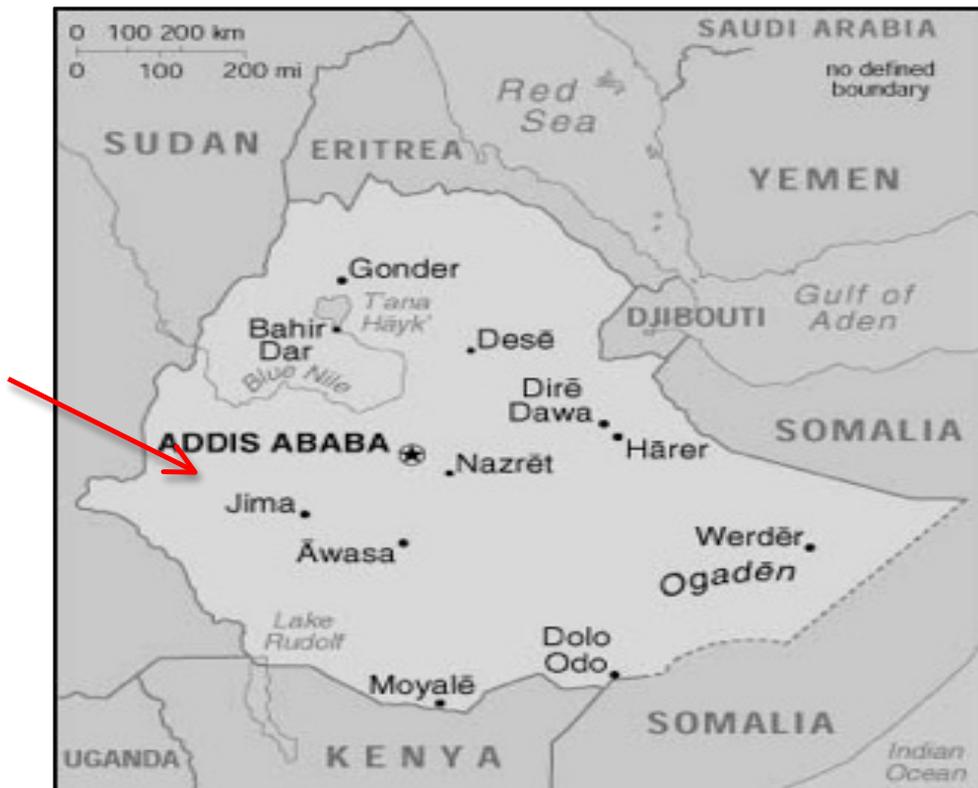


Abb. 9: Studienort Jimma und Umgebung

3.1.2 Patientenauswahl, Einschlusskriterien und Fragebogen

Die Einschlusskriterien der G6PD-Studie waren: Lebensalter über 18, eine unterschriebene Einverständniserklärung, permanenter Wohnort im Forschungsgebiet und die Bereitschaft zu einem Gespräch über die Ergebnisse der Analyse im Studienzentrum.

Die Ausschlusskriterien waren: eine akute oder lebensbedrohliche Erkrankung, Schwangerschaft, Stillzeit und die Teilnahme an einer anderen Studie. Alle klinischen Daten wurden in studienspezifischen medizinischen Berichtunterlagen

(CRF) festgehalten und in eine elektronische Datenbank in München durch doppelte Eingabe übertragen. Persönliche Daten wurden vertraulich behandelt und verschlüsselt gespeichert. Alle Mitarbeiter haben eine Verschwiegenheitserklärung unterschrieben. Die Fragebögen wurden wiederholt kontrolliert und von der Studienkoordinatorin unter striktem Zugriff verwaltet.

Der Datentransport nach Deutschland wurde gemäß nach etablierten Standards und auf vertraglicher Basis zwischen den Partnern durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte nach dem gültigen deutschen Gesetz.

3.1.3 Procedere und Probenentnahme

Nach der Zustimmung zur Studienteilnahme wurden nach Venenpunktion 2,7 ml Blut in EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat)-Vollblut-Röhrchen abgenommen. Die Personalien, Adresse, Alter, Geschlecht, Grunderkrankungen und Medikamente des Patienten wurden auf dem Fragebogen notiert. Die Blutproben wurden verschlüsselt markiert.

In jedem Fall wurde mit dem Patienten vereinbart, dass dieser das Studienzentrum wieder aufsucht, um sich das Ergebnis seiner Probe und der Studie abzuholen und erklären zu lassen. Es wurde von allen Studienteilnehmern die Telefonnummer zur Kontaktaufnahme auf den Fragebögen vermerkt.

3.2 Material

3.2.1 Labormaterial

Bezeichnung	Firma
Handschuhe Vasco® Basic	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer 500 Stück 4x5cm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Multifly-Kanüle 0.8x 19mm, grün	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt S-Monovetten EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Filterpapier Whatman No 3	Sigma Aldrich jetzt Merck, Darmstadt, Deutschland
Menzel Objektträger	Thermo Fischer scientific, Waltham, MA, USA
Malaria- Schnelltest Binax NOW® Malaria	Alere Inc., Scarborough, Main, USA
G6PD- Schnelltest BinaxNOW® G6PD	Alere Inc., Scarborough Main, USA
Pipettenspitzen 0,2ml	Gilson, Middleton, WI, USA
Druckverschlussbeutel	ElkePlastic®, Rielasingen- Worblingen Deutschland

3.2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Giemsa	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Digitonin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trap (Puffer pH 7,5)	
- 9,3 g Triethanolamine hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- 2,0 g Ethylenediamineetraacetic acid	Sigma Aldrich jetzt Merck, Darmstadt, Deutschland
- 1000 ml Aqua destilata	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
G6P	Sigma Aldrich jetzt Merck, Darmstadt, Deutschland
NADP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp® DNA Blood Mini Primer (s. Tab. 3)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DTCS Quick start Mix	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA

3.2.3 Geräte und Software

Bezeichnung	Firma
Pipette 1-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Haemocue	Haemocue AB, Ängelholm, Schweden
Spektrophotometer Amersham Bioscience IL3100 pro	Artisan Technology Group, IL, USA
Thermocycler T100™ Thermal Mutation surveyor	BioRad, Hercules, CA, USA Softgenetics, State College, PA, USA
Stata 14	StataCorp LLC, College Station, TX, USA

3.3 Methoden und Durchführung

Die folgenden Tests wurden von mir innerhalb von 6 Stunden nach Blutentnahme im parasitologischen Labor in Jimma durchgeführt.

3.3.1 Hämoglobinnmessung

In Jimma wurde die Hämoglobinkonzentration in 15 µl Blut, mittels eines Haemocue AB (Ängelholm, Schweden) gemessen.

Hierfür wurde das Blut vor der Messung erneut geschüttelt und die Küvette in einem Zug befüllt. Es wurde streng darauf geachtet das keine Luftblasen vorhanden waren und die Küvette vollständig befüllt war. Die Küvette wurde in den Küvettenhalter des Haemocue AB Gerätes eingelegt und in die Messposition geschoben. Nach 15-60 Sekunden wurde der gemessene Hämoglobinwert abgelesen und notiert. Anschließend wurde die benutzte Küvette ordnungsgemäß entsorgt.

3.3.2 Blutausstrich

Im Labor wurden ein dicker sowie ein dünner Tropfen klassischerweise mit Hilfe von zwei Objektträgern mit jeweils 10 µl EDTA-Blut angefertigt. Die Objektträger wurden hierzu beschriftet.

3.3.2.1 Dicker Tropfen

Der dicke Tropfen wurde mit 7,5 µl Blut angelegt und für 20 min getrocknet. Es erfolgte die Fixierung mit Methanol und anschließend die Anfärbung mit Giemsa-Lösung für 20 min. Die Objektträger wurden vorsichtig mit Wasser gespült und erneut getrocknet.

3.3.2.2 Dünner Tropfen

Der dünne Tropfen wurde mit 7,5 µl Blut angefertigt und für 10 min getrocknet. Es erfolgte die Fixierung mit Methanol und anschließend die Anfärbung mit Giemsa-Lösung für 20 min. Die Objektträger wurden vorsichtig mit Wasser gespült und erneut getrocknet.

3.3.3 Filterpapier

In Jimma wurden für mögliche weitere molekulare Untersuchungen des g6pd Gens, 6 x 15 µl Vollblut auf Filterpapier (Whatman No 3) getropft, bei Raumtemperatur getrocknet und in luftdicht verschlossene Tüten verpackt. Alle Filterpapiere wurden beschriftet und bei -20°C im Gefrierschrank bis zum Transport nach Ulm gelagert. Während des Transports waren die Filterpapiere ca. 48 Stunden Raumtemperatur ausgesetzt.

3.3.4 Malaria-Schnelltest

In Jimma wurde ein kommerzieller Malaria-Schnelltest (BinaxNOW® Malaria, Alere Inc., Main, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen immunochromatographischen Antigen-Antikörper Test.

Hierfür wurde der Schnelltest erst kurz vor dem Gebrauch aus seiner Schutzfolie entnommen und beschriftet. Anschließend wurden 15 µl Blut auf das dafür vorgesehene Reaktionspad pipettiert. Zusätzlich wurden 4 Tropfen von Reagenz A auf das Reaktionspad getropft und 4 weitere Tropfen auf das hierfür vorgesehene freie Feld auf der linken Seite des Tests. Anschließend wurde der Klebestreifen entfernt und der Schnelltest wurde geschlossen und versiegelt. Nach 15 Minuten konnte das Ergebnis durch das Betrachtungsfenster abgelesen und notiert werden. Eindeutig negativ ist der Schnelltest, wenn nur ein Streifen sichtbar wird (vgl. hierzu Abb. 10).

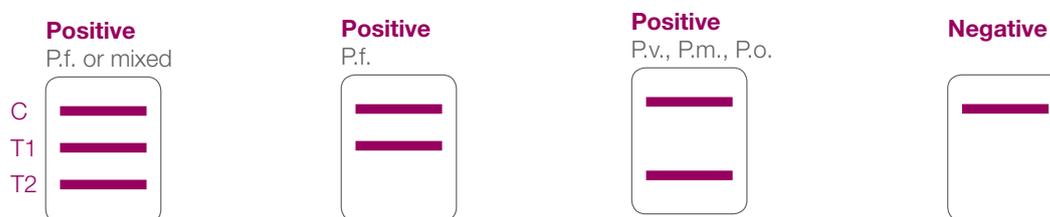


Abb. 10: Mögliche Testergebnisse des BinaxNOW® Malaria Schnelltests (Alere Inc., Main, USA) [83].

3.3.5 G6PD-Schnelltest (RDT-Rapid diagnostic test)

Der kommerzielle G6PD-Schnelltest BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA) wurde anhand der Bedienungsanleitung des Herstellers, wie folgt durchgeführt:

Mit Hilfe des BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA)-Schnelltestes erfolgte die Beurteilung der Enzym-Aktivität der Proben.

Hierzu wurde der Schnelltest erst unmittelbar vor Gebrauch aus der Schutzfolie entnommen, beschriftet und unter Raumtemperatur (18-25°C), vor direkter Lichteinstrahlung geschützt, durchgeführt. Der Ampulle wurden vor Gebrauch 70 µl von Reagenz A zugeführt. Anschließend wurde diese mit 10 µl Vollblut vermischt, in dem die Blutprobe mit Hilfe einer Pipette drei Mal mit dem Reagenz A vermischt wurde. Anhand des Pfeiles auf dem Testsystem konnte die Position des weißen Pads entnommen werden, auf welches langsam 50 µl der Probe pipettiert wurden. Nachdem die Oberseite des Reaktionspads vollständig bedeckt

war, wurde der Klebestreifen entfernt und der Schnelltest geschlossen und versiegelt. Nach 7 Minuten konnte der Test durch das Betrachtungsfenster abgelesen und bewertet werden. Die Ergebnisse basieren auf optischer Direktablesung. Der Test ist positiv und die untersuchte Probe defizient, wenn sich die Farbe der Probe nicht ändert und hellrot bleibt. Die Probe ist nicht defizient, wenn der obere Rand des Pads einen dunkel-bräunlichen Rand aufweist S. Abb. 12 und Abb. 13).

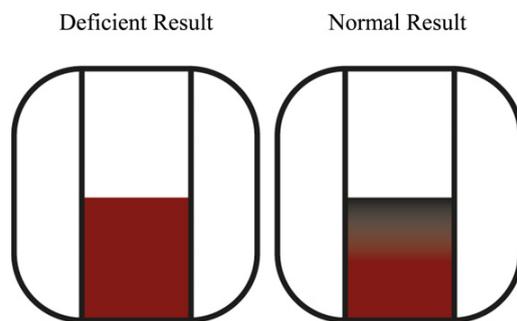


Abb. 11: Farbveränderung eines BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA) Schnelltests mit einer G6PD defizienten Probe und einer Probe mit einer normalen G6PD-Aktivität aus Tinley et al. [84]

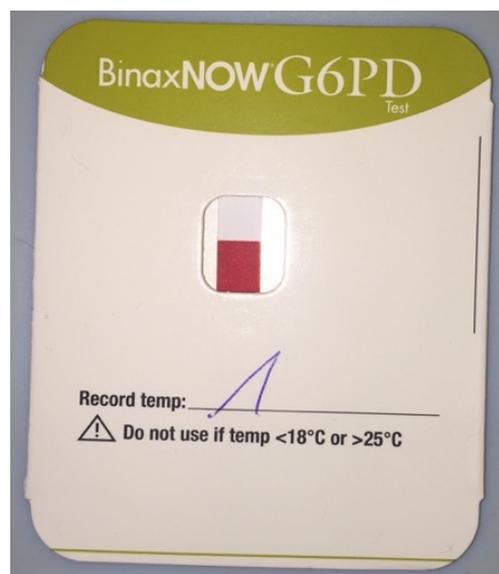


Abb. 12: Bild des BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA) Schnelltests mit einer eindeutig G6PD-defizienten Kontrollproben aus dem Hämoglobinlabor in Ulm.

3.3.6 Hämoglobinelektrophorese

3.3.6.1 Grundprinzip

Mit Hilfe der Hämoglobinelektrophorese werden Proteine, die auf eine Membran aufgetragen werden, in einem elektrischen Feld getrennt und durch Färbung sichtbar gemacht

3.3.6.2 Durchführung

Die Untersuchung erfolgte im Hämoglobinlabor der Universität Ulm. Die Untersuchung auf Thalassämien erfolgte mit Hilfe einer Hydragel-Elektrophorese mit einem pH von 8,6.

3.3.7 Spektrophotometrie

3.3.7.1 Grundprinzip

Mit Hilfe der Spektrophotometrie können Konzentrationsbestimmungen durch die Messung der Lichtdurchlässigkeit, bei verschiedenen Wellenlängen, bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um eine quantitative Bestimmung die mittels Spektrophotometers gemessen wird. Es wird die Absorption eines Moleküls, abhängig von der Wellenlänge oder umgekehrt von Absorptionsspektren, zur Identifizierung von Stoffen bestimmt.

3.3.8.2 Durchführung

Die Untersuchung erfolgte im Hämoglobinlabor der Universität Ulm. Nach der Blutentnahme wurde das EDTA Röhrchen bei 4°C bis zum Transport in das Hämoglobinlabor der Universität Ulm gelagert. Der Transport erfolgte via DHL und wurde innerhalb von 10 Tagen nach Abnahmedatum vollzogen. Im Hämoglobinlabor in Ulm wurde die spektrophotometrische G6PD-Aktivitäts-Messung durchgeführt. Für die Messung wurden 2 ml Blut zentrifugiert und die

roten Blutkörperchen gewaschen. Anschließend wurden 0,6 ml Digitonin, 2 ml H₂O, 1,4 ml Trap Buffer (bestehend aus Triethanolamin hydrochlorid und Ethylenediamine tetraacetic acid auf 1000ml aqua destilata) hinzugefügt und mit Hilfe von NaOH ein pH von 7,5 eingestellt.

Die Proben wurden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und nach 10 min erneut zentrifugiert. Nach der Zugabe des G6PD-Enzymes, wurde die Aktivität und die Reduktionsrate von NADP zu NADPH gemessen und mit Hilfe des Spektrophotometers (IL3100 pro, Amersham Bioscience, Artisan Technology Group, IL, USA) bei 366nm bestimmt. Die Ergebnisse der G6PD Aktivitäts-Messung wurden in Units per mMol metabolic rate/10¹¹ Erythrozyten/ Min (Normaler Wert: 30,5± 4,5) angegeben.

3.3.8 Genotypisierung

3.3.8.1 Grundprinzip

Für die Genotypisierung wurde die DNA aufgereinigt und anschließend eine PCR vorgenommen. Es folgten eine Agarose Gelelektrophorese und die Sequenzierung.

Die PCR-Methode dient zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Bei dieser Methode werden die Proben in mehreren Durchläufen bei verschiedenen Temperaturen erhitzt. Der theoretische Ablauf beinhaltet drei Schritte:

1. **Die Denaturierung:** Hier erfolgt die Trennung der Doppelstränge in zwei Einzelstränge bei 94-96°C.
2. **Die Primerhybridisierung:** Anlagerung des Primers bei 50-60°C.
3. **Die Elongation:** Vervollständigung des DNA-Einzelstranges zu einem DNA-Doppelstrang bei 68-72°C mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die sich an den Primerkomplex aus Schritt 2 anlagert.

Im Thermocycler erfolgen die oben genannten Schritte in zyklischen Wiederholungen (30-50x). Hierbei wird der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt. Die Agarose Gelelektrophorese dient der Identifizierung von DNA-Bruchstücken, welche mit Hilfe eines elektrischen Feldes und ihrer Größe getrennt werden. Die verschiedenen Fragmente wandern abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell und können anschließend mit einer DNA-Leiter (100bp) in einem UV-Transilluminator abgelesen werden. Die Sequenzierung dient der genauen Bestimmung der Basenabfolge eines bestimmten DNA-Abschnittes.

3.3.8.2 Durchführung

Die Untersuchung erfolgte im Hämoglobinlabor der Universität Ulm.

Für die Genotypisierung wurde die DNA mit Hilfe von QIAamp®, DNA Blood Mini Kit von Quiagen nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde eine PCR vorgenommen (Beckman Coulter CEQ 8800, DTCS Kit) mit My Taq HS mix (Hot start mix) Bionline®, mit den folgenden cycling Bedingungen: 10 Zyklen Denaturierung bei 98°C für 15 sec, Hybridisierung bei 68°C für 1 min und Elongation bei 72°C für 1 min 30 sec. Gefolgt von 25 Zyklen bei 98°C für 15 sec, 58°C für 30 sec und 72°C für 1 min 30 sec gefolgt von einer finalen Elongation von 10 min bei 72°C.

Die Agarose Gelelektrophorese und die Reinigung mit QIAquick® PCR Purification Kit wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Sequenzierung wurde in Ulm durch Herrn Brintrup durchgeführt und analysiert mit Hilfe von Analyse Mutation Surveyor, Softgenetics®. Folgende Primer wurden nach bereits vorhandenen Protokollen verwendet (s. Tab. 3). Die Nukleotid Sequenzen wurden mit G6PD-Sequenzen der GenBank verglichen [85].

Tab. 4: Primersequenzen

Name	Sequenz 5'-3'		
G6PD_X153760116	TGTGCAGCTGAGGTCAATGG		ex13 R
G6PD_X153761532	ACTCGAGATGGACCAGGGTG	ex9 F	
G6PD_X153762859	ATGACCCTCTGGCTCAACAC		ex5 R
G6PD_X153764607	CGCAGGAGATGCGTTTATGTC	ex3 F	
G6PD_X153761674	GTGGTGACTTCTCCGGGGTT		ex8 R
G6PD_X153762867	GTGGTGACTTCTCCGGGGTT	ex6 F	
G6PD_12970-20-F	GAGGGTCATCTGGGAACACA	ex6 F	
G6PD_11852-20-R	GAGAAAACGCAGCAGAGCAC		ex4 R
G6PD_12051-20-F	GACGGGGACACTGACTTCTG	ex5 F	
G6PD_12478-20-R	CGCTCATAGAGTGGTGGGAG		ex5 R
G6PD_13631-20-R	AGGAGCTCCCCAAGATAGG		ex7 R
G6PD_13773-20-F	GGAAGACAAGGGGGATCAGG	ex8 F	
G6PD_14079-18-R	GCATGCACACCCAGCTC		ex8 R
G6PD_14624-20-F	GTGGGATGGTAGGTGATGCC	ex10 F	
G6PD_15515-20-R	TTCATCAGCTCGTCTGCCTC		ex12 R
G6PD_01253-20-F	CATCAACCACTCCCAATGC	ex2 F	
G6PD_01677-20-R	GATCCTGGCGCACTAGCAG		ex2 R

3.3.9 Statistik

Alle Daten aus den Fragebögen und alle Laborergebnisse wurden in Excel eingegeben und mit Hilfe von Stata 14 analysiert. Relevante kontinuierliche Daten wurden zusammengefasst mit Hilfe der folgenden Parameter.

Median, Quartile, Range (Spektrum), Mittelwert und Standard-Abweichung bei Normalverteilung.

Kategorische Daten sind in Kontingenztabellen aufgeführt und die Häufigkeiten und Prozentangaben der jeweiligen Werte aufgeführt. Die durchschnittliche prozentuale G6PD-Aktivität für Männer wurde mit Hilfe von Kahn et al. beschrieben [86]. Für die Berechnung des durchschnittlichen Wertes werden Männer mit einem sehr schweren Mangel (<10% des medianen Wertes) ausgeschlossen. Die Cut-off Werte werden nach bereits bestehenden Empfehlungen wie folgt definiert (10%, 30%, 70% und 80%).

4. Ergebnisse

4.1 Studienpopulation und Fragebogen

Bei der untersuchten Personengruppe wurden folgende Ergebnisse erhoben:

In der Oromiya Region, im süd-westlichen Äthiopien, wurden von Mai bis Juni 2014, an der Universität Jimma, insgesamt 206 Studienteilnehmer rekrutiert. Direkt aus Jimma Stadt kamen 51 (24,8%) der Studienteilnehmer. Viele kamen ursprünglich aus kleinen Dörfern und Städten in der Nähe Jimmas in der Oromiya Region und wurden als solche eingeschlossen. Somit kamen aus der Region Oromiya, ohne Jimma Stadt eingerechnet, 131 (63,6%) Teilnehmer. 10 (4,8%) der Studienteilnehmer wurden in Addis Abeba geboren (non-endemisches Malariagebiet) und sind dort aufgewachsen. Andere Ursprungsorte waren die Regionen Somali, Harar, Amhara (Bahir dar) und Gondar, aus denen 14 (6,8%) der Teilnehmer stammten. Alle Regionen, bis auf die Hauptstadt Addis Abeba, sind mehr oder weniger endemische Malaria Gebiete mit höheren Prävalenzen in ländlichen und tiefer gelegenen Regionen (s. Tab. 5).

Das Alter der getesteten Personen lag zwischen 18 und 45 Jahren, der Median lag bei 22 Jahren (Interquartilsabstand (=Interquartile Rangee (IQR)) 21:24). Nur 20,4% der Teilnehmer waren weiblich. Die Studienpopulation enthielt keine Patienten, bei welchen in der Anamnese hämolytische Krisen, akute Malaria-Infektionen, asymptomatische Parasitämien oder Thalassämien bekannt waren.

Keiner der Teilnehmer hatte Fieber oder eine relevante Erkrankung. Zwei Teilnehmer berichteten von einer Malaria Erkrankung in der Vorgeschichte. Von Nebenwirkungen nach Medikamenteneinnahme wurden bei Norfloxazin (1), Ciprofloxazin (1), Quininen (1), Erythromycin (1), Amoxicillin (2), Cotrimoxazol (1) berichtet, diese konnten aber nicht genauer spezifiziert werden.

4.2 Hämoglobinmessung

Der durchschnittliche Hämoglobinwert (Hb-Wert) betrug bei den Männern 17,1 mg/dL (Bereich 14,2-23,3), beziehungsweise für Frauen 14,3 mg/dL (Range 11,9-23,0). Es gab nur eine leicht anämische Frau, die einen Hb-Wert von unter 12 mg/dL aufwies. Insgesamt zeigten 38 (23%) männliche Teilnehmer und 5 (11,6%) weibliche Teilnehmer einen erhöhte Hb-Wert über 18 mg/dL bzw. über 16 mg/dL (s. Tab. 5). Der durchschnittliche Hb-Wert, der in Jimma direkt mittels HaemoCue (Haemocue AB, Ängelholm, Schweden) im parasitologischen Labor gemessen wurde, betrug 16,4 mg/ dL (95% CI 16,08-16,69). Verglichen hierzu betrug der Hb-Wert welcher im Hämoglobinlabor in Ulm gemessen wurde 16,9 mg/dL (95% CI 16,65-17,23).

4.3 Blutausstrich

Alle Blutausstriche waren morphologisch und parasitologisch unauffällig.

4.4 Malaria-Schnelltest

Der Malaria-Schnelltest war in allen Proben negativ.

4.5 G6PD-Schnelltest

Der RDT zeigte für alle Proben negative Ergebnisse. Es konnte nicht zwischen niedrigeren und höheren Werten innerhalb der Teilnehmergruppe unterschieden werden. Alle Proben mit leicht erniedrigten Enzymaktivitäten (70-80%) in der spektrophotometrischen Messung wurden vom Schnelltest als normal getestet. Beide Kontrollproben aus dem Hämoglobinlabor in Ulm mit ausgeprägten Mangel (<10%) wurden als richtig positiv getestet (Vergleiche Abb. 11 und 12).

4.6 Hämoglobinelektrophorese

Es wurden keine Sichelzellanämie, Hämoglobin E oder eine Thalassämie gefunden. Somit wurde einer der wichtigsten genetischen Modulatoren des G6PD-Mangels ausgeschlossen.

4.7 Spektrophotometrie

Die Untersuchung mittels Spektrophotometrie im Hämoglobinlabor in Ulm ergab verwendbare Ergebnisse für 204 Probanden. Die durchschnittliche Aktivität in $\mu\text{Mol metabolic rate}/10^{11}\text{erythrocytes}/\text{min}$ betrug 29,1 (Bereich: 19,2-48,6) für die männlichen Teilnehmer und 29,6 (Bereich: 20,8-42,2) für die weiblichen Teilnehmer (Normwerte = $30,5 \pm 4,5$) (s. Tab. 6). Die Ergebnisse wurden mittels folgender Formel in Units pro Hämoglobin (U/g Hb, nach Trinity Biotech bei 37° C und 366 nm, 4,6-15,5 U/g Hb) umgerechnet in:

$$(\mu\text{Mol metabolic rate}/10^{11}\text{erythrocytes}/\text{min} * \text{RBC M}/\mu\text{L} * 0.66) / \text{Hb g/dL}$$

Die durchschnittliche Aktivität in allen Teilnehmern in U/g Hb betrug 6,1 U/g Hb (Bereich: 4,3-10,8 U/g Hb).

Von den 206 Probanden zeigten zwei sehr niedrige Werte mit 0,8 U/g Hb und 2,9 U/g Hb. Aufgrund der Tatsache, dass alle anderen Enzymtestungen dieser Proben (Testenzyme: Hexokinase, Glucose-6-phosphatase-Isomerase, Triosephosphatase-Isomerase, Pyruvat-Kinase 0.4, Pyruvat-Kinase 2.0, Glyceraldehyd-3-Phosphatase-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase, Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase (=Aspartat-Transaminase)) auch sehr niedrige Testergebnisse zeigten, ist die wahrscheinlichste Erklärung eine Schädigung der Proben am ehesten während des Transportes. Beide Proben wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen, eine Genotypisierung fand jedoch statt (s. Tabelle 7).

Um die normale Aktivität in der zuvor beschriebenen Population festzulegen, wurden die spektrophotometrischen Ergebnisse aller männlichen Teilnehmer (n=164) genutzt. Die Ergebnisse wurden nach der WHO Klassifikation definiert [16] (s. Kapitel 1.2.1). Dafür wurde der Durchschnittswert der männlichen

Studienteilnehmer errechnet und auf 100% in der vorliegenden Population festgelegt. Eine Anpassung, wie durch La Rue et. al. 2014 beschrieben, um eine Verzerrung des durchschnittlichen Wertes der Bevölkerung durch sehr defiziente Proben zu verhindern, war nicht notwendig, da keine defizienten Probanden gefunden wurden und somit keine Verzerrung vorlag (s. Abb. 16). Der Mittelwert der männlichen Studienteilnehmer lag bei 6,1 U/g Hb (range: 4,3-10,8). Der Mittelwert der weiblichen Studienteilnehmerinnen bei 6,4 U/g Hb (range: 4,4-8,7). Insgesamt präsentierten 3 Teilnehmer Werte unterhalb des als normal definierten Bereichs der als < 4,6 U/g Hb definiert ist. Es wurde innerhalb der Studiengruppe keine Enzym-Aktivität unter 10% (=schwer) oder 60% (=moderater Mangel) festgestellt [16] (s. Tab. 7 und Abb. 15). Der am niedrigsten gemessene Wert betrug 4,3 U/g Hb der einer Enzym-Aktivität von 70,5 % entspricht. Es zeigten insgesamt 11 Teilnehmer eine Enzymaktivität zwischen 70-80% (s. Tab. 10). Von diesen waren drei weiblichen Geschlechts. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Teilnehmern in der Spektrophotometrie welche in $\mu\text{Mol metabolic rate}/10^{11}\text{erythrocytes}/\text{min}$ ($p=0.7922$) gemessen wurde. In der Einheit U/g Hb zeigten Frauen (6,4 U/g Hb) einen signifikant höheren Wert als Männer (6,1 U/g Hb; $p=0,0315$).

Die durchschnittliche Lagerungszeit (Zeit in der die Blutproben genommen wurden bis zum Zeitpunkt der spektrophotometrischen Messung) lag bei 12,2 Tagen (SD 5,2, range 4-21 Tage). Es gab keine Korrelation zwischen der Lagerungszeit und der spektrophotometrischen Ergebnissen der Enzymaktivität (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Pearson $r_s= 0,02$; (s. Tab. 8)).

4.8 Genotypisierung

Die Sequenzierung des G6PD-Gens erfolgte in 34 von 206 Proben, basierend auf erniedrigter Enzymaktivität in der Spektrophotometrie, dem Geschlecht und der Herkunft. Die Genotypisierung zeigte eine G6PD-A+ Variante an der Position 376 ohne Enzym-Defekt und eine Mutation an der Position 445 (G→A) durch eine

Aminosäure-Substitution (ALA149THR), die bisher noch nicht beschrieben worden ist (s. Tab. 7 und Tab. 8). Sämtliche Ergebnisse sind in den Tabellen 5-10 und in Abbildungen 15 und 16 zusammengefasst.

Tab. 5: Übersicht Studienpopulation (n=206)

Geschlecht	
Weiblich, n (%)	42 (20,4)
Alter in Jahren, Median (IQR)	
	22 (21;24)
Herkunft	
Oromiya Region n(%)	131 (63,6)
Jimma Stadt n(%)	51 (24,8)
Addis, n(%)	10 (4,8)
Malaria-endemische Regionen, n(%)	43 (20,9)
Andere, n(%)	14 (6,8)
Malaria positiv, n (%)	
	0
Hämoglobin in mg/dl, Median (IQR)	
	16,8 (11,9;23,3)
[Alle]	
Hämoglobin in mg/dl, Median (IQR)	
	17,1 (14,2;23,3)
[Männer]	
Anämie [Männer]	
	0
<14 mg/dL, n (%)	
Hoher Hämoglobinwert [Männer]	
	38 (23,0)
>18 mg/dL, n (%)	
Hämoglobin in mg/dl, Median (IQR)	
	14,3 (11,9;23,0)
[Frauen]	
Anämie [Frauen]	
	1 (2,4)
<12 mg/dL, n (%)	
Hoher Hämoglobinwert [Frauen]	
	5 (11,6)
>16 mg/dL, n (%)	

Tab. 6: G6PD-Aktivitäten und Referenzwerte der Studienpopulation

G6PD Aktivität in μMol metabolic rate /10 ¹¹ erythrocytes/min. ¹ ; in U/g Hb ²	Alle (n=204)	Männer (n=163)	Frauen (n=41)
Median	29,1; 6,1	29,1; 6,1	29,6; 6,4
IQR	(26,9;32,0); (5,6;6,7)	(26,9;32,3); (5,6;6,6)	(27,2;31,9); (6,0;6,9)
Bereich	19,2-48,6; 4,3-10,8	19,2-48,6; 4,3-10,8	20,8-42,2; 4,4-8,7
Mittelwert	29,59; 6,17	29,55; 6,11	29,69; 6,40
SD	3,99; 0,87	3,96; 0,85	4,12; 0,93

¹ Normwert= 30,5 ± 4,5

² Normwert= 4,6 -13,5

³ Standardabweichung (Standard Deviation (SD))

Tab. 7: G6PD-Aktivitäten, G6PD-Genotypen und Herkunftsort der Studienpopulation

G6PD-Aktivität in $\mu\text{Mol substrate/}$ $10^{11}\text{erythrozyt/min}^1$	G6PD- Aktivität in U/g Hb ²	G6PD- Aktivität in % ⁴	Genotyp	Mann (M)/ Frau (F)	Herkunft (Malaria endemisches Gebiet (+/-))
3,9⁵	0,8⁵	13,1 ³	Normal	M	Harar +
13,9⁵	2,9⁵	47,5 ³	Normal	F	Addis -
19,2	4,3	70,5	G6PD-A+	M	Oromiya +
21,8	4,4	72,1	Normal	F	Jimma +
20,8	4,4	72,1	Normal	F	Oromiya +
23,5	4,6	75,4	G6PD-Jimma	M	Jimma +
23,5	4,7	77,1	Normal	F	Jimma +
22,3	4,7	77,1	Normal	M	Somali +
22,1	4,8	78,7	Normal	M	Oromiya +
20,8	4,8	78,7	Normal	M	Oromiya +
23,8	4,8	78,7	Normal	M	Oromiya +
24,1	4,9	80,0	Normal	M	Jimma +
24,6	4,9	80,0	Normal	M	Oromiya +
25,1	5,0	82,0	Normal	M	Jimma +
24,8	5,1	83,6	Normal	M	Oromiya +
24,1	5,2	85,2	Normal	M	Jimma +
24,9	5,2	85,2	Normal	M	Oromiya +
25,0	5,3	86,7	Normal	M	Jimma +
25,1	5,4	88,5	Normal	M	Oromiya +
26,5	5,4	88,5	Normal	M	Oromiya +
27,5	5,5	90,2	Normal	M	Jimma +
24,6	5,6	91,8	Normal	M	Somali +
27,3	5,6	91,8	Normal	M	Jimma +
26,1	5,9	96,7	Normal	M	Oromiya +
26,7	6,0	98,4	Normal	M	Oromiya +
28,1	6,1	100,0	Normal	F	Jimma +
30,0	6,3	103,3	Normal	M	Jimma +
30,8	6,4	104,9	Normal	M	Jimma +
29,0	6,4	104,9	Normal	M	Jimma +
30,4	6,7	109,8	Normal	F	Jimma +
33,0	6,8	111,5	Normal	M	Jimma +
27,7	6,9	113,1	Normal	F	Jimma +
35,4	7,1	116,4	Normal	M	Jimma +
35,6	7,9	129,5	Normal	F	Bahir Dar +

¹ Werte unter 26,0 in fett markiert

² Werte unter 4,6 in fett markiert

³ Ungültige G6PD-Aktivitäts-Werte, welche aus der Analyse ausgeschlossen wurden

⁴ Referenz: U/g Hb

Tab. 8: Mutationen des *g6pd* Gens, die in der Studienpopulation gefunden wurden

Mutation	Basen-Substitution	Position	Aminosäure-Substitution	Zygotie	Mann/Frau	Herkunft
G6PD-A+	A → G	376	N126D	Hemizygot	M	Oromiya
G6PD-Jimma	G → A	445	A149T	Hemizygot	M	Jimma

Tab. 9: Die Lagerungszeit der Proben und die G6PD-Aktivität in U/g Hb, n=204

Zeit in Tagen zwischen Blutentnahme und Spektrophotometrie	n (%)	Durchschnittswert der G6PD-Aktivität in U/g Hb [IQR]
4	7 (3,4)	5,9 [5,0;6,3]
5	12 (5,9)	6,2 [5,6;6,8]
6	29 (14,2)	5,9 [5,3;6,3]
7	24 (11,8)	6,4 [6,1;6,8]
10	12 (5,9)	5,4 [4,5;6,3]
11	10 (4,9)	6,1 [5,6;6,6]
12	2 (1,0)	6,2 [5,5;6,8]
13	7 (3,4)	5,9 [5,5;6,7]
14	28 (13,7)	6,5 [6,1;7,0]
16	23 (11,3)	6,4 [5,7;7,4]
17	12 (5,9)	6,1 [5,7;6,4]
18	12 (5,9)	6,1 [5,5;6,4]
19	15 (7,3)	6,1 [5,5;7,0]
21	11 (5,4)	6,3 [5,6;6,9]

Tab. 10: Die G6PD-Aktivität angegeben in Prozent und die Verteilung innerhalb der Studiengruppe

G6PD Aktivität in %	Alle n (%)	Männer n (%)	Frauen n (%)
<70	0	0	0
70-80	11 (5,4)	8 (4,9)	3 (7,3)
80-90	26 (12,8)	24 (14,7)	2 (4,9)
90-100	68 (33,3)	56 (34,4)	12 (29,3)
100-110	52 (25,5)	41 (25,2)	11 (26,8)
110-120	33 (16,2)	27 (16,6)	6 (14,6)
120-130	9 (4,4)	4 (2,4)	5 (12,2)
>130	5 (2,4)	3 (1,8)	2 (4,9)

Abb. 13: Die Abbildung zeigt die Verteilung der G6PD-Aktivität in Prozent innerhalb der untersuchten Studienpopulation bei Frauen und Männern. Normale G6PD-Aktivität wurde über die mediane Aktivität in U/g Hb der männlichen Studienpopulation definiert und auf 100% gesetzt. Es wurden keine Werte unterhalb 70% detektiert

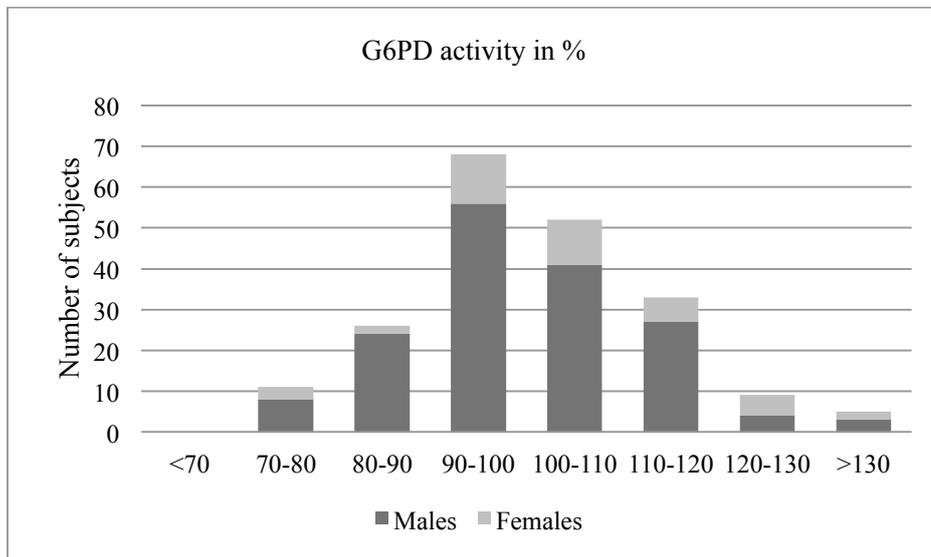
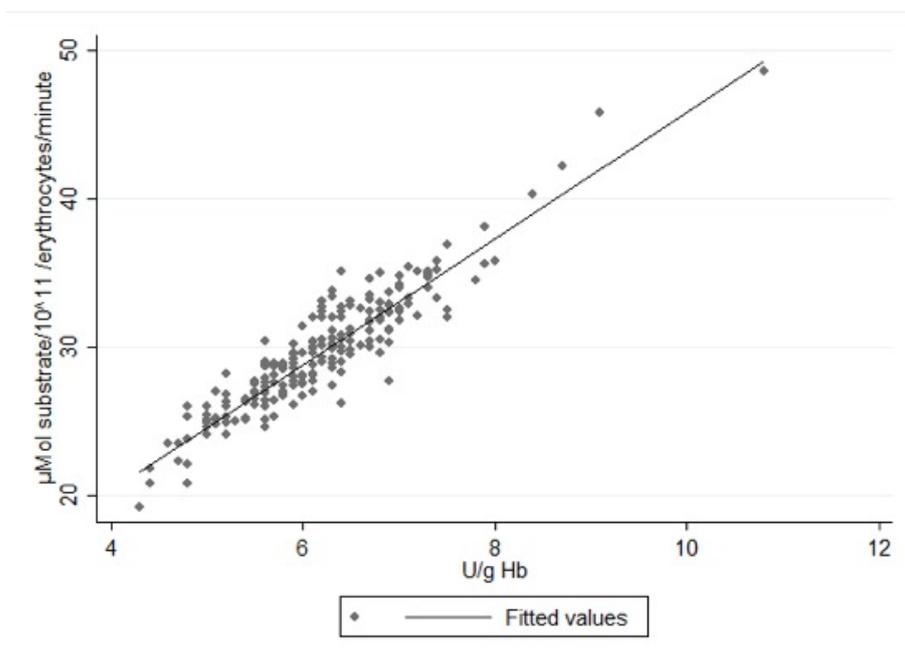


Abb. 14: Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen der G6PD-Aktivität angegeben in $\mu\text{Mol substrate}/10^{11}\text{erythrocytes}/\text{minute}$ und in U/g Hb ($p < 0.000$). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Pearson betrug 0.8594.



5. Diskussion

5.1 Prävalenz des Enzymmangels und relevanter Mutationen in Äthiopien im Vergleich zu anderen afrikanischen Ländern und weltweit

Mit über 400 Millionen betroffenen Menschen stellt der G6PD-Mangel die häufigste x-chromosomal gekoppelte Enzymopathie weltweit dar (s. Kapitel 1.2.3. und 1.2.4.). In der vorliegenden Studie wurde in der Region Jimma und Umgebung kein schwerer Mangel unter den Teilnehmern festgestellt, obwohl im Vergleich zum WHO Report von 1989 in Äthiopien von einer Prävalenz von 0,5 bis zu 2,9 % auszugehen war (Abb. 7).

Nach Howes *et al.*, war von einer Allelfrequenz in der männlichen Bevölkerung Äthiopiens, von weniger als 1% zu rechnen [27]. Eine 2014 veröffentlichte Studie, aus Gambella, im Südwesten Äthiopiens, berichtete von einer Prävalenz von 7,3%, welche mit Hilfe des CareStart™ G6PD-Schnelltests (Access Bio, Inc., New Jersey, USA) ermittelt wurde. Gambella liegt im Tiefland Äthiopiens 300-500 m über dem Meeresspiegel und gilt als ein Gebiet mit hoher Malaria-Transmission. Laut dieser Studie variiert die Prävalenz des G6PD-Mangels innerhalb einzelner ethnischer Gruppen deutlich. Tsegaye *et al.* kommen hierbei zum Schluss, dass eine höhere Prävalenz in der indigenen Gruppe der Nuer (14,3%) und Anuak (12,0%) in ländlichen Gegenden zu finden ist. Von den 46 Studienteilnehmern, die aus Oromiya Region stammten, wies keine/r einen G6PD-Mangel auf. Patienten aus Hochland-Regionen wie Amhara, Hadya und Tigre zeigten ebenfalls keinen G6PD-Mangel [39].

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie aus der Region Jimma in der Oromiya Region. In der vorliegenden Studie präsentierten 3 Teilnehmer Werte unterhalb des als normal definierten Bereichs, der als $<4,6$ U/mg Hb definiert ist. Es wurde innerhalb der Studiengruppe jedoch keine Enzym-Aktivität unter 10% (=schwer) oder unter 60% (=moderater Mangel) festgestellt [16] (s. Tab. 7 und Abb. 15). Der am niedrigsten gemessene Wert betrug 4,3 U/g Hb der einer Enzym-Aktivität von 70,5% entspricht. Es zeigten insgesamt 11 Teilnehmer

eine Enzymaktivität zwischen 70-80% (s. Tab. 10), von denen 3 weiblichen Geschlechts waren.

Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen von Tsegay *et al.* sind die Ergebnisse anderer Studien in Indien über Variationen des Mangels in verschiedenen Gruppen, Stämmen und Kasten [87-89]. Ergänzend berichtete eine Studie in Afghanistan von Aktivitäten zwischen 2-10%, die abhängig von Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit in der Gruppe der Pashtuns sei [90].

Die Genotypisierung des *g6pd* Gens offenbarte zwei Mutationen. Die G6PD-A+ Mutation (A376G) wurde in einem männlichen Teilnehmer mit der niedrigsten Enzymaktivität (4,3 U/g Hb (70,5%)) der Studiengruppe gefunden. Er berichtete über eine Unverträglichkeit gegenüber Norfloxacin, welche jedoch nicht weiter spezifiziert werden konnte. Es gab keine bekannte Hämolyse in der Vorgeschichte. Die zweite Mutation, die in dieser Studie gefunden wurde, ist eine Substitution G445A. Der männliche Teilnehmer zeigte eine Enzymaktivität von 4,6 U/g Hb (75,4%). Er kam direkt aus Jimma Stadt. Die Variante war bisher unbekannt.

Die Varianten A- (202A/376G) und A (202/376G oder 202A/376A) sind charakterisiert durch die reduzierte Enzymaktivität und spezifisch für das sub-saharische Afrika [12, 15, 29] (s. Abb. 6). Die *G6PD* A- Variante ist mit einer verbleibenden Enzym-Aktivität von 5-13% und somit einer milderen Form des Mangels assoziiert [30]. Es wurde jedoch auch von schweren hämolytischen Ereignissen berichtet, sofern der oxidative Stressor stark genug war [12, 30, 31]. Die vorherrschende Allel-Variante in Ost-Afrika, ist das *G6PD* A- 202A/376G Allel (202G>A und 376A>G) [28].

Der besondere Genotyp der *G6PD* A- Variante mit der gleichzeitigen Vorhandensein von A376G und G202A Mutationen, konnte jedoch in dieser Studie nicht gefunden werden. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit denen einer anderen Studie in Malo, im Süd-Westen Äthiopiens überein, in welcher 555 Proben, auf G202A und C563T untersucht wurden und keine dieser Variationen im Patientenkollektiv gefunden werden konnte [91].

Ein erst kürzlich erschienenenes Paper berichtet von genetischen Varianten aus der Jimma Region, Äthiopien. In 20 (23,3%) der 86 Teilnehmer wurde eine G6PD-A+ Variante gefunden. G202A und C563T konnten nicht gefunden werden. In zwei Frauen wurde eine G535A Mutation bestimmt und zwei weitere in der intrinsischen Region eines männlichen Studienteilnehmers (485 + 37 G→T, rs370658483, chrX: 154535131) [92].

Während G6PD-A+ mit normaler Enzymaktivität assoziiert zu sein scheint, wurde A- bisher als Varianten betrachtet, welche einen milderen Enzymmangel aufweist. Kürzlich erschienene Berichte legen jedoch nahe, dass die G6PD-A- Variante mit schweren Reaktionen nach Einnahme von Primaquin assoziiert ist [93, 94]. Die Primaquin-Sensibilität wurde bisher nur für die Varianten *Mediterranean* und *Mahidol* [46] charakterisiert.

5.2 Vergleich der klassischen Methode Spektrophotometrie und G6PD

Beim Vergleich der klassischen Methode Spektrophotometrie mit dem G6PD-Schnelltest kam die Studie zu diskordanten Ergebnissen. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße in Kombination mit der nicht vorhandenen Prävalenz des Mangels, war eine Evaluation des Schnelltests nicht möglich. Die falsch positive Rate betrug 0%. Eine Unterscheidung zwischen leicht verminderter und normaler Enzymaktivität war nicht möglich. Die Vergleichsproben mit einem schweren Enzym-Mangel (<10%) wurden vom Test jedoch als richtig positiv erkannt (Vgl. Abb. 11 und Abb. 12). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in anderen Studien berichtet und die Spektrophotometrie erweist sich nach wie vor als Goldstandard [42, 43, 84, 95]. Der Schnelltest sollte jedoch nicht als unbrauchbar erklärt werden, da er schwere Defizienzen erkennt, und in Hochrisikogebieten auf ihn zurückgegriffen werden kann.

Potentielle Erklärungen für die niedrige Sensitivität des Schnelltests sind Umweltfaktoren und die unterschiedlichen Patientenkollektive. Weitere Gründe beinhalten technische Probleme, wie beispielsweise die Raumtemperatur von 18-

25°C einzuhalten, die Schwierigkeiten der Ablesung der Farbveränderung, die knappen Zeitangaben des Testherstellers und das Training der Person, welche den Test durchführt und bewertet (Vgl. Abb. 12) [42, 43, 84]. Außerdem könnte nach Osorio et al., eine zeitgleiche Malaria-Infektion Einfluss auf das Testergebnis haben [43]. Es konnte gezeigt werden, dass mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten im Vergleich zu nicht infizierten Erythrozyten bereits nach einem einzigen Entwicklungszyklus eine höhere G6PD Aktivität besitzen [96]. Zusätzlich führt eine akute Hämolyse während einer Malaria-Episode und ein hoher Retikulozyten Spiegel zu einer fälschlicherweise normalen Enzymaktivität, da die G6PD-Aktivität in jungen Erythrozyten höher ist als in alten [3]. Somit sollte in zukünftigen Studien die Hb-Konzentration, die Retikulozytenzahl und das MCV als mögliche Fehlerquellen der Heterogenität berücksichtigt werden. Wie Ley et al. berichten, wird an der Entwicklung neuer Testverfahren gearbeitet, welche noch im Feldversuch getestet und geprüft werden müssen [45]. Die vorliegenden Ergebnisse machen die Entwicklung sensitiverer Schnelltests geradezu unumgänglich.

Da bisher keine publizierten Daten aus Äthiopien zu Verfügung standen, welche die G6PD-Aktivität mittels der beschriebenen Methode der Spektrophotometrie gemessen hatten, musste von einem lokalen Vergleich der Durchschnittswerte in U/g Hb abgesehen werden. Eine Studie aus den USA in welche die G6PD-Aktivität in US-Afroamerikaner untersuchte, berichtete von unterschiedlichen Aktivitäten zwischen den männlichen und weiblichen Teilnehmern. Der durchschnittliche Wert betrug 7,30 U/g Hb. Der männliche Durchschnittswert wurde angepasst mit 7,18 U/g Hb, der weibliche Durchschnittswert mit 7,70 U/g Hb angegeben [42]. Der weibliche Durchschnittswert war somit ersichtlich größer. Dies trifft auch auf die hier vorliegende Studie zu. Die in U/g Hb gemessene Werte waren bei Frauen (6,4 U/g Hb) signifikant höher als bei Männern (6,1 U/g Hb; $p=0,0315$). Die Hämoglobinmessungen zeigten höhere Werte unter den männlichen Teilnehmern. Es wurde kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt, wenn die Enzymaktivität in $\mu\text{Mol metabolic rate} / 10^{11}\text{erythrocytes}/\text{min}$ angegeben wurde.

In einer anderen Studie aus Bangladesch mit 999 Teilnehmern betrug der angepasste spektrophotometrisch gemessene Wert 7,03 U/g Hb und war somit, verglichen mit den zwei oben genannten Studien niedriger [97].

Als Ursache sind hierfür verschiedene Ursachen möglich. Zum einem gestaltet sich der Vergleich von verschiedenen Tests und Messmethoden als äußerst schwierig. Zum anderen dient die Umrechnungsformel nur zur Annäherung. Darüber hinaus stellt die G6PD-Messung im Feld viele Herausforderungen dar. Der Verlust der Enzym-Aktivität während der Verarbeitung der Proben kann nicht ausgeschlossen werden.

Wie Ley und Kollegen berichteten, sind wohl die Dauer zwischen der Blutabnahme und der spektrophotometrische Messung die eliminierenden Faktoren um eine stabile Enzymaktivität aufrecht zu erhalten. Der Abbau der G6PD-Aktivität ist temperaturabhängig und EDTA-Blut sollte bei mindestens 4-8°C gekühlt werden. Der potenzielle Verlust durch eine ausbleibende Kühlung der Proben ist jedoch unbekannt [45]. Eine Studie berichtete von einem maximalen Verlust der Enzym-Aktivität von 5%, nach Lagerung der Proben für 21 Tage bei einer Temperatur von 4°C [98]. Andere berichten über einen Aktivitätsverlust von 15-21% nach 21 Tagen, 6% nach 7 Tagen und 40% nach 7 Tagen bei 4°C [45]. Kryokonservierung und Lagerung bei -80°C [99] oder das Ersetzen des Plasmas mit einem Zusatzstoff werden empfohlen [98].

Die Proben der vorliegenden Studie waren bis zum Tag des Verschickens auf 4°C gekühlt. Der Transport mit DHL-Express (4-7 Tage) oder mittels Studienmitarbeiter (2-3 Tage) erfolgte bei Umgebungstemperatur. Die durchschnittliche Lagerungszeit betrug 12,2 Tage (SD 5,2, Bereich 4-21Tage). Die Lagerungsdauer zeigte keine ersichtliche Auswirkung auf die G6PD-Aktivität und lies nicht auf einen signifikanten Verlust von Aktivität deuten. Ein signifikanter Verlust der Aktivität wurde nur in zwei (ausgeschlossenen) Proben gemessen, welche eine Lagerungszeit von 14 bis 19 Tagen aufwiesen. Die durchschnittliche Enzymaktivität bei 14 Tagen lag bei 6,5 U/g Hb und bei 19 Tagen bei 6,1 U/g Hb.

Wenn wir von einem durchschnittlichen G6PD-Wert bei Männern von 7,0 U/g Hb [42, 45] ausgehen würden, bedeutet ein Durchschnittswert von 6,1 U/g Hb einen Verlust von 13% der Enzymaktivität. Die absoluten Werte dieser Studie könnten jedoch durchaus leicht höher sein als die präsentierten Ergebnisse. Auf der anderen Seite waren die Hämoglobinwerte mit 17,1 mg/dL für die männlichen Teilnehmer und 14,3 mg/dL für die weiblichen Teilnehmer relativ hoch. Es zeigten somit 20% der Studienteilnehmer erhöhte Hämoglobinwerte. Alle Teilnehmer, obwohl aus verschiedenen Dörfern stammend, lebten in Jimma Stadt, welches 1 780 Meter über dem Meeresspiegel liegt. Hohe Hämoglobinwerte resultieren in niedrigeren G6PD-Werten da die Umrechnungsformel hämoglobinabhängig ist. Die zwei Studien, welche weiter oben erwähnt wurden, präsentierten keine Hämoglobinwerte zum Vergleich. Die Studien wurden aber bei Teilnehmern durchgeführt, die auf Meereshöhe lebten [42, 45]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Aktivitätsverlust nicht ausgeschlossen werden kann, ein großer Verlust jedoch unwahrscheinlich ist. Die relativen Werte in Prozent sollten nicht in irgendeiner Weise beeinträchtigt sein.

5.3 Malariatherapie mit Primaquin und G6PD-Mangel

In Äthiopien sind *P. falciparum* und *P. vivax*, abhängig von der Region, für Malaria Infektionen ursächlich. Laut WHO werden ca. 40 % der Infektionen durch *P. vivax* und 60% durch *P. falciparum* hervorgerufen [78, 91]. Ein Abfall der *P. falciparum* Infektionen und ein Anstieg der *P. vivax* Infektionen wurde nach Einführung der ACT beobachtet [73].

Erstaunlicherweise finden sich in Äthiopien, Indien, Indonesien und Pakistan 81% aller Todesfälle, die durch eine *P. vivax*-Infektion verursacht werden [78]. Die Co-Existenz der beiden Spezies gestaltet die Eliminierung der Malaria schwierig.

Die hohe Prävalenz an *P. vivax*-Infektionen in Äthiopien stellt, im Gegensatz zu anderen Regionen Afrikas, eine große Herausforderung dar. Wie Studien zeigten, waren 36-70% der Infektionen abhängig vom Studienort in der Region Jimma,

Äthiopien durch *P. vivax* verursacht [67]. Die Ausbildung von Hypnozoiten, das frühe Auftreten von Gametozyten und eine nicht ausreichende Behandlung machen *P. vivax* zu einem Erreger, der sich nur schwierig eliminieren lässt [91, 100]. Es ist bekannt, dass Individuen mit einer asymptomatischen Parasitämie als stummes Reservoir für Gametozyten dienen und somit eine aktive Rolle in der Übertragung der Malaria spielen [101]. Das einzige wirkungsvolle Medikament gegen Hypnozoiten ist das 8-Aminiquinolon PQ. Auf Grund der unbekanntem G6PD-Enzymaktivitäten ist es jedoch in seiner Gabe limitiert. Eine durch PQ verursachte akute hämolytische Anämie kann zu akutem Nierenversagen und bei klinisch unzureichendem Management sogar zum Tode führen [11, 102].

Interessanter Weise bestehen auffallende geographische Ähnlichkeiten zwischen der Verteilung des G6PD-Mangels und der Malaria, die auf eine potentiellen Schutz gegenüber einer Malariainfektion schließen lassen. Diese Tatsache alleine stellt jedoch keinen Beweis dar.

Der exakte Mechanismus des Schutzes, welcher durch den G6PD Mangel gegenüber Malaria besteht, ist immer noch nicht vollständig verstanden. In vitro Untersuchungen zeigten ein vermindertes Parasitenwachstum in den defizienten Zellen [103]. Eine andere Studie legt die Vermutung einer früheren Phagozytose der befallenen Erythrozyten nahe [104]. Denkbar wäre auch die Tatsache, dass heterozygote Merkmalsträger eine Untergruppe an G6PD-defizienten Erythrozyten aufweisen, welche den gleichen Mechanismen wie die G6PD-defizienten Erythrozyten männlicher hemizygoter Träger unterliegen [105].

Die evolutionäre Hypothese wurde in großen multizentrischen Studien geprüft, welche zum Schluss kamen, dass ein G6PD-Mangel vor allem gegenüber schweren Malariainfektionen schützt [106, 107]. In der Literatur lassen sich widersprüchliche Aussagen bezüglich des Schutzes finden. Ruwenden et al. berichten von Schutz für hemi-, homo -und heterozygote Individuen [106]. Eine veröffentlichte Studie aus Gambia berichtet über keine signifikante Risikominderung einer Malariainfektion [108]. Auch die Arbeit von Tsegay et al. berichtet über eine fehlende Korrelation zwischen der G6PD-Defizienz und eines Schutzes gegenüber Malaria in Gambella,

Äthiopien, per se [39]. Interessanterweise existiert kein Beispiel einer Population, in welcher alle Individuen eine G6PD-Defizienz aufweisen [20].

Der G6PD-Mangel war einer der ersten genetischen Merkmale, dessen komplexer Einfluss auf andere Erkrankungen entdeckt wurde [105]. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass unter den Malaria Parasiten nur *P. falciparum* für die Selektion und die G6PD-Defizienz ursächlich ist. Jedoch könnte auch laut Loicharon et al. *P. vivax* eine Rolle in der Formung des Genoms gespielt haben [36]. Mit einem besseren Verständnis über den Mangel und seinen Varianten, sowie dessen Auswirkungen auf die Empfindlichkeit gegenüber Malaria, könnten neue Konzepte für die Prävention und die Behandlung erarbeitet werden. Eine einheitliche Methode zur Bestimmung der G6PD-Enzymaktivität und ein somit einheitlicher Cut-off Wert und somit die Möglichkeit eines Vergleichs der Ergebnisse sowie die Einführung von Standards würden die Therapie der Malaria erleichtern. Primaquin sollte laut Empfehlung nicht gegeben werden, wenn die Enzymaktivität unter 30% liegt [79]. Die Primaquin-Therapie mit 0,25-0,5 mg/kg KG für 14 Tage, hätte dieser Studiengruppe ohne Bedenken gegeben werden können. Für das langwirksame Tafenoquin (TQ), ein weiteres 8-Aminoquinolon, welches 2018 zugelassen werden soll, lag der empfohlenen Grenzwert in der Zulassungsstudie bei 70% Enzymaktivität, bei anämischen Frauen bei 90% (7-10 mg/dL) [47]. Laut Ley et al. soll der Grenzwert bei der Zulassung für TQ bei 70-80% liegen [45].

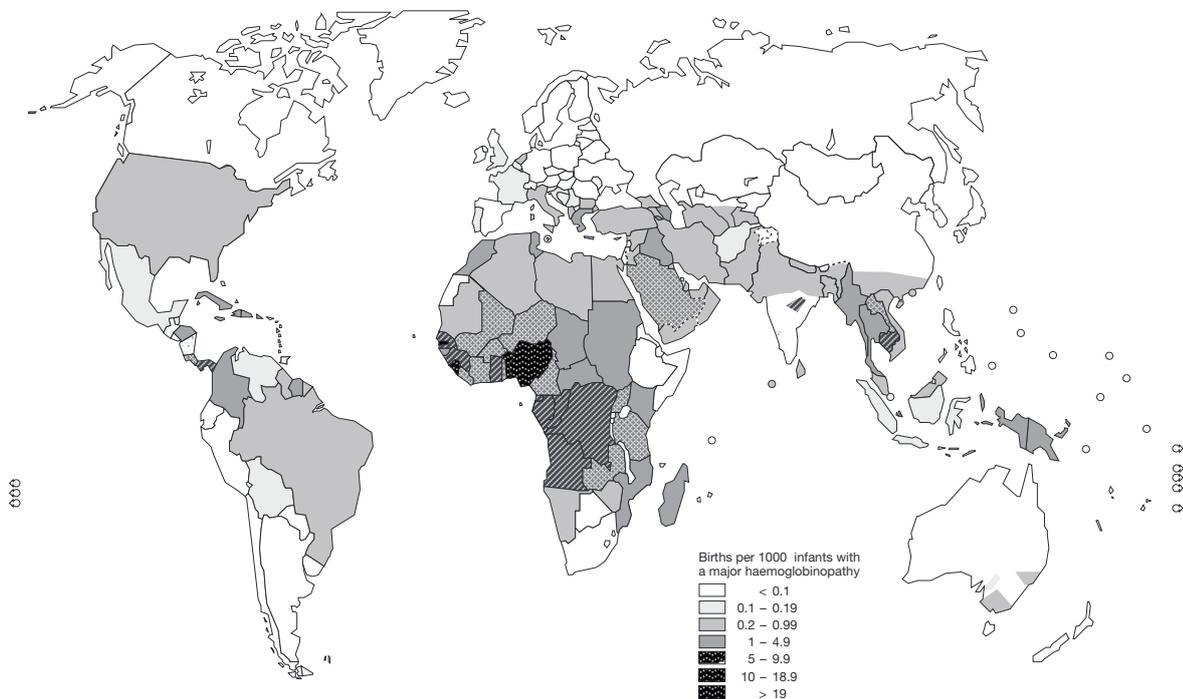
In der Vorliegenden Studie scheint ein Cutt-off Wert von 80% vernünftig. Somit wären in der Studiengruppe zwei potentiell durch Primaquin ausgelöste Komplikationen verhindert worden, neun Patienten hätten keine Therapie bekommen, und 193 hätten eine korrekte Therapie erhalten. Dies erscheint vertretbar zu sein. Der männliche Teilnehmer mit der G6PD-A+ Variante (70,5% Enzymaktivität) sollte mit großer Vorsicht behandelt werden und ggf. von einer radikalen *P. vivax*-Therapie Abstand gehalten werden. Bisher gibt es keine Informationen bezüglich einer 8-Aminoquinolon Sensitivität und der neu gefundenen Mutation mit einer Enzymaktivität von 75,4% innerhalb der Studiengruppe.

Es wurde keine Parasitämie, weder mit RDT noch mit Mikroskopie gefunden. Die Rekrutierung erfolgte zwischen März und Mai während und nach der kleinen Regenzeit. In einer kürzlich erschienenen Studie aus dem Südwestlichen Äthiopien, welche in einer ähnlich bergigen Region mit saisonaler Malaria, durchgeführt wurde, zeigten sich asymptomatische submikroskopische Parasitämien mit *P. falciparum* in 5,2%, *P. vivax* in 4,3% und gemischte Infektionen in 0,2% der 555, mittels PCR getesteten Teilnehmer (Tedesse 2015). Die Mikroskopie und der Schnelltest waren in allem Proben negativ. Aufgrund dessen kann eine sub-mikroskopische Parasitämie nicht ausgeschlossen werden.

5.4 Prävalenz relevanter Hämoglobinopathien in Äthiopien im Vergleich zu anderen afrikanischen Ländern und weltweit

Wie bereits erwähnt, können unterschiedliche Faktoren wie der Verzehr von Fava-Bohnen, Infektionen, Medikamente und auch Hämoglobinopathien die G6PD-Aktivität beeinflussen. Dazu gehören beispielsweise Membrandefekte, der Glucose-6-Phosphat-Isomerase-Mangel, der Pyruvat-Kinase-Mangel, andere Dyserythropoetische Anämien und insbesondere die Thalassämien [26]. In Äthiopien sind jedoch wenige spezifische Informationen bezüglich Hämoglobiopathien vorhanden. Die Region Jimma ist Teil der globalen Hämoglobinopathie Landkarte [109] (Abb. 15). Das Hämoglobinopathie-Screening der vorliegenden Studie war bei keinem Studienteilnehmer positiv, insbesondere keine Thalassämie oder Sichelzellanämie konnte entdeckt werden. Es spricht nichts dagegen, die Rolle des G6PD-Mangels auf hämatologische Parameter und Malaria in zukünftigen Studien in der Studienregion zu untersuchen.

Abb. 16: Weltweit Verteilung der Hämoglobinopathien aus WHO (2017) [109]



5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Auf Grund der Komplexität der Erkrankung stellt die Diagnose und das Ausmaß des G6PD-Mangels eine Herausforderung dar. Gerade in heterozygoten Frauen, die eine variable x-chromosomale Inaktivierung aufweisen, lässt sich vom Genotyp nicht auf den Phänotyp schließen. Die Korrelation zwischen Ausmaß des Mangels und klinisch signifikanter Hämolyse ist immer noch nicht bekannt.

Nach den Empfehlungen der WHO dürfte im vorgestellten Patientenkollektiv die therapeutische Anwendung von PQ sicher sein [110]. Die oben genannten Ergebnisse können dazu beitragen neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, welche die Behandlung der Malaria sowie die Elimination der Malaria-Übertragung im Studiengebiet beschleunigen können. Populationsbasierte Genotypisierung für die Identifizierung der Verteilung dominanter Varianten des Mangels können, wie

sich in der Studie interessanterweise gezeigt hat, für weitere wissenschaftliche Fragestellungen wichtig sein. Zusätzlich sollten Studien, die sich mit den Auswirkungen eines G6PD-Mangels auf hämatologische Parameter befassen, in Verbindung mit einer Malariainfektion und Hämoglobinopathien, ihre Berechtigung haben.

Die sehr niedrige oder nicht vorhandene Prävalenz des G6PD-Mangels in der vorliegenden Studie ist nicht überraschend, da die Teilnehmer größtenteils aus den Hochland-Regionen in Äthiopien stammten. Es konnten genetische Varianten mit einer Enzymaktivität von 70-80% gefunden werden. Die niedrige Prävalenz von schweren Defizienzen spricht gegen die Einführung eines Routine-Screenings für Neugeborene. Es konnten jedoch genetische Varianten mit einer Enzymaktivität von 70-80% gefunden werden.

Routine-Screenings auf G6PD-Mangel sollten bei Diagnose einer *P. vivax*-Infektionen eingeführt werden. Die Implementierung der Spektrophotometrie ist an den Universitätskliniken des Landes denkbar. Gesundheitseinrichtungen in ländlichen Regionen könnten von neuen im Feld getesteten Alternativen profitieren und sollten gefördert und evaluiert werden. Ein Cut-off Wert von 80% für die radikale Therapie von *P. vivax* scheint in der vorliegenden Studiengruppe angemessen zu sein.

Der G6PD-Schnelltest war nicht dazu in der Lage zwischen moderaten Defizienzen zu unterscheiden, scheint jedoch für die Testung von schweren Mängeln wertvoll zu sein. Die Studienteilnehmer erhielten eine G6PD-Karte, auf welcher ihr Enzym-Status vermerkt wurde und erhielten diesbezüglich eine ausführliche Aufklärung.

6. Zusammenfassung

Mit über 400 Millionen Betroffenen stellt der G6PD (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)-Mangel eine der häufigsten Enzymopathien weltweit dar. Der höchstwahrscheinlich vor einer Malaria schützende Mangel kann in Betroffenen bei bereits kleinen Mengen an bekannten oxidativen Stressoren, wie bspw. Primaquin, Dapsone oder Fava-Bohnen, zu akuten Hämolysen, Favismus, neonatalem Ikterus und chronischen Anämien führen. Im Falle einer erniedrigten Enzymaktivität oder bei Aussetzung gegenüber erhöhtem oxidativem Stress, kann Glutathiondisulfid (GSSG) mit Hilfe von NADPH nicht zu Gluthation (GSH) reduziert werden und der antioxidative Zyklus nicht aufrechterhalten werden. Dies führt zur Zerstörung der Erythrozyten und zu Hämolyse. Aufgrund der Komplexität der Erkrankung stellt die Diagnose des G6PD-Mangels und dessen Ausmaß eine Herausforderung dar. Die Korrelation zwischen der Schwere des Mangels und klinisch signifikanter Hämolyse ist immer noch nicht bekannt.

Die Größe des G6PD-Gens beträgt 18,5 kB und besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Es ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Genlocus Xq28) lokalisiert. Bereits über 217 Mutationen wurden beschrieben, bei denen es sich meist um einfache Basenaustausche handelt. Die häufigsten Mutationen sind *Mediterranean*, *A- (202A)*, *A- (968C)*, *Seattle* und *Union*. Die höchste G6PD-Mangel-Prävalenz lässt sich in Afrika, den arabischen Halbinseln, dem Mittleren Osten, im tropischen und subtropischen Asien, in Papua Neu Guinea, dem Vanuatu Archipel im Pazifik und verschiedenen Regionen rund um das Mittelmeer finden. Die Verteilung des G6PD-Mangels in Afrika beträgt 0,5-30%. Interessanterweise bestehen auffallende geographische Ähnlichkeiten zwischen der Verteilung des G6PD-Mangels und der Malaria, die auf eine potentiellen Schutz gegenüber einer Malariainfektion schließen lassen. Der exakte Schutzmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Die Malaria stellt mit über 216 Millionen Neuinfektionen und rund 445 000 Todesfällen im Jahre 2016 eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen

Zeit dar. Hauptsächlich ist die Malaria tropica (*P. falciparum*) für die tödlichen Verläufe verantwortlich.

In Äthiopien ist Malaria in über 75% des Landes endemisch. Vorherrschend ist *P. falciparum* gefolgt von *P. vivax*. In der Region Jimma, im Süd-Westen Äthiopiens, ist die Übertragungsintensität moderat. Krankheitsgipfel zeigen sich nach der Regenzeit. Wie Studien zeigten, waren 36-70% der Infektionen abhängig vom Studienort in der Region Jimma durch *P. vivax* verursacht. Die Co-Existenz der beiden Spezies gestaltet die Eliminierung der Malaria schwierig. Die hohe Prävalenz an *P. vivax*-Infektionen in Äthiopien stellt, im Gegensatz zu anderen Regionen Afrikas, eine große Herausforderung dar.

Für lange Zeit galt die Malaria ausgelöst durch *P. vivax* mit 70-390 Millionen Neuinfektionen als die harmlosere Form, in den letzten Jahren wurden jedoch vermehrt schwere Verläufe dokumentiert. Bekannt ist außerdem, dass mit Einführung der ACT (Artemisinin-Kombinationspräparate) ein Abfall der *P. falciparum* Infektionen und ein Anstieg der *P. vivax* Infektionen beobachtet wurde. Das einzige von der WHO empfohlene Medikament gegen Hypnozoiten, persistierende Ruhestadien von *P. vivax* in der Leber, und die dadurch bedingten Malariarezidive ist das 8-Aminoquinolon Primaquin (PQ). Zusätzlich ist PQ wirksam gegen reife *P. falciparum* Gametozyten und wird in Regionen mit ACT-Resistenzen empfohlen, um die Ausbreitung resistenter Stämme zu verhindern. Leider ist der Gebrauch von Primaquin aufgrund schwerer Nebenwirkungen bei einem vorliegenden G6PD-Mangel eingeschränkt. Eine durch PQ verursachte akute hämolytische Anämie bei G6PD-Mangel kann zu akutem Nierenversagen und bei klinisch unzureichendem Management sogar zum Tode führen. Die Therapie mit PQ gestaltet sich somit schwierig, wenn der G6PD-Status der zu behandelten Patienten nicht bekannt ist. Eine Enzymaktivitäts-Testung der G6PD vor PQ-Therapie ist essentiell.

Die vorliegende Studie zeigt die weltweit ersten spektrophotometrischen sowie geno-und phänotypischen Daten zur Prävalenzbestimmung des G6PD-Mangels in der Region Jimma, im Oromiyastaat im Süd-Westlichen Äthiopien.

Die Testung der Enzymaktivität erfolgte mittels des Goldstandards Spektrophotometrie und des Schnelltests BinaxNOW® G6PD (Alere Inc., Main, USA). Von Mai bis Juni 2014 wurden in der Region Jimma insgesamt 206 Studienteilnehmer rekrutiert. 3 Teilnehmer (1,4%) präsentierten Werte unterhalb des als normal definierten Bereichs (<4,6 U/g Hb entsprechend 75,4% Enzymaktivität), innerhalb der Studiengruppe wurde jedoch keine Enzymaktivität unter 10% (=schwer) oder unter 60% (=moderater Mangel) festgestellt. Der am niedrigsten gemessene Wert betrug 4,3 U/g Hb, der einer Enzymaktivität von 70,5% entspricht. Es zeigten insgesamt 11 Teilnehmer (15,3%) eine Enzymaktivität von 70-80%. Drei dieser Studienteilnehmer waren weiblichen Geschlechts.

Es erfolgte die Sequenzierung des *g6pd* Gens bei 34 Studienteilnehmern, basierend auf niedrig gemessenen Enzymaktivitäten in der Spektrophotometrie. Die Genotypisierung des *g6pd* Gens offenbarte zwei Mutationen. Die G6PD-A+ Mutation (A376G) wurde in einem männlichen Teilnehmer gefunden (2,9%). Die Enzymaktivität betrug 4,3 U/g Hb (70,5%). Die zweite Mutation, die gefunden wurde, ist eine Substitution G445A. Die Enzymaktivität des männlichen Teilnehmers betrug 4,6 U/g Hb (75,4%). Das zusätzlich durchgeführte Screening auf Hämoglobinopathien und asymptomatische Parasitämien war negativ.

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße in Kombination mit der nicht vorhandenen Prävalenz des Mangels in der Studiengruppe, war eine Evaluation des Schnelltests nicht möglich. Die falsch positive Rate betrug 0%. Eine Unterscheidung zwischen leicht verminderter und normaler Enzymaktivität war nicht möglich. Die Vergleichsproben mit einem schweren Enzym-Mangel (<10%) wurden vom Test jedoch als richtig positiv erkannt.

Nach den Empfehlungen der WHO dürfte im vorgestellten Patientenkollektiv die therapeutische Anwendung von PQ sicher sein und sollte in Kombination mit einer Enzym-Testung bei vivax Malaria unterstützt werden. Ein generelles Screening erscheint für die Population unnötig. Die oben genannten Ergebnisse können dazu beitragen neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, welche die Behandlung der Malaria sowie die Elimination der Malaria-Übertragung im Studiengebiet

beschleunigen können. Ein valider G6PD-Schnelltest im Feld könnte das Stellen einer Diagnose, insbesondere vor Primaquintherapie, vereinfachen beziehungsweise vielerorts erst möglich machen. Die Studienteilnehmer erhielten eine G6PD-Karte, auf welcher ihr Enzym-Status vermerkt wurde und diesbezüglich eine ausführliche Aufklärung.

7. Literaturverzeichnis

1. SMF, Swiss Medical Forum- Schweizerisches Medizin Forum, *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel*. 2016 [18.08.2017]; 2016;16(10):241–244]. Available from: <https://medicalforum.ch/de/resource/jf/journal/file/download/article/smf.2016.02584/smf-02584.pdf/>.
2. Frank, J.E., *Diagnosis and management of G6PD deficiency*. Am Fam Physician, 2005. 72(7): p. 1277-82.
3. Cappellini, M.D. and G. Fiorelli, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Lancet, 2008. 371(9606): p. 64-74.
4. Naylor, C.E., P. Rowland, A.K. Basak, S. Gover, et al., *Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme*. Blood, 1996. 87(7): p. 2974-82.
5. Au, S.W., S. Gover, V.M. Lam, and M.J. Adams, *Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency*. Structure, 2000. 8(3): p. 293-303.
6. Battistuzzi, G., M. D'Urso, D. Toniolo, G.M. Persico, et al., *Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(5): p. 1465-9.
7. Adeva-Andany, M.M., N. Perez-Felpete, C. Fernandez-Fernandez, C. Donapetry-Garcia, et al., *Liver glucose metabolism in humans*. Biosci Rep, 2016. 36(6).
8. Harvey, R.A., R.A. Harvey, and D.R. Ferrier, *Biochemistry*. 2011: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
9. Ruwende, C. and A. Hill, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria*. J Mol Med (Berl), 1998. 76(8): p. 581-8.
10. Beutler, E., *G6PD deficiency*. Blood, 1994. 84(11): p. 3613-36.
11. Luzzatto, L. and E. Seneca, *G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications*. Br J Haematol, 2014. 164(4): p. 469-80.

12. Beutler, E., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective*. Blood, 2008. 111(1): p. 16-24.
13. Dern, R.J., E. Beutler, and A. Alvino, *The hemolytic effect of primaquine. V. Primaquine sensitivity as a manifestation of a multiple drug sensitivity*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1955. 45(1): p. 30-39.
14. Carson, P.E., C.L. Flanagan, C.E. Ickes, and A.S. Alving, *Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes*. Science, 1956. 124(3220): p. 484-485.
15. Beutler, E., *The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Semin Hematol, 1990. 27(2): p. 137-64.
16. WHO, World Health Organization, Working Group, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group*. Bull World Health Organ, 1989. 67(6): p. 601-11.
17. Takizawa, T., I.Y. Huang, T. Ikuta, and A. Yoshida, *Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(12): p. 4157-61.
18. Longo, L., O.C. Vanegas, M. Patel, V. Rosti, et al., *Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal*. The EMBO journal, 2002. 21(16): p. 4229-4239.
19. Gómez-Manzo, S., J. Marcial-Quino, A. Vanoye-Carlo, H. Serrano-Posada, et al., *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World*. Int J Mol Sci, 2016. 17(12).
20. Luzzatto, L., C. Nannelli, and R. Notaro, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency*. Hematol Oncol Clin North Am, 2016. 30(2): p. 373-93.
21. Minucci, A., B. Giardina, C. Zuppi, and E. Capoluongo, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why?* IUBMB Life, 2009. 61(1): p. 27-34.
22. Beutler, E., M. Yeh, and V.F. Fairbanks, *The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for C-6-PD-deficiency as a marker*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. 48: p. 9-16.
23. Lim, F., T. Vulliamy, and S. Abdalla, *An Ashkenazi Jewish woman presenting with favism*. Journal of clinical pathology, 2005. 58(3): p. 317-319.

24. Minucci, A., K. Moradkhani, M.J. Hwang, C. Zuppi, et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations*. Blood Cells Mol Dis, 2012. 48(3): p. 154-65.
25. Howes, R.E., E.R. Chan, T.A. Rakotomanga, S. Schulte, et al., *Prevalence and genetic variants of G6PD deficiency among two Malagasy populations living in Plasmodium vivax-endemic areas*. Malar J, 2017. 16(1): p. 139.
26. Orkin, S.H., D.G. Nathan, D. Ginsburg, A.T. Look, et al., *Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood E-Book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
27. Howes, R.E., F.B. Piel, A.P. Patil, O.A. Nyangiri, et al., *G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map*. PLoS Med, 2012. 9(11): p. e1001339.
28. Howes, R.E., M. Dewi, F.B. Piel, W.M. Monteiro, et al., *Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions*. Malar J, 2013. 12: p. 418.
29. Kempinska-Podhorodecka, A., O. Knap, A. Drozd, M. Kaczmarczyk, et al., *Analysis of the genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in inhabitants of the 4th Nile cataract region in Sudan*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2013. 50(2): p. 115-118.
30. Roh, M.E., C. Oyet, P. Orikiriza, M. Wade, et al., *Screening for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Using Three Detection Methods: A Cross-Sectional Survey in Southwestern Uganda*. Am J Trop Med Hyg, 2016. 95(5): p. 1094-1099.
31. Shah, S.S., A. Macharia, J. Makale, S. Uyoga, et al., *Genetic determinants of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Kenya*. BMC medical genetics, 2014. 15(1): p. 93.
32. Meloni, T., G. Forteleoni, and G.F. Meloni, *Marked decline of favism after neonatal glucose-6-phosphate dehydrogenase screening and health education: the northern Sardinian experience*. Acta Haematol, 1992. 87(1-2): p. 29-31.
33. Beutler, E., *G6PD: Population genetics and clinical manifestations*. Blood Reviews, 1996. 10(1): p. 45-52.
34. Al-Jaouni, S.K., J. Jarullah, E. Azhar, and K. Moradkhani, *Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia*. BMC research notes, 2011. 4(1): p. 436.

35. Matsuoka, H., J. Wang, M. Hirai, M. Arai, et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Myanmar: G6PD Mahidol (487G> A) is the most common variant in the Myanmar population*. Journal of human genetics, 2004. 49(10): p. 544-547.
36. Louicharoen, C., E. Patin, R. Paul, I. Nuchprayoon, et al., *Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces Plasmodium vivax density in Southeast Asians*. Science, 2009. 326(5959): p. 1546-1549.
37. Laosombat, V., B. Sattayasevana, T. Chotsampancharoen, and M. Wongchanchailert, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants associated with favism in Thai children*. International journal of hematology, 2006. 83(2): p. 139-143.
38. Nkhoma, E.T., C. Poole, V. Vannappagari, S.A. Hall, et al., *The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2009. 42(3): p. 267-278.
39. Tsegaye, A., L. Golassa, H. Mamo, and B. Erko, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among malaria suspects attending Gambella hospital, southwest Ethiopia*. Malar J, 2014. 13: p. 438.
40. Beutler, E., K.G. Blume, J.C. Kaplan, G.W. Lohr, et al., *International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis*. Br J Haematol, 1977. 35(2): p. 331-40.
41. Biotech, T. *Glucose-6 Phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)*. 12.09.2015]; Available from: <http://www.trinityusa.com/Product Documents/345-29 EN.pdf>.
42. LaRue, N., M. Kahn, M. Murray, B.T. Leader, et al., *Comparison of quantitative and qualitative tests for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Am J Trop Med Hyg, 2014. 91(4): p. 854-61.
43. Osorio, L., N. Carter, P. Arthur, G. Bancone, et al., *Performance of BinaxNOW G6PD deficiency point-of-care diagnostic in P. vivax-infected subjects*. Am J Trop Med Hyg, 2015. 92(1): p. 22-7.
44. Brito, M.A., H.M. Peixoto, A.C. Almeida, M.R. Oliveira, et al., *Validation of the rapid test Carestart(tm) G6PD among malaria vivax-infected subjects in the Brazilian Amazon*. Rev Soc Bras Med Trop, 2016. 49(4): p. 446-55.

45. Ley, B., G. Bancone, L. von Seidlein, K. Thriemer, et al., *Methods for the field evaluation of quantitative G6PD diagnostics: a review*. Malar J, 2017. 16(1): p. 361.
46. von Seidlein, L., S. Auburn, F. Espino, D. Shanks, et al., *Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report*. Malar J, 2013. 12: p. 112.
47. Justin Green, GSK, Glaxo Smith Kline. *Tafenoquin & G6PD, HCMC 28th November 2011* [PowerPoint Presentation] 2011 16.03.2018]; Available from: http://sites.path.org/dx/files/2012/11/01_Green_Tafenoquine.pdf.
48. Shalev, O., A. Wollner, and J. Menczel, *Diabetic ketoacidosis does not precipitate haemolysis in patients with the Mediterranean variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. 288(6412): p. 179-80.
49. Ninfali, P. and N. Bresolin, *Muscle glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and oxidant stress during physical exercise*. Cell Biochem Funct, 1995. 13(4): p. 297-8.
50. Lee, D.H., T.E. Warkentin, P.B. Neame, and M.A. Ali, *Acute hemolytic anemia precipitated by myocardial infarction and pericardial tamponade in G6PD deficiency*. Am J Hematol, 1996. 51(2): p. 174-5.
51. Meloni, T., G. Forteleoni, A. Dore, and S. Cutillo, *Favism and hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient subjects in North Sardinia*. Acta Haematol, 1983. 70(2): p. 83-90.
52. Schiliro, G., A. Russo, R. Curreri, S. Marino, et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Sicily. Incidence, biochemical characteristics and clinical implications*. Clin Genet, 1979. 15(2): p. 183-8.
53. Rizzello, C.G., I. Losito, L. Facchini, K. Katina, et al., *Degradation of vicine, convicine and their aglycones during fermentation of faba bean flour*. Sci Rep, 2016. 6: p. 32452.
54. Arese, P., V. Gallo, A. Pantaleo, and F. Turrini, *Life and Death of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficient Erythrocytes – Role of Redox Stress and Band 3 Modifications*. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2012. 39(5): p. 328-334.

55. Kaplan, M. and C. Hammerman, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a hidden risk for kernicterus*. *Semin Perinatol*, 2004. 28(5): p. 356-64.
56. Johnson, L.H., V.K. Bhutani, and A.K. Brown, *System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus*. *J Pediatr*, 2002. 140(4): p. 396-403.
57. Luzzatto, L., *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype*. *Haematologica*, 2006. 91(10): p. 1303-6.
58. Valaes, T., S.A. Doxiadis, and P. Fessas, *Acute hemolysis due to naphthalene inhalation*. *The Journal of pediatrics*, 1963. 63(5): p. 904-915.
59. Johnson, L., V.K. Bhutani, K. Karp, E.M. Sivieri, et al., *Clinical report from the pilot USA Kernicterus Registry (1992 to 2004)*. *J Perinatol*, 2009. 29 Suppl 1: p. S25-45.
60. Kaplan, M., F.F. Rubaltelli, C. Hammerman, M.T. Vilei, et al., *Conjugated bilirubin in neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. *J Pediatr*, 1996. 128(5 Pt 1): p. 695-7.
61. Kaplan, M., P. Renbaum, E. Levy-Lahad, C. Hammerman, et al., *Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94(22): p. 12128-12132.
62. American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Hyperbilirubinemia *Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation*. *Pediatrics*, 2004. 114(1): p. 297-316.
63. Fiorelli, G., F.M. di Montemuros, and M.D. Cappellini, *Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants*. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2000. 13(1): p. 39-55.
64. Newman, T.B. and M.J. Maisels, *Evaluation and treatment of jaundice in the term newborn: a kinder, gentler approach*. *Pediatrics*, 1992. 89(5 Pt 1): p. 809-18.
65. Hafez, M., E.-S. Amar, M. Zedan, H. Hammad, et al., *Improved erythrocyte survival with combined vitamin E and selenium therapy in children with glucose-*

6-phosphate dehydrogenase deficiency and mild chronic hemolysis. The Journal of pediatrics, 1986. 108(4): p. 558-561.

66. WHO, World Health Organization. *World Malaria Report 2017*. 2017 01.04.2018]; Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>.
67. Eshetu, T., N. Abdo, K.H. Bedru, S. Fekadu, et al., *Open-label trial with artemether-lumefantrine against uncomplicated Plasmodium falciparum malaria three years after its broad introduction in Jimma Zone, Ethiopia*. Malar J, 2012. 11: p. 240.
68. Kakkilaya, B.S. *Journey of Scientific Discoveries*. 2015 31.10.2017]; Available from: <http://www.malariasite.com/history-science/>.
69. Löscher, T., *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise-und Migrationsmedizin*. 2010: Georg Thieme Verlag.
70. WHO, World Health Organization. *Management of severe malaria: a practical handbook – 3rd ed*. 2012 25.10.2017]; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79317/1/9789241548526_eng.pdf.
71. Hay, S.I., C.A. Guerra, A.J. Tatem, A.M. Noor, et al., *The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future*. Lancet Infect Dis, 2004. 4(6): p. 327-36.
72. Naing, C., M.A. Whittaker, V.N. Wai, and J.W. Mak, *Is Plasmodium vivax malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. 8(8): p. e3071.
73. Bousema, T. and C. Drakeley, *Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination*. Clin Microbiol Rev, 2011. 24(2): p. 377-410.
74. Mueller, I., M.R. Galinski, J.K. Baird, J.M. Carlton, et al., *Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite*. Lancet Infect Dis, 2009. 9(9): p. 555-66.
75. Galappaththy, G.N., A.A. Omari, and P. Tharyan, *Primaquine for preventing relapses in people with Plasmodium vivax malaria*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. Cd004389.

76. Silachamroon, U., S. Krudsood, S. Treeprasertsuk, P. Wilairatana, et al., *Clinical trial of oral artesunate with or without high-dose primaquine for the treatment of vivax malaria in Thailand*. *Am J Trop Med Hyg*, 2003. 69(1): p. 14-8.
77. Schwartz, E. and Y. Sidi, *New aspects of malaria imported from Ethiopia*. *Clin Infect Dis*, 1998. 26(5): p. 1089-91.
78. WHO, World Health Organization. *World Malaria Report 2016*. 2016 29.01.2017]; Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
79. WHO, World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. 2010 08.03.2018]; Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js19105en/>.
80. WHO, World Health Organization. *Policy brief on single-dose primaquine as a gametocytocide in Plasmodium falciparum malaria*. 2015 09.11.2017]; Available from: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_htm_gmp_2015.1.pdf.
81. WHO, World Health Organization. *Control and elimination of Plasmodium vivax malaria – A technical brief*. 2015.
82. Eziefula, A.C., R. Gosling, J. Hwang, M.S. Hsiang, et al., *Rationale for short course primaquine in Africa to interrupt malaria transmission*. *Malar J*, 2012. 11: p. 360.
83. Alere. *BinaxNOW® Malaria*. 01.04.2018]; Available from: [https://www.lagaay.com/Catalogus/Product information/250500/Binax Malaria Leaflet.pdf](https://www.lagaay.com/Catalogus/Product%20information/250500/Binax%20Malaria%20Leaflet.pdf).
84. Tinley, K.E., A.M. Loughlin, A. Jepson, and E.D. Barnett, *Evaluation of a rapid qualitative enzyme chromatographic test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. *Am J Trop Med Hyg*, 2010. 82(2): p. 210-4.
85. GenBank, International Nucleotide Sequence Database Collaboration. *GenBank Overview*. 2018 02.04.2018]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

86. Kahn, M., N. LaRue, C. Zhu, S. Pal, et al., *Recombinant human G6PD for quality control and quality assurance of novel point-of-care diagnostics for G6PD deficiency*. PLoS One, 2017. 12(5): p. e0177885.
87. Balgir, R.S., *Genetic diversity of hemoglobinopathies, G6PD deficiency, and ABO and Rhesus blood groups in two isolates of a primitive Kharia Tribe in Sundargarh District of Northwestern Orissa, India*. J Community Genet, 2010. 1(3): p. 117-23.
88. Kumar, P., U. Yadav, and V. Rai, *Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in India: An updated meta-analysis*. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 2016. 17(3): p. 295-302.
89. Mukherjee, M.B., R.B. Colah, S. Martin, and K. Ghosh, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among tribal populations of India - Country scenario*. Indian J Med Res, 2015. 141(5): p. 516-20.
90. Leslie, T., B. Moiz, N. Mohammad, O. Amanzai, et al., *Prevalence and molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Afghan populations: implications for treatment policy in the region*. Malar J, 2013. 12: p. 230.
91. Tadesse, F.G., H. Pett, A. Baidjoe, K. Lanke, et al., *Submicroscopic carriage of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a low endemic area in Ethiopia where no parasitaemia was detected by microscopy or rapid diagnostic test*. Malar J, 2015. 14: p. 303.
92. Carter, T.E., S.K. Mekonnen, K. Lopez, V. Bonnell, et al., *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Genetic Variants in Malaria Patients in Southwestern Ethiopia*. Am J Trop Med Hyg, 2018. 98(1): p. 83-87.
93. Pamba, A., N.D. Richardson, N. Carter, S. Duparc, et al., *Clinical spectrum and severity of hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient children receiving dapsons*. Blood, 2012. 120(20): p. 4123-4133.
94. Shekalaghe, S.A., R. ter Braak, M. Daou, R. Kavishe, et al., *In Tanzania, hemolysis after a single dose of primaquine coadministered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (G6PD A-) individuals*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54(5): p. 1762-8.
95. Domingo, G.J., A.W. Satyagraha, A. Anvikar, K. Baird, et al., *G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests*. Malar J, 2013. 12: p. 391.

96. Roth, E.F., Jr., S. Schulman, J. Vanderberg, and J. Olson, *Pathways for the reduction of oxidized glutathione in the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte: can parasite enzymes replace host red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase?* Blood, 1986. 67(3): p. 827-30.
97. Ley, B., M.S. Alam, J.J. O'Donnell, M.S. Hossain, et al., *A Comparison of Three Quantitative Methods to Estimate G6PD Activity in the Chittagong Hill Tracts, Bangladesh.* PLoS One, 2017. 12(1): p. e0169930.
98. Kahn, M., W.H. Ward, N. LaRue, M. Kalnoky, et al., *Maintaining specimen integrity for G6PD screening by cytofluorometric assays.* Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2015. 63(6): p. 454-458.
99. Kahn, M., N. LaRue, P. Bansil, M. Kalnoky, et al., *Cryopreservation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity inside red blood cells: developing a specimen repository in support of development and evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency tests.* Malar J, 2013. 12: p. 286.
100. Sattabongkot, J., T. Tsuboi, G.E. Zollner, J. Sirichaisinthop, et al., *Plasmodium vivax transmission: chances for control?* Trends in parasitology, 2004. 20(4): p. 192-198.
101. Lin, J.T., D.L. Saunders, and S.R. Meshnick, *The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence?* Trends in parasitology, 2014. 30(4): p. 183-190.
102. Burgoine, K.L., G. Bancone, and F. Nosten, *The reality of using primaquine.* Malar J, 2010. 9(1): p. 376.
103. Greene, L.S., *G6PD deficiency as protection against falciparum malaria: an epidemiologic critique of population and experimental studies.* American Journal of Physical Anthropology, 1993. 36(S17): p. 153-178.
104. Cappadoro, M., G. Giribaldi, E. O'Brien, F. Turrini, et al., *Early Phagocytosis of Glucose-6 Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Erythrocytes Parasitized by Plasmodium falciparum May Explain Malaria Protection in G6PD Deficiency.* Blood, 1998. 92(7): p. 2527-2534.
105. Clark, T.G., A.E. Fry, S. Auburn, S. Campino, et al., *Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility.* European Journal of Human Genetics, 2009. 17(8): p. 1080-1085.

106. Ruwende, C., S.C. Khoo, R.W. Snow, S.N. Yates, et al., *Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria*. *Nature*, 1995. **376**(6537): p. 246-9.
107. Malaria Genomic Epidemiology, N. and N. Malaria Genomic Epidemiology, *Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study*. *Nature genetics*, 2014. **46**(11): p. 1197-1204.
108. Okebe, J., A. Amambua-Ngwa, J. Parr, S. Nishimura, et al., *The prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Gambian school children*. *Malar J*, 2014. **13**: p. 148.
109. WHO, World Health Organization. *Map of distribution of haemoglobin disorders*. 2017 04.03.2017]; Available from:
<http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>.
110. WHO, World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. 2015 11.09.2015]; Third:[Available from:
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
ACT:	(engl. Artemisinine-based combination therapy) Artemisinin-basierter-Kombinationstherapie
Bspw.:	Beispielsweise
Bzw.:	beziehungsweise
Ca.:	circa
CNSHA:	(engl. Chronic nonherocytic hamolytic anemia) Chronische nicht-sphärozytische hämolytische Anämie
CQ:	Cloroquin
EDTA:	Ethylendinitrilotetraessigsäure- Dinatriumsalz- Dihydrat
et al.:	(lat. et alii) und andere
FST:	Fluoreszenz-Spot-Test
G6PD:	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GSH:	Glutathion
GSSG:	Glutathiondisulfid
Hb:	Hämoglobin
NADP:	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH:	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
P.:	Plasmodium
PCR:	(engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Ketten-Reaktion
PQ:	Primaquin
RDT:	(engl.: Rapid diagnostic test) Schnelltest
RFLP:	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
s.:	s.
Tab.:	Tabelle
Vgl.:	Vergleich
WHO:	(engl. World Health Organization) Weltgesundheitsorganisation

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Pentosephosphatweg.....	1
Abb. 2: Dreidimensionales Model des G6PD- Enzyms.....	2
Abb. 3: Der Pentosephosphatweg.....	3
Abb. 4: Lokalisation des G6PD-Gens.....	7
Abb. 5: Verteilung der Mutationen im <i>g6pd</i> Gen.....	9
Abb. 6: Die weltweite Verteilung bekannter Mutationen.....	11
Abb. 7: Prävalenz des G6PD-Mangels weltweit.....	14
Abb. 8: Merkmale der schweren Malaria-Infektion	27
Abb. 09: Studienort Jimma und Umgebung.....	31
Abb. 10: Mögliche Testergebnisse des BinaxNOW® Malaria Schnelltests.....	36
Abb. 11: Farbveränderung eines BinaxNOW® G6PD Schnelltests.....	37
Abb. 12: Bild des BinaxNOW® G6PD Schnelltests mit G6PD-defizienter Probe....	37
Abb. 13: Verteilung der G6PD-Aktivität in Prozent.....	51
Abb.14: Korrelation zwischen der G6PD-Aktivität angegeben in μMol substrate conversion/ 10^{11} erythrocytes/minute und in U/g Hb.....	51
Abb. 15: Weltweit Verteilung der Hämoglobinopathien.....	61
Abb. 16: Abbildung der 186 Mutationen.....	96
Abb. 17: Abbildung weiterer Mutationen	100

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bekannte oxidative Stressoren.....	4
Tab. 2: Verteilung der Einzelnukleotidsubstitutionen und ihre WHO-Assoziation.....	8
Tab. 3: WHO-Klassifikation mit Assoziation zu genetischen Varianten, Klinik und geographischer Verteilung.....	12
Tab. 4: Primersequenzen.....	41
Tab. 5: Übersicht Studienpopulation.....	47
Tab. 6: G6PD-Aktivitäten und Referenzwerte der Studienpopulation.....	48
Tab. 7: G6PD-Aktivitäten, G6PD-Genotypen und Herkunftsort der Studien- population.....	49
Tab. 8: Mutationen des <i>g6pd</i> Gens in der vorliegenden Studienpopulation.....	50
Tab. 9: Lagerungszeit der Proben und G6PD-Aktivität in U/g Hb.....	50
Tab. 10: G6PD-Aktivität der Studienpopulation angegeben in Prozent.....	50

11. Anhang

11.1 Verwendete Fragebögen

Day 0 (Recruitment)

Health Centre: _____ Date: ____/____/____

Patient: _____ ID No: _____

Address/mobile number: _____

Did the subject/or subject's representative sign the inform consent form?

Yes **No → Do not proceed!**

Age: _____ (years) **!!! ≥ 4 years !!!**

Sex: male female

Origin: city rural

Temperature (°C): _____ Weigth (kg): _____

Medical history:

Any symptoms	<input type="checkbox"/> No	If yes, please specify modality	Onset of symptoms
Fever		(°C) (Exclusion criteria!)	
Shivering		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe	
Headache		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe	
Nausea		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe	
Diarrhoea		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe	
Abdominal pain		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe	
Others (please specify)		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe	

Any symptoms for malaria? **Yes (→ Exclusion)** No

If yes, immediate referral to health centre or Jimma university hospital.

Is the female subject pregnant or breastfeeding? Yes No

Does the patient have any known illnesses? Yes No

If yes please mention in subject's history above.

Does the subject have any allergies? Yes No

If yes please mention in subject's history above.

Does the subject remember an episode of haemolysis? Yes No

If yes please mention in subject's history above.

Page 2 (Recruitment)

Does the subject remember side effects after drug intake? Yes No

Which drugs? _____

Did the subject ever receive blood transfusion? Yes No

Why? _____

Does the subject currently take any medicine regularly? Yes No

If yes please mention: _____ (Why? Check medical history)

Laboratory Work

EDTA blood taken Yes

Next appointment

Date ___/___/_____ Time: ___/___

Date, Place

Researcher's Name, Signature

Thank you!

Laboratory Results Day 0

Health Centre: _____

Date: ____/____/____

ID No: _____

Haemoglobin measured? Yes

Haemoglobin Results (mg/dl) Normal **Abnormal (see age scale)**
→ Iron supplementation

Filter papers prepared (6 x 15 µL)? Yes

Thin and thick smear prepared? Yes

Rapid Test G6PD-Enzyme Activity: Normal **Deficient**

Rapid Test Malaria: negative **positive** if positive, species: _____

Filter papers packed and frozen? Yes

Thin and thick smear:

negative positive (/µL: _____) Species: _____

Gametocytes seen? No Yes (/µL: _____)

If malaria positive:

Patient informed and referred for treatment? Yes No

Date, Place

Researcher's Name, Signature

Thank you!

Visit 2 (Follow-up)

Health Centre: _____

Date: ___ / ___ / _____

Patient: _____

ID No: _____

Address: _____

Had the subject a positive malaria test at day 0? **No** **Yes**

If yes (→ Proceed with CRF “Malaria patient follow-up”)

G6PD-Enzyme Activity: **Normal** **Deficient**

G6PD Card given **Yes** **No**

G6PD Information given **Yes** **No**

Date, Place

Researcher's Name, Signature

Thank you!

Malaria Patient Follow-up

Health Centre: _____

Date: ____/____/____

Patient: _____

ID No: _____

Had the subject a positive malaria test at day 0? No **Yes**

Rapid Test Malaria

negative positive if positive, species: _____

Thin and thick smear:

negative positive (/μL: _____ Species: _____

Patient already treated against malaria? **Yes** No

Drug: _____

If no, referral to health centre or Jimma university hospital for malaria treatment!

<u>Patient history since day 0:</u>

Symptoms since day 0	NO	If yes, please specify modality	Onset/end of symptoms	Causality (1=related, 2=probable 3=possible, 4=unrelated)
Fever		(°C)		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Shivering		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Headache		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Nausea		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Diarrhea		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Abdominal pain		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Others (specify)		<input type="checkbox"/> mild <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4

Any symptoms for malaria or other acute diseases now? Yes No

If yes, immediate referral to health centre or Jimma university hospital!

Page 2 malaria patient follow-up

G6PD-Enzyme Activity: Normal **Deficient**
G6PD Card given **Yes** No
G6PD Information given **Yes** No
Indication for primaquine? Yes* No

**Plasmodium vivax* or *P. ovale* infection

Contraindication for primaquine No **Yes (→ No primaquine!!!)[§]**

[§]Pregnancy, lactation, age < 4 years, G6PD deficiency, known allergy against primaquine

Treatment

Primaquine given? Yes No

(0.5 mg/kg KG once daily for 14 days given)

This treatment has to be combined with the standard chloroquine therapy.

Date, Place

Researcher's Name, Signature

Thank you!

Drop Out Form

Health Centre: _____ Date: ___ / ___ / _____

Patient: _____ ID No: _____

- Screening Failure

Reason: _____

- Lost to Follow-up:

Explanation:- _____

- Withdrawal:

Reason:- _____

- Protocol violation:

Explanation:- _____

Date, Place

Researcher's Name, Signature

Thank you!

11.2 Einverständniserklärungen mit Aufklärung

INFORMED CONSENT FORM – G6PD Study in Jimma Area - Adults

Oromiya Region Health Bureau
Jimma Zone Health Bureau
Jimma University
University of Munich

Dear Participant,

the **University of Jimma** and the **University of Munich**, Germany, are investigating a hereditary disease called **glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) enzyme deficiency**. Depending on the type of deficiency that is caused by gene mutations in the *g6pd* gene, the disease varies in severity from mild to severe with acute or chronic symptoms. Due to the hereditary mode (X-chromosomal) males have more often severe symptoms.

The activity of this enzyme is impaired and severe haemolysis (destruction of red blood cells) can occur. Destroyed red blood cells are processed in the liver. One of the end-products is bilirubin, a yellowish substance that accumulates in the body – in the skin (jaundice) causing itching and other organs as well as in the brain resulting in severe complications. Other signs and symptoms are anaemia, difficulty to breath, headache, confusion, dizziness, also weakness and fever. Haemolytic crises can end in death. This event can happen if certain medication is given or special food is eaten and the low enzyme activity cannot be compensated. Haemolytic crises can be prevented, if the disease is known and dangerous drugs or food are avoided.

One of the drugs, that should not be administered, is **primaquine**. It is a very effective drug for the treatment of malaria, especially in malaria caused by *Plasmodium vivax*. Relapses (a new disease episode) can be prevented by primaquine but without G6PD testing, primaquine cannot be recommended. Therefore, primaquine is not given in Jimma Zone at all.

With this study, we would like to change this situation and find those with G6PD enzyme deficiency to take care of them. For those with normal enzyme function, primaquine treatment can be recommended and introduced.

Procedures

If you agree that you take part in this study, we will take **2.7 ml of blood** and we will fill out a **questionnaire** together about your medical history.

Altogether 400 participants from Jimma and surrounding will be invited to participate in this study.

G6PD enzyme activity is tested with a rapid test and by gold standard method so called spectrophotometry. The results will be communicated to you in the following days. You will receive a written confirmation that you were tested and your enzyme status will be noted. If your enzyme activity is impaired, you will receive a **G6PD Card** where all dangerous drugs are listed. In any future admission, you should inform your doctor and present this card to avoid severe side effects caused by drugs.

Other tests will be at recruitment:

- Rapid diagnostic test for malaria
- Blood slide for malaria parasites
- Haemoglobin measurement
- Pregnancy test in women before treatment
- Molecular test for gametocytes (malaria parasites responsible for transmission)
- Gene mutation testing (performed in Munich, Germany, scientific research project)

In any case of malaria, you will be treated with the standard prescribed dose of artemether-lumefantrine or chloroquine depending on the malaria species. *Plasmodium vivax* malaria will be treated with chloroquine and primaquine if G6PD enzyme deficiency and pregnancy is excluded. You can have a so called asymptomatic malaria (parasites in blood without any symptoms), that should be treated to avoid any symptoms if parasite density increases and to stop transmission of malaria.

If you had parasites in blood and were treated, we will check haemoglobin and malaria at second visit by finger prick (10 µl).

In case of anaemia (low red blood cell count), we will give you iron supplementation. If anaemia is severe, we will refer you to the hospital for further examinations.

To investigate the different mutations that cause enzyme deficiency, we will spot some drops of blood on filter paper and transfer it to the Ludwig-Maximilians-University (LMU) in Germany, a partner of the Jimma University. The *g6pd* gene will be examined for known and unknown mutations in the LMU laboratory and compared to other *g6pd* genes world-wide. This will help to understand the origin and type of enzyme deficiency in your population.

Risks and discomfort

We will check your blood by venous blood puncture. This might cause some discomfort during blood drawing. The injection site will be carefully disinfected, the risk of local or systemic infection is therefore minimized but not totally excluded.

All malaria drugs used in this study are known and on the market for a long time, side effects are usually mild to moderate if any.

Benefits

If you agree to participate in this study, you will be informed about your G6PD enzyme deficiency status. You will be examined and treated free of charge for a potential malaria disease and anaemia.

The result of this research will elucidate the situation concerning G6PD deficiency in your society and help to find those vulnerable for certain drugs. Severe side effects like haemolytic crisis shall be avoided. On the other hand, primaquine shall be introduced as effective drug against *Plasmodium vivax* malaria to minimize recurring malaria episodes.

Date Safety, Confidentiality, Ethics

Your personal data will be handled confidentially. If you have any question about this study, we will be glad to tell you more. The participation is voluntary and you can refuse to take part in this study at any time and for any reason. If you begin this study, but decide to quit later, you will not face any disadvantage.

The blood samples will only be used for the intended research, but not for any other purpose. *Samples and data will be analysed in Jimma University and in the tropical institute in Munich, Germany, considering your personal rights and the data privacy laws in Germany.*

All information given by you and all tests results will be kept strictly confidential and officially belong to the university of Jimma. In case of your withdrawal, all data and samples will be destroyed without further analysis.

This study has been approved by the Ethical Clearance Committee of Jimma University.

Dear Participant,

We thank you for your cooperation. We would like to ask you to agree and take part in the study by giving the following declaration.

- I have been given detailed information about this study
- I had the opportunity to discuss any question with the researchers
- I understand that my participation in study is voluntary
- I agree to take part in this study by signing this consent form

Name of the participant _____ ID No. _____

Date

Date

Date

Signature of the participant

Signature of Witness

Signature of Researcher

11.3 G6PD-Ausweis

11.3.1 Englisch

Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) Enzyme Deficiency Card

Name: _____

Birth date: _____

Address: _____

The above named person has a G6PD enzyme deficiency of _____%.

This means a moderate/severe enzyme deficiency, most probably with an African variant. It was tested at Jimma University Hospital on _____.

G6PD enzyme deficiency is an inherited disease of the red blood cell. It is not infectious but can be dangerous for the patient if certain drugs are administered. Those drugs can cause life-threatening haemolyses (destruction of red blood cells). Depending on the gene mutation (African, Asian, Mediterranean variant), some of the drugs are more or less dangerous. Information about the mutation can be given 3 months after enzyme testing at the Jimma University Hospital by Dr. Sintayehu Fekadu.

The following drugs should not be given (high risk):

Acetanilide (acetanilid) $C_8 H_9 N O$

Acetylphenylhydrazine (2-Phenylacetohydrazide)	$C_8 H_{10} N_2 O$
Aldesulfone sodium (sulfoxone)	$C_{14} H_{14} N_2 Na_2 O_6 S_3$
Arsine	As-H3
Beta-Naphthol (2-Naphthol)	$C_{10} H_8 O$
Chloramphenicol	$C_{11} H_{12} C_{12} N_2 O_5$
Chloroquine	$C_{18} H_{26} Cl N_3$
Ciprofloxacin	$C_{17} H_{18} F N_3 O_3$
Dapsone (diaphenylsulfone)	$C_{12} H_{12} N_2 O_2 S$
Dimercaprol	$C_3 H_8 O S_2$
Doxorubicin	$C_{27} H_{29} N O_{11}$
Furazolidone	$C_8 H_7 N_3 O_5$
Glibenclamide	$C_{32} H_{28} Cl N_3 O_5 S$
Glucosulfone (glucosulfone sodium)	$C_{24} H_{34} N_2 Na_2 O_{18} S_3$
Isobutyl Nitrite	$C_4 H_9 N O_2$
Menadiol Sodium Sulfate (Vitamin k4 sodium sulfate)	$C_{11} H_8 Na_2 O_8 S_2$
Menadione (menaphthone)	$C_{11} H_8 O_2$
Menadione sodium Bisulfite (Vitamin K3 sodium bisulfite)	$C_{11} H_8 O_2 NaHSO_3$
Mepacrine (Quinacrine)	$C_{23} H_{30} Cl N_3 O$
Mesalazine - 5-Aminosalicylic Acid (paraminosalicylic acid)	$C_7 H_7 N O_3$
metamizole	$C_{13} H_{16} N_3 Na O_4 S$
Methyltinionium Chloride (methylene blue)	$C_{16} H_{18} Cl N_3 S$
Nalidixic Acid	$C_{12} H_{12} N_2 O_3$
Naphtalene, Pure (naphtalin)	$C_{10} H_8$
Niridazole	$C_6 H_6 N_4 O_3 S$
Nitrofurantoin (nitrofurazone)	$C_6 H_6 N_4 O_4$

Nitrofurantoin	$C_8 H_6 N_4 O_5$
O-Acetylsalicylic Acid (acetylsalicylic acid)	$C_9 H_8 O_4$
Oxidase, Urate (urate oxidase)	
Pamaquine	$C_{42} H_{45} N_3 O_7$
Pentaquine	$C_{18} H_{27} N_3 O$
Phenacetin (acetophenetidin)	$C_{10} H_{13} N O_2$
Phenazopyridine	$C_{11} H_{11} N_5$
Phenylhydrazine	$C_6 H_8 N_2$
Primaquine	$C_{15} H_{21} N_3 O$
Probenecid	$C_{13} H_{19} NO_4 S$
Stibophen (2-(2-Oxido-3,5-Disulphonatophenoxy)-1,3,2-Benzodioxastibole-4-6-Disulphonate)	$C_{12} H_4 Na_5 O_{16} S_4 Sb$
Sulfacetamide	$C_8 H_{10} N_2 O_3 S$
Sulfadimidine	$C_{12} H_{14} N_4 O_2 S$
Sulfafurazole (sulfafurazone, sulfisoxazole)	$C_{11} H_{13} N_3 O_3 S$
Sulfamethoxazole	$C_{10} H_{11} N_3 O_3 S$
Sulfanilamide (Sulphanilamide)	$C_6 H_8 N_2 O_2 S$
Sulfapyridine	$C_{11} H_{11} N_3 O_2 S$
Sulfasalazine, Salazosulfapyridine (salazopyrin)	$C_{18} H_{14} N_4 O_5 S$
Thiazosulfone (thiazolesulfone)	$C_9 H_9 N_3 O_2 S_2$
Tolonium Chloride, Tolonium Chloride (toluidine blue)	$C_{15} H_{16} Cl N_3 S$
Trinitrotoluene (2,4,6-Trinitrotoluene)	$C_7 H_5 N_3 O_6$

Following drugs are low risk drugs:

- Acetaminophen (**paracetamol**, Tylenol, Tralgon)
- Acetophenetidin (phenacetin)
- Aminopyrine (Pyramidon, amidopyrine)
- Antazoline (Antistine)

- Antipyrine
- Ascorbic acid (vitamin C)
- Benzhexol (Artane)
- Chloramphenicol [high risk for Mediterranean/Asian variants]
- Chlorguanidine (Proguanil, Paludrine)
- Chloroquine
- Colchicine
- Diphenhydramine (Benadryl)
- Isoniazid
- L-Dopa
- Menadione sodium bisulfite (Hykinone)
- Menaphthone
- *p*-Aminobenzoic acid
- Phenylbutazone
- Phenytoin
- Probenecid (Benemid)
- Procain amide hydrochloride (Pronestyl)
- Pyrimethamine (Daraprim)
- Quinidine
- Quinine
- Streptomycin
- Sulfacycline
- Sulfadiazine
- Sulfaguanidine
- Sulfamerazine
- Sulfamethoxyipyridazine (Kynex)
- Sulfisoxazole (Gantrisin)
- Trimethoprim
- Tripeleminamine (pyribenzamine)
- Vitamin K

11.3.2 Oromo

Kaardii hirrina inzaayimii Giluukoos-6-fosfeeti diihayidiroojineesii (G-6-FD)

Maqaa: _____.

Guyyaa dhalootaa: _____.

Teessoo: _____.

Namichi/ttiin maqaan isaa/shee kanaa olitti caqasame/te kun hirrina G-6-FD _____% qaba/di. Kana jechuunis hirrina giddugaleessa ykn cimaa inzaayimichaa, garaa-garummaa Afiriikummaa ta'uu ni mala. Qorannoon kun hospitaala yuniversiitii Jimmaatti guyyaa _____ hojjetame.

Hirrinna inzaayimii G-6-FD kun gosaan dhalootaa gara dhalootaatti kan darbu ta'ee dhukkuba seelii dhiiga diimaa ti. Dhukkuba ilbiisota ijaan hin argamneen kan daddarbu utuu hin ta'in dhukkubsattoonni yeroo qorichaalee tokko tokko fudhatanu kan cimuu danda'uudha. Korichootni kun seelii dhiiga diimaa barbadeessuudhaan hanga lubbuu baasuutti deemuu danda'u. Addaddummaa idda dhalootaatiin (Afiriikaa, Eeziyaa, Meditaraaniyaan, kkf) qorichootiin murtaa'ani miidhaa cimaa ykn laafaa ta'uu ni danda'u.

Odeeffannoon dhukkuba kanaa qorannoo inzaayimii godhatanii ji'a 3n booda hospitaala Yuniversiitii Jimmaatti Dr. Sintaayyoo Fiqaaduutiin kennamuu ni danda'a.

Qorichootni kanaan gaditti caqasaman rakkina cimaa waan huumaniiif kennamuu hin qabanu.

Asitaaniilamaayid (asitaaniliid)	C8 H9 N O
Asetiilfeniilhayidiraziin(2-Feniilasetohayidraazaayid)	C8 H10 N2 O
Aldeesalfoon soodiyeem (salfoksoon)	C14 H14 N2 Na2 O6 S3
Arsiin	As-H3
Beettaa-naaftool (2-naaftool)	C10 H8O
Kilooraaamfenikool	C11 H12 C12 N2 O5
Kilorokiin	C18 H26 Cl N3
Sippiroofiloksaasiin	C17 H18 F N3 O3
Dapsoon (diyafenyalsalfoon)	C12 H12 N2 O2 S
Dayimerkappirool	C3 H8 O S2
Doksoorubisiin	C27 H29 N O11
Fuuraazoliidoon	C8 H7 N3 O5
Gilibenkilaamaayid	C32 H28 Cl N3 O5 S

Gilukosalfoon (gilukosalfoon soodiyeem)	C24 H34 N2 Na2 O18 S3
Ayisobutiilnaayitiraayit	C4 H9 N O2
Menadiyol sodiyeem salfeet (vaayitamin k4 soodiyeem salfeet)	C4 H9 N O2
Meppaakiriin (kuyinaakiriin)	C11 H8 O2
Meesaalaaziin-5-amiinoosalisiliik asiid (paaraamiinoosalisiliik asiid)	C11 H8 O2 NaHSO3
Metaamizool	C23 H30 Cl N3 O
Meetiiltiyoonyeem kilooraayid (meetiliin biluu)	C7 H7 N O3
Nalidiksiik asiid	C13H16N3NaO4S
Naftaaliin	C12 H12 N2 O3
Niridaazool	C10 H8
Nayitiroofural (nayitiroofuraazon)	C6 H6 N4 O3 S
	C6 H6 N4 O4

11.3.3 Amharisch

ግሉኮስ-6-ፖስፌት ድሃድሮጅኔስ (ግ6ፖዲ) ኢንዛይም እጥረት ካርድ

ስም:- _____

የልደት ቀን :- _____

አድራሻ:- _____

ከላይ በስም ተጠቃሹ ግ6ፖድ ኢንዛይም እጥረት _____% አለው።

ይህም ማለት መጠነኛ/የከፋ ኢንዛይም እጥረት፣ ምናልባት የአፍሪካዊ ልዩነት ሊሆን ይችላል። ምርመራው ጅም የኒቨርስቲ ሆስፒታል በ ተሰርዕል።

ግ6ፖድ ኢንዛይም እጥረት በዘር የሚተላለፍ የቀይ ደም ህዋስ በሽታ ነው። ተላላፊ በሽታ አይደለም ነገር ግን ህመምተኞች የተወሰኑ መድሃኒቶችን ሲወስዱ በጣም አደገኛ ነው። እነዚያ የተወሰኑ መድሃኒቶች ህልፈተ-ህይወት የሚያደርስ በሽታ (የቀይ ደም ህዋስ መጥፋትን) ያስከትላሉ።

እንደዘር ልዩነታችን በሽታ (አፍሪካ፣ ኤሲያ፣ሜደትራኒያን ል ዩንቶች)፣ የተወሰኑት መድሃኒቶች ከፍ ያለ ወይም አነስተኛ ጎጂ ናቸው።

ስለዘር በሽታው መረጃ ኢንዛይሙን ከተመረመሩ 3 ወር በሁላ በ ዶ/ር ስንታየሁ ፍቃዱ ጅም የኒቨርስቲ ላይ ሊሰጥ ይችላል።

የሚከተሉት መድሃኒቶች መሰጠት የለባቸውም (አደገኛ)

አሴታሊኒሊድ (አሴታሊኒድ)	C ₈ H ₉ N O
አሴታይልፌናይልሃይድራዚን	C ₈ H ₁₀ N ₂ O
አልደሳለፎን ሱዲየም (ሳልፎክሶን)	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₃
አረሲን	As-H ₃
ቤታ-ናፍቶል(2-ናፍቶል)	C ₁₀ H ₈ O
ክሎሮአምፊኒኮል	C ₁₁ H ₁₂ C ₁₂ N ₂ O ₅
ክሎሮኩየን	C ₁₈ H ₂₆ Cl N ₃
ሲፕሮፍሎክሳሲሊን	C ₁₇ H ₁₈ F N ₃ O ₃
ዳፕሶን (ዲአፌኒልሳልፎን)	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂ S
ዲመረካፕሮል	C ₃ H ₈ O S ₂
ዶክሶሩቢሲን	C ₂₇ H ₂₉ N O ₁₁
ፉራዞሊዶን	C ₈ H ₇ N ₃ O ₅
ግሊቤክላሚድ	C ₃₂ H ₂₈ Cl N ₃ O ₅ S
ግሉኮሳልፎን (ግሉኮሳልፎን ሱዲየም)	C ₂₄ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₁₈ S ₃
አይሶቡታይል ናይትራይት	C ₄ H ₉ N O ₂
መናዲአል ሱዲየም ሳልፌት (ቫይታሚን ኬ 4 ሱዲየም ሳልፌት)	C ₁₁ H ₈ Na ₂ O ₈ S ₂
ሜናዳይኦን (ሜናፍቶን)	C ₁₁ H ₈ O ₂
ሜናዳይኦን ሱዲየም ቢስልፊት (ቫይታሚን ኬ3 ሱዲየም ቢሳልፋይት)	C ₁₁ H ₈ O ₂ NaHSO ₃
ሜፓክሪን (ኩይናክራይን)	C ₂₃ H ₃₀ Cl N ₃ O
ሜሳላዚን-5-አሚኖሳሊሳይክሊክ አሲድ (ፓራአሚኖሳሊሳይክሊክ አሲድ)	C ₇ H ₇ N O ₃
ሜታሚዞል	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ NaO ₄ S
ሜታይልቲይላኒየም ክሎራይድ (ሜታይልን ብሉ)	C ₁₆ H ₁₈ Cl N ₃ S

ናልዲሲክ አሲድ
 ናፕታሊን፣ፑዩር (ናፕታሊን)
 ኒራዳዞል
 ኒትሮፋራል(ኒትሮፋራዞን)
 ናይትሮፋራንሽን
 ኦ-አስትራሳልሳሊክ አሲድ (አሲቲልሳልሳሊክ አሲድ)
 አክሲዴዝ፣ ዩሬት(ዩሬት አክሲዴዝ)
 ፓማኩይን
 ፔንታኩይን
 ፊናሲቲን(አስቶሬንዲን)
 ፊናዞፔሪዲን
 ፊኒልድራዚን
 ፕሪማኪዩን
 ፕሮቤንሲድ
 ሰቲቦሬን(2-አክሲዶ-3-5-ዳሳልፎናቶሬኖክሲዴ)-1፣3፣2፣
 ቤንዞይኦክሳስተቦል-4-6-ዲሳልፎኔት
 ሳልፋስታማይድ
 ሳልፋድማይድ
 ሳልፋፋራዞል(ሳልፋራዞን፣ሳልፊሶክዛዞል)
 ሳልፋሜቶክዛዞል
 ሳልፋኒላማይድ(ሳልፋኒልአማይድ)
 ሳለፋፕሪሪዲን
 ሳልፋሳላዚን፣ ሳላዞሱፋፕሪሪዲን (ሳላዞፒሪን)
 ዚአዞሱልፎን (ዚአዞልሱለፎን)
 ቶሎኒም ክሎራይድ፣ ቶሎኒየም ክሎራይድ (ቶሎኒኒ ብሉ)
 ተራኒተሮቶሎን(2፣4፣6-ተሪኒተሮሎን)
የሚከተሉት መድሃኒቶች አደጋቸው ዝቅ ያለ ነው፡፡

C12 H12 N2 O3
 C10 H8
 C6 H6 N4 O3 S
 C6 H6 N4 O4
 C8 H6 N4 O5
 C9 H8 O4

 C42 H45 N3 O7
 C18 H27 N3 O
 C10 H13 N O2
 C11 H11 N5
 C6 H8 N2
 C15 H21 N3 O
 C13 H19 NO4 S

 C12 H4 Na5 O16 S4 Sb

 C8 H10 N2 O3 S
 C12 H14 N4 O2 S
 C11 H13 N3 O3 S
 C10 H11 N3 O3 S
 C6 H8 N2 O2 S
 C11 H11 N3 O2 S
 C18 H14 N4 O5 S
 C9 H9 N3 O2 S2
 C15 H16 Cl N3 S
 C7 H5 N3 O6

አሴታማኖኖን (ፓራሲታሞል፣ታይኖል፣ትራልጎል)
 አሴቶኖንቲዲን (ፊናሲቲን)
 አሚኖፕራይን(ፓይራሚዶን፣አሚዶፓሪን)
 አነታዞሊን
 አንቲፓይሪን
 አስክሮቢክ አሲድ(ቫይታሚን ሲ)
 ቤንዞክዞል
 ክሎሮአምፊኒኮል (ለሜዴትራኒዮን/ለአሲዶ አደገኛ
 ክሎሩጉኦኒዲን (ፕሮጉኦኒሊ፣ፓሎዶሪን)
 ክሎሮኩይን
 ኮልፎሲን
 ዳይሬንፕሪዶራማይን (ቤናደረይል
 አይሶኒአዛይድ
 ኤል-ዶፓ
 ሜንዳይኦን ሶዲየም ቢስለፋይት (ሐኪኖን)
 ሜናኖቶን
 ፖ-አሚኖቤንዞይክ አሲድ

ፊኒልቡታዞን
 ፊኒልቶይን
 ፕሮቤንሲድ (ብንሚድ)
 ፕሮኬይን አማይድ ሃይድሮክሎንድ
 ፓይሪሜታሚን (ዳራፕሪም)
 ኩይኒዲን
 ኩይኒን
 ስትሬፕቶማይሲን
 ሳልፋሲይቲን
 ሳልፋዲአዚን
 ሳለፋጉኦንዲን
 ሳልፋሜራዚን
 ሳለፋሜቶክሲፓይሪዳዞን (ካይኔክስ)
 ሳለፊሶክዛዞል (ጋንትሪሲን)
 ትራይሜቶፕሪም
 ትራፔሌናማይን (ፕይራብንዛማይን)
 ቫይታሚን ኬ

11.4. Bekannte Mutationen

Abb. 16: Abbildung der 186 Mutationen aus Minucci et al. 2012 [24]

Coding region substitutions.

1. Single missense mutations										
Mutation name	cDNA nucleotide substitution	gDNA nucleotide position	Codon	Amino acid substitution	Exon	Class	Secondary structural element/3D position	Origin's country	Conservation scores	Endonuclease digestion
No name	25C>T	25	9	Arg->Trp	2	NR ^a	Pre β A 1-31	Singapore	0.21	MspI site abolished
Sinnai	34G>T	34	12	Val->Leu	2	III	Pre β A 1-31	Italy	0.044	BsrI site created
Lages	40G>A	40	14	Gly->Arg	2	III	Pre β A 1-31	South America	0.089	HpyCH4V site created
Gaohe	95A>G	95	32	His->Arg	2	III	β A 32-37	Chinese	0.328	No site
Gidra	110T>C	110	37	Met->Thr	2	NR	β A 32-37	Chinese	0.654	No site
Rignano	130G>A	9987	44	Ala>Thr	3	III	α A 42-57 NAPD binding site 38-44	Italy	0.752	HaeIII site abolished
Orissa	131C>G	9988	44	Ala->Gly	3	III	α A 42-57 NAP binding site 38-44	India, Italy	0.752	HaeIII site abolished
Aures	143T>C	10000	48	Ile->Thr	3	III	α A 42-57	Algeria, Tunisia	0.569	DpnI site abolished
Kambos	148C>T	10005	50	Pro->Ser	3	III	α A 42-57	Cyprus	0.865	No site
Kozukata	159G>C	10111	53	Trp->Cys	4	I	α A 42-57	China	0.607	No site
Kamogawa	169C>T	10121	57	Arg->Trp	4	II	α A 42-57	China	0.449	No site
Palestrina	170G>A	10122	57	Arg->Glu	4	III	α A 42-57	Italy	0.449	No site
Metaponto	172G>A	10124	58	Asp->Asn	4	III	α A β B loop 56-64	Italy	0.42	BspEI site created
Costanzo	179T>C	10131	60	Leu->Pro	4	II	α A- β B loop 56-64	Italy	0.338	No site
Amazonia	185C>A	10137	62	Pro->His	4	II	α A- β B loop 56-64	Brazil	0.466	HaeIII site abolished
Musashino	185C>T	10137	62	Pro->Leu	4	III	α A- β B loop 56-64	Japan	0.466	TaqI site created
Songklanagarind	196T>A	10148	66	Phe->Ile	4	II	β B 65-71	Thailand	0.371	MspI site created
Asahi	202G>A	10154	68	Val->Met	4	III	β B 65-71	China	0.391	NlaIII site abolished
Namouuru	208T>C	10160	70	Tyr->His	4	II	β B 65-71	Vanuatu	0.464	NlaIII site created
Murcia Oristano	209A>G	10161	70	Tyr->Cys	4	III	β B 65-71	Archipelago Spain, Italy	0.464	BspI 12861 site created
Swansea	224T>C	10176	75	Leu->Pro	4	I	β B- α B loop 72-76	Wales, GB	0.441	No site
Ube Konan	241C>T	10193	81	Arg->Cys	4	III	α B 77-89	Japan, Italy	0.514	AccI site abolished
Lagosanto	242G>A	10194	81	Arg->His	4	III	α B 77-89	Italy	0.514	No site
Guangzhou	274C>T	10775	92	Pro->Ser	5	III	α B- α B' loop 90-92	China	0.226	DdeI site created
Hammersmith	323T>A	10824	108	Val->Glu	5	III	β C 105-109	GB, Mauritius	0.388	No site
Sao Borja	337G>A	10838	113	Asp->Asn	5	IV	β C- α B loop 110-114	Brazil	0.569	No site
Bao Loc	352T>C	10853	118	Tyr->His	5	II	α C 115-132	Vietnam	0.749	No site
A	376A>G	10877	126	Asn->Asp	5	III-IV	α C 115-132	Africa	0.397	FokI site created
Salerno Pyrgos	383T>G	10884	128	Leu->Arg	5	III	α C 115-132	Mediterranean	0.342	No site
Vanua Lava	383T>C	10884	128	Leu->Pro	5	II	α C 115-132	Italy, Greek Southwestern Pacific	0.342	MspI site abolished

1. Single missense mutations

Mutation name	cDNA nucleotide substitution	gDNA nucleotide position	Codon	Amino acid substitution	Exon	Class	Secondary structural element/3D position	Origin's country	Conservation scores	Endonuclease digestion
Quing Yan	392G>T	10893	131	Gly->Val	5	III	α C 115-132	China	0.21	DraIII site created
Cairo	404A>C	10905	135	Asn->Thr	5	NR	α C- β D loop 133-136	Egypt	0.501	No site
Valladolid	406C>T	10907	136	Arg->Cys	5	II	β D 136-140	Spain	0.551	AccI site abolished
Belem	409C>T	10910	137	Leu->Phe	5	II	β D 136-140	Brazil	0.615	No site
Liuzhou	442G>A	10943	148	Glu->Lys	5	II	α D 144-156	China	0.369	No site
Ilesha	466G>A	10967	156	Glu->Lys	5	III	α D 144-156	Africa	0.393	HinfI site abolished
Shenzen	473G>A	10974	158	Cys->Tyr	5	II	α D- β E loop 157-164	China	0.376	No site
Gond	477G>C	10978	159	Met->Ile	5	NR	α D- β E loop 157-164	India	0.513	No site
Mahidol	487G>A	11658	163	Gly->Ser	6	III	α D- β E loop 157-164	South East Asia	0.329	AluI site created
Plymouth	488G>A	11659	163	Gly->Asp	6	I	α D- β E loop 157-164	GB	0.329	BsrI site created
Taipei "Chinese-3"	493A>G	11664	165	Asn->Asp	6	II	β E 165-169	China	0.483	AvrII site created
Toledo	496C>T	11667	166	Arg->Cys	6	II	β E 165-169	France	0.946	AccI site abolished
Naone	497G>A	11668	166	Arg->His	6	II	β E 165-169	Southwestern Pacific	0.946	AccI site abolished
Volendam	514C>T	11685	172	Pro->Ser	6	I	β E- α E loop 170-176	Holland	1	No site
Nankang	517T>C	11688	173	Phe->Leu	6	II	β E- α E loop 170-176	China, Malaysia	0.774	AvaI site created
Miaoli	519C>G	11690	173	Phe->Leu	6	II	β E- α E loop 170-176	China	0.774	SylI site created
Shinshu	527A>G	11698	176	Asp->Gly	6	I	β E- α E loop 170-176	Japan	0.754	HaeIII site created
Chikugo	535A>T	11706	179	Ser->Cys	6	I	α E 177-190	Japan	0.734	AluI site abolished
Malaga	542A>T	11713	181	Asp->Val	6	III	α E 177-190	Spain	0.407	AhdI site abolished
Mediterranean Dallas, Panama, "Sassari"	563C>T	11734	188	Ser->Phe	6	II	α E 177-190	Mediterranean	0.372	MboI site created
Pedopolis-Ckaro	573C>G	11744	191	Phe->Leu	6	I	β F 191-205	Georgia	0.688	No site
Coimbra Shunde	592C>T	11763	198	Arg->Cys	6	II	β F 191-205 substrate binding site 198-205	Portugal Malaysia	0.932	AccI site abolished
Nilgiri	593G>A	11764	198	Arg->His	6	II	β F 191-205 substrate binding site 198-205	India	0.932	AccI site abolished
Santiago	593G>C	11764	198	Arg->Pro	6	I	β F 191-205 substrate binding site 198-205	Chile	0.932	BclI site created
Dagua	595A>G	11766	199	Ile->Val	6	NR	β F 191-205 substrate binding site 198-205	New Guinea	0.96	BstII site created
Sibari	634A>G	11805	212	Met->Val	6	III	α F 206-215	Italy	0.533	NlaIII site abolished
Minnesota, Marion, Gastonia, Lejeune	637G>T	11808	213	Val->Leu	6	I	α F 206-215	USA	0.543	No site

Harilaou	648T->G	11996	216	Phe->Leu	7	I	αg 216-222	Greek	0.924	HaeIII site created
Radlowo	679C->T	12027	227	Arg->Trp	7	II	αg-βG loop 223-231	Poland	0.571	HspII site abolished
Mexico City	680G->A	12028	227	Arg->Gln	7	III	αg-βG loop 223-231	Mexico	0.571	HspII site abolished
Asahikawa	695G->A	12043	232	Cys->Tyr	7	I	βG 232-238	Japan	0.476	No site
Nanning	703C->T	12051	235	Leu->Phe	7	III	βG 232-238	China	0.752	No site
Durham	713A->G	12061	238	Lys->Arg	7	I	βG 232-238	USA	0.478	No site
Wayne	769C->G	12117	257	Arg->Gly	7	I	αi 255-272	USA	0.915	HspII site abolished
Aveiro	806G->A	12519	269	Cys->Tyr	8	I	αi 255-272	Portugal	0.504	No site
Roubaix	811C->C	12524	271	Val->Leu	8	II	αi 255-272	France	0.563	No site
Cleveland Corum	820G->A	12533	274	Glu->Lys	8	I	αi-αj loop 273-281	USA, Turkey	0.792	MBoll site created
Lille	821A->T	12534	274	Glu->Val	8	I	αi-αj loop 273-281	France	0.792	HphI site created
Bangkok	825G->C	12538	275	Lys->Asn	8	I	αi-αj loop 273-281	China	0.431	FauI site created
Sugao	826C->T	12539	276	Pro->Ser	8	I	αi-αj loop 273-281	Japan	0.975	No site
La Jolla	832T->C	12545	278	Ser->Pro	8	I	αi-αj loop 273-281	USA	0.517	MnII site abolished
Wexham	833C->T	12546	278	Ser->Phe	8	I	αi-αj loop 273-281	GB	0.517	MnII site abolished
Chinese-1	835A->T	12548	279	Thr->Ser	8	II	αi-αj loop 273-281	China	0.414	MnII site created
Haikou	835A->G	12548	279	Thr->Ala	8	II	αi-αj loop 273-281	China	0.414	AccI site created
Bajo Maumere	844G->T	12557	282	Asp->Tyr	8	III	αj 282-292	Japan (Indonesia)	0.619	NdeI site created
Seattle, Lodi, Modena, Ferrara II, Athens-like	844G->C	12557	282	Asp->His	8	III	αj 282-292	USA, Italy	0.619	DdeI site abolished
Mizushima	848A->G	12561	283	Asp->Gly	8	II	αj 281-292	Japan	0.511	ZnII site abolished
Papua	849C->A	12562	283	Asp->Glu	8	NR	αj 282-292	New Guinea	0.511	AatII site abolished
Piotrkow	851T->C	12564	284	Val->Ala	8	I	αj 281-292	Poland	0.713	AatII site abolished
Osaka	853C->T	12566	285	Arg->Cys	8	II	αj 282-292	Japan	0.791	No site
Montalbano	854G->A	12567	285	Arg->His	8	III	αj 282-292	Italy	0.791	MuII site created
Viangchan, Jammu	871G->A	13031	291	Val->Met	9	II	αj 282-292	China	0.844	Hpy188III site created
West Virginia	910G->T	13070	303	Val->Phe	9	I	αk 300-303	USA	0.525	Avall site abolished
Seoul	916G->A	13076	306	Gly->Ser	9	II	βH 304-310	China	0.873	DdeI site created
Omiya	921G->C	13081	307	Gln->His	9	I	βH 304-310	NR	0.927	RsaI site abolished
Ludhiana	929G->A	13089	310	Gly->Glu	9	II	βH 304-310	India	0.441	NlaIV site abolished
Kalyan-Kerala, Jamnaga, Rohini Manhattan	949G->A	13109	317	Glu->Lys	9	III	βH-βI loop 311-336	India	0.299	No site
Rehevor Farroupilha	964T->C	13124	322	Tyr->His	9	I	βH-βI loop 311-336	USA	0.530	KpnI site abolished
	977C->A	13137	326	Pro->His	9	II/III	βH-βI loop 311-336	Africa South America	0.880	KpnI site abolished
Insuli	989G->A	13149	330	Arg->His	9	IV	βH-βI loop 311-336	India	0.338	DraIII site created

1. Single missense mutations

Mutation name	cDNA nucleotide substitution	gDNA nucleotide position	Codon	Amino acid substitution	Exon	Class	Secondary structural element/3D position	Origin's country	Conservation scores	Endonuclease digestion
Chatham	1003G->A	13163	335	Ala->Thr	9	II	βH-βI loop 311-336	Italy, Asia, Africa	0.5	AccI site abolished
Fushan	1004C->A	13164	335	Ala->Asp	9	II	βH-βI loop 311-336	China	0.5	BglI site abolished
Torun	1006A->G	13166	336	Thr->Ala	9	I	βH-βI loop 311-336	Polish	1	AccI site created
Chinese-5	1024C->T	13184	342	Leu->Phe	9	III	βI 337-342	China	0.527	MnII site abolished
Mira d'Aire	1048G->C	13208	350	Asp->His	9	IV	βI-βJ loop 343-353	Portugal	0.428	NlaIII site created
Partenope	1052G->T	13351	351	Gly->Val	10	II	βI-βJ loop 343-353	Italy	0.951	No site
Ierapetra	1057C->T	13356	353	Pro->Ser	10	II	βI-βJ loop 343-353	Greece	1	No site
Iwatsuki	1081G->A	13380	361	Ala->Thr	10	I	dimer interface domain βJ-βK loop 360-365	Japan	0.561	HaeIII site abolished
Serres	1082C->T	13381	361	Ala->Val	10	I	dimer interface domain βJ-βK loop 360-365	Greece	0.561	Avall site created
Aachen	1089C->G	13388	363	Asn->Lys	10	I	dimer interface domain βJ-βK loop 360-365	Germany	0.457	No site
Loma Linda	1089C->A	13388	363	Asn->Lys	10	I	dimer interface domain βJ-βK loop 360-365	USA	0.457	No site
Tenri	1096A->G	13395	366	Lys->Glu	10	I	dimer interface domain βK 366-373	Japan	0.362	BstII site created
Montpellier	1132G->A	13431	378	Gly->Ser	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	France	0.352	MscI site created
Calvo Mackenna	1138A->G	13437	380	Ile->Val	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	USA	0.533	AatII site created
Riley	1139T->C	13438	380	Ile->Thr	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	USA	0.533	MbolI site abolished
Olomouc	1141T->C	13440	381	Phe->Leu	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	Czech Republic	0.78	FokI site created
Tomah	1153T->C	13452	385	Cys->Arg	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	USA, Spain	0.301	Fnu4HI site created
Lynwood	1154G->T	13453	385	Cys->Phe	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	USA	0.301	BstI site abolished
Madrid	1155C->G	13454	385	Cys->Trp	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	Spain	0.301	HpyCHAV site abolished
Iowa, Walter Reed, Springfield	1156A->G	13455	386	Lys->Glu	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	USA, GB	0.311	No site
Guadalajara	1159C->T	13458	387	Arg->Cys	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	Mexico, USA, India, Japan	0.417	HhaI site abolished
Beverly Hills, Genova, Iwate, Niigata, Yamaguchi	1160G->A	13459	387	Arg->His	10	I	dimer interface domain βK-βL loop 374-388	Italy, USA, Japan	0.417	HhaI site abolished

Hartford	1162A->G	13461	388	Asn->Asp	10	I	βK-βL loop 374-388 dimer interface domain	USA	0.867	BstUI site created
Praha	1166A->G	13465	389	Glu->Gly	10	I	βL 389-395 dimer interface domain	Czech Republic	0.432	AluI site abolished
Krakow	1175T->C	13468	392	Ile->Thr	10	I	βL 389-395 dimer interface domain	Poland	0.647	MnlI site abolished
Wisconsin	1177C->G	13476	393	Arg->Gly	10	I	βL 389-395 dimer interface domain	USA	0.749	AccI site abolished
Nashville, Anaheim, Portici	1178G->A	13447	393	Arg->His	10	I	βL 389-395 dimer interface domain	USA, Italy, Portugal	0.749	BstUI site abolished
Alhambra	1180G->C	13479	394	Val->Leu	10	I	βL 389-395 dimer interface domain	Sweden, Finland	0.633	PstI site created
Bari	1187C->T	13486	396	Pro->Leu	10	I	βL-βM loop 396-398 dimer interface domain	Italy	0.92	AluI site created
Puerto Limon	1192G->A	13491	398	Glu->Lys	10	I	βL-βM loop 396-398 dimer interface domain	Costa Rica	0.831	MnlI site abolished
Anadia	1193A->G	13492	398	Glu->Gly	10	II	βL-βM loop 396-398 dimer interface domain	Portugal	0.831	MnlI site abolished
Covao do Lobo	1205C->A	13504	402	Thr->Asn	10	I	βM 399-407 dimer interface domain	Portugal	0.6	No site
Clinic	1215G->A	13514	405	Met->Ile	10	I	βM 399-407 dimer interface domain	Spain, France	0.408	No site
Abeno	1220A->C	13519	407	Lys->Thr	10	II	βM 399-407 dimer interface domain	Japan	0.868	No site
Utrecht	1225C->T	13524	409	Pro->Ser	10	I	βM-βN loop 408-414 dimer interface domain	Holland	0.785	MspI site abolished
Suwalki	1226C->G	13525	409	Pro->Arg	10	I	βM-βN loop 408-414 dimer interface domain	Poland	0.785	MspI site abolished
Japan, Shinagawa	1229G->A	13528	410	Gly->Asp	10	I	βM-βN loop 408-414 dimer interface domain	Japan, Israel	0.773	NciI site abolished
Kawasaki	1229G->C	13528	410	Gly->Ala	10	I	βM-βN loop 408-414 dimer interface domain	Japan	0.773	HaeIII site created
Riverside	1228G->T	13527	410	Gly->Cys	10	I	βM-βN loop 408-414 dimer interface domain	Germany	0.773	MspI site abolished
Munich	1231A->G	13530	411	Met->Val	10	I	βM-βN loop 408-414 dimer interface domain	Germany	0.419	NlaIII site abolished
Tokyo, Fukushima	1246G->A	13545	416	Glu->Lys	10	I-II	βN 415-423 dimer interface domain	Japan	0.358	StyI site created
Surabaya	1291G->A	13694	431	Val->Met	11	II	αI 426-432	Indonesia	0.325	HpyCH4IV site abolished
Sumare	1292T->G	13695	431	Val->Gly	11	I	αI 426-432	Brazil	0.325	HpyCH4IV site abolished
Pawnee	1316G->C	13719	439	Arg->Pro	11	II	αM 436-446	USA	0.72	FatI site created
Telti/Kobe	1318C->T	13741	440	Leu->Phe	11	I	αM 436-446	Japan	0.945	AccI site abolished
Santiago de Cuba, Morioka	1339G->A	13742	447	Gly->Arg	11	I	αM-αN loop 447-454	Cuba	0.913	PstI site created
S. Antioco	1342A->G	13745	448	Ser->Gly	11	II	αM-αN loop 447-454	Italy	0.521	HaeIII site abolished
Cassano	1347G->C	13750	449	Gln->His	11	II	αM-αN loop 447-454	Italy, Greece	0.535	NlaIII site created
Harima	1358T->A	13761	453	Val->Glu	11	I	αM-αN loop 447-454	NR	0.572	

1. Single missense mutations

Mutation name	cDNA nucleotide substitution	gDNA nucleotide position	Codon	Amino acid substitution	Exon	Class	Secondary structural element/3D position	Origin's country	Conservation scores	Endonuclease digestion
Andalus	1361G->A	13764	454	Arg->His	11	II	αM-αN loop 447-454	Spain	0.681	TaqI site created
Union, Maewo, Chinese-2, Kalo	1360C->T	13763	454	Arg->Cys	11	II	αM-αN loop 447-454	Italy, Spain, China, Japan	0.681	FspI site abolished
Figuera da Foz	1366G->C	13874	456	Asp->His	12	I	αN 455-473	Portugal	0.813	FspI site abolished BssSI site created
Amiens	1367A->T	13875	456	Asp->Val	12	I	αN 455-473	France	0.813	TaqI site created
Canton, Taiwan-Hakka, Gifu-like, Agrigento-like	1376G->T	13884	459	Arg->Leu	12	II	αN 455-473	Japan, Italy	0.524	TaqI site created No site
Cosenza	1376G->C	13884	459	Arg->Pro	12	II	αN 455-473	Italy	0.524	DdeI site created
G6PD Nice	1380G->C	13888	460	Glu->Asp	12	III	αN 455-473	France	0.445	HaeIII site abolished
Yunan	1381G->A	13889	461	Ala->Thr	12	NR	αN 455-473	China	0.681	StuI site abolished
Flores	1387C->A	13895	463	Arg->Ser	12	II	αN 455-473	Portugal	0.488	No site
Kamiube, Keelung	1387C->T	13895	463	Arg->Cys	12	III	αN 455-473	Japan	0.488	No site
Kaiping, Anant, Dhon, Sapporo-like, Wosera	1388G->A	13896	463	Arg->His	12	II	αN 455-473	China	0.488	No site
Neapolis	1400C->G	13908	467	Pro->Arg	12	III	αN 455-473	Italy	0.719	BtsI site abolished
Laibin	1414A->C	13922	472	Ile->Leu	12	NR	αN 455-473	China	0.397	AluI site created
Split	1442C->G	13950	481	Pro->Arg	12	III	βO-αO loop 474-489	Croatia	0.32	AccI site created
Fukaya	1462G->A	14067	488	Gly->Ser	13	I	βO-αO loop 474-489	Japan	0.798	HaeIII site abolished
Campinas	1463G->T	14068	488	Gly->Val	13	I	NADP+ structural site βO-αO loop 474-489	Brazil	0.798	HinfI site created
Buenos Aires	1465C->T	14070	489	Pro->Ser	13	I	NADP+ structural site βO-αO loop 474-489	Argentina (Italy)	0.942	HaeIII site abolished
Arakawa	1466C->T	14071	489	Pro->Leu	13	I	NADP+ structural site βO-αO loop 474-489 NADP+ structural site	Japan	0.942	Sau96I site abolished
2. Single nonsense mutations										
Georgia	1284C->A	13560	428	Tyr->End	10	I	αI 426-432	Philippines	0.573	DraIII site abolished
3. Multiple missense mutations										
Honiara	99A->G	99	33	Ile->Met	2	I	βA 32-37	Solomon Islands	0.369	No site
	1360C->T	13763	454	Arg->Cys	11				0.681	FspI site abolished
A ₁ (202)	202G->A 376A->G	10154	68	Val->Met	4	III	βB 65-71	Africa, Mediterranean	0.391	NlaIII site abolished
		10877	126	Asn->Asp	5		cc 115-132		0.397	FokI site created
No name	202G->A 376A->G 1264C->G	10154	68	Val->Met	4	I	βB 65-71	African	0.391	NlaIII site abolished
		10877	126	Asn->Asp	5		cc 115-132	American	0.397	FokI site created
		13563	422	Leu->Val	10		βN 415-423		0.682	AvrII site abolished
Hechi	202G->A	10154	68	Val->Met	4	II	βB 65-71	China	0.391	NlaIII site abolished
	871G->A	13031	291	Val->Met	9		αI 281-292		0.844	XbaI site created

Cincinnati	637G->T	11808	213	Val->Leu	6	I	of 206-215	USA	0.543	No site
Vancouver	1037A->T	13197	346	Asn->Ile	9		β L- β J loop 342-353	USA (Canada)	0.808	No site
	317C->G	10818	106	Ser->Cys	5	I	β C 105-109		0.381	No site
	544C->T	11715	182	Arg->Tyr	6		oe 177-190		0.498	HpaII site abolished
Crispim	592C->T	11763	198	Arg->Cys	6		β F 191-205	Brazil (Amazonia)	0.932	AccI site abolished
	375G->T	10876	125	Met->Ile	5	II	oc 115-132		0.596	BtsI site abolished
	379G->T	10880	127	Ala->Ser					0.441	BtsI site abolished
	383T->C	10884	128	Leu->Pro					0.342	MnII site abolished
	384C->T	10885								MnII site abolished
Acrokorinthos	376A->G	10877	126	Asn->Asp	5	II	oc 115-132	Greece	0.397	FokI site created
Santamaria	463C->G	10964	155	His->Asp	12		od 144-156	Costa Rica, Italy	0.435	BssSI site abolished
	376A->G	10877	126	Asn->Asp	5	II	oc 115-132		0.397	FokI site created
	542A->T	11713	181	Asp->Val	6		oe 177-190		0.407	AhdI site abolished
A ⁻⁽⁶⁸⁰⁾	376A->G	10877	126	Asn->Asp	5	III	oc 115-132	Africa	0.397	FokI site created
	680G->T	120228	227	Arg->Leu	7		og- β G loop 223-231		0.571	HapII site abolished
Ananindeua	376A->G	10877	126	Asn->Asp	5	II	oc 115-132	Brazil (Amazonia)	0.397	FokI site created
A ⁻⁽⁹⁸⁸⁾ Betica, Selma, Guantanamo	871G->A	13031	291	Val->Met	9		oj 281-292	Africa, Spain	0.844	XbaI site created
	376A->G	10877	126	Asn->Asp	5	III	oc 115-132		0.397	FokI site created
	968T->C	13128	323	Leu->Pro	9		β H- β I loop 311-336		0.414	HpaII site created
Mt Sinai	376A->G	10877	126	Asn->Asp	10	I	oc 115-132	Spain	0.397	FokI site created
	1159C->T	13458	387	Arg->His			β K- β L loop 374-388		0.417	HhaI site abolished
Hermoupolis	1347C->C	13750	449	Gln->His	11	II	om-am loop 447-454	Greece	0.535	NhaII site created FspI site abolished
Bangkok Noi	1360C->T	13763	454	Arg->Cys	12	I	on 455-473	Thailandia	0.681	No site created
	1376C->T	13884	459	Arg->Leu			post oio		0.524	No site created
	1502T->G	14107	501	Phe-Cys					0.336	BsrI site abolished
4. Deletions										
Sunderland	105_107del CAT	105-107	33 or 34	Ile	2	I	β A 32-37	GB	0.638	-
Amsterdam	180_182del TCT	10132-34	61	Leu	4	I	oa- β B loop 56-64	Holland	0.732	0.706
Urayasu	281_283del AGA	10782-10784	95	Lys	4	I	ob' 93-103	Japan	0.306	-
Tsukui	561_563del CTC	11732-11734	188 or 189	Ser	6	I	oe 177-190	Japan	0.372	-
North Dallas	683_685del ACA	12031-12033	229	Asn	7	I	og- β G loop 223-231	USA	0.399	0.418
Stonybrook	724_729del GCCACT	12072-12077	242-243	Gly-Thr	7	I	β G-nh loop 239-246	USA	0.979	Ddel site abolished
Nara	953_976del CCACAAAGGGTACCTGGACGACC	13113-13136	319-326	Thr-Lys-Gly-Tyr-Leu-Asp-Asp-Pro	9	I	β H- β I loop 311-336	Japan	-	-
Villeurbanne	1000_1002del ACC	13160-13162	334	Thr	9	I	β H- β I loop 311-336	France	0.706	-
Tondela	1084_1101del CTGAACGACGGGAGGCC	13383-13400	362-367	Leu-Asn-Glu-Arg-Lys-Ala	10	I	β J- β K loop 360-365	Portugal	-	-
Brighton	1488_1490del GAA	14093-14095	497	Lys	13	I	oo 490-497	GB	0.397	-

1. Intronic mutations

Varnsdorf	IVS10-2_1del AG	13689-13690	-	-	-	I	-	Czech Republic	-	-
Zurich	IVS10-2A>G	13689A->G	-	-	-	NR	-	Switzerland	-	-

Abb. 16: Weitere Mutationen aus Gómez-Manzo et al. [19]

Mutation Name	cDNA Nucleotide Substitution	Codon	Amino Acid Substitution	Exon	Class	Origin's Country
Single Missense Mutations						
Vietnam 1	7G > A	3	Glu → Lys	2	NR	Vietnam
México DF	193A > G	65	Thr → Ala	4	NR	Mexico
Bahia	197T > A	66	Phe → Thr	4	II	Brazil
Vietnam 2	197T > G	66	Phe → Cys	4	NR	Vietnam
San Luis Potosi	376A > T	126	Asn → Tyr	5	II	Mexico
Gaza	536G > A	179	Ser → Asn	6	NR	Palestine
Herlev	592C > A	198	Arg → Ser	6	I/II	Denmark
Coimbra	593G > A	198	Arg → His	6	II	India
San Paulo	660C > G	220	Ile → Met	7	IV	Brazil
Shanghai	691G > C	231	Ala → Pro	7	NR	Chinese
Tunisia	737T > C	246	Arg → Leu	7	III	Tunisia
Zacatecas	770G > T	257	Arg → Leu	7	I	Mexico
Hamburg	827C > T	276	Pro → Leu	8	I	Germany
Tunis	920A > C	307	Gln → Pro	9	II	Tunisia
Nefza	968T > C	323	Leu → Pro	9	III	Tunisia
Karachi	973G > A	325	Asp → Asn	9	NR	Pakistan
Quilmes	995C > T	332	Ser → Phe	9	I	Argentina
Unnamed	1088A > T	363	Asn → Ile	10	I	China
Veracruz	1094G > A	365	Arg → His	10	I	Mexico
Unnamed	1187C > G	396	Pro → Arg	10	I	Korea
Merlo	1226C > A	409	Pro → Gln	10	I	Argentina
Yucatan	1285A > G	429	Lys → Glu	10	I	Mexico
Tennessee	1465C > G	422	Leu → Val	10	I	USA
Multiple Missense Mutations						
Taif	516–518 del	174	Gly	6	I	Saudi Arabia
Sierra Leona	311G > A	104	Arg → His	5	III	Sierra Leone
	376A > G	126	Asn → Asp			
Palermo	769C > A	257	Arg → Met	7	I	Italy
	770G > T					
Viangchan + Mahidol	871G > A	291	Val → Met	9, 6	II/III	Thailand
	487G > A	163	Gly → Ser			
Viangchan + Union	871G > A	291	Val → Met	9, 11	II/III	Thailand
	1360C > T	454	Arg → Cys			
Non-Coding Region Substitutions						
Qingzhen	IVS5-1G > A	-	-	-	NR	-
Unnamed	IVS-VIII 43G > A	-	-	-	III	Tunisia
Unnamed	IVS-V 655C > T	-	-	-	III	Tunisia

11.5 Poster

12. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Nicole Berens-Riha für die freundliche Bereitstellung des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung, für die Ermöglichung meines Aufenthaltes in Äthiopien sowie die Geduld und fürsorgliche Betreuung bei der Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löscher, ehemaliger Direktor des Tropeninstitutes München, danke ich für die Unterstützung und freundliche Aufnahme in die Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Danken möchte ich auch allen Teilnehmern der Studie. Ohne ihr Interesse wäre dieses Projekt nicht durchführbar gewesen.

Frau Prof. Dr. med. Elisabeth Kohne, Leiterin des Hämoglobinlabors der Universität Ulm und Herrn Joaquin Brintrup danke ich für die Kooperation und Mitarbeit. Ebenso danken möchte ich Frau Margit Götz und Sylvia Mack aus dem Hämoglobinlabor der Universität Ulm.

Weiterhin spreche ich meinen Dank aus an Ass. Prof. Dr. Ahmed Zeynudim Kassim, BSc, MSc, Nure Abdusalam und Wondim Adissu der Universität Jimma, Äthiopien. Ebenso ganz herzlich danken möchte ich PD Dr. med. Andreas Wieser, PD Dr. med. Michael Pritsch und allen Kolleginnen und Kollegen, die zum Gelingen der Studie beigetragen haben.

Besonderen Dank meinen lieben Eltern und Geschwistern, die mein Vorhaben immer unterstützt haben und mir mit viel Geduld und Kraft zur Seite standen. Danken möchte ich auch allen Freunden, die meine Arbeit und Tätigkeit mit Interesse verfolgt haben und mich ermutigt und unterstützt haben.

Dank an alle nicht namentlich genannten, die mir während der Promotion hilfreich waren.

13. Curriculum Vitae

14. Eidesstaatliche Versicherung

Kießling, Nora Juliane Irma

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Geno-und Phänotypisierung des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)-Mangels zur Mutations-und Prävalenzbestimmung in der äthiopischen Bevölkerung der Jimma Region, Äthiopien“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 19.07.2019

Ort, Datum

Nora Kießling

Unterschrift der Doktorandin

