

CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hämolyse nach Therapie bei unkomplizierter Malaria
in Gabun

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna Kim
aus Witten

Datum der Promotion: 04.03.2022

FÜR SARA

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungen	4
Zusammenfassung	5
Abstract	6
1 Einleitung	8
1.1 Malaria.....	8
1.1.1 Vektor, Erreger und Lebenszyklus	8
1.1.2 Epidemiologie	10
1.1.3 Klinische Eigenschaften der Malaria	12
1.1.4 Erworbene Semi-Immunität.....	14
1.1.5 Diagnostik	15
1.1.6 Therapie.....	16
1.2 Anämie	18
1.2.1 Malaria assoziierte Anämie	18
1.3 Verzögerte Hämolyse nach Therapie	19
1.3.1 Diagnostik	22
1.3.2 Haptoglobin Negativität.....	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2 Materialien und Methoden	27
2.1 Studienrahmen	27
2.1.1 Studiendesign und Zielsetzung	27
2.1.2 Studienzeitraum	27
2.1.3 Studienort.....	27
2.1.4 Malaria Endemizität in Gabun.....	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Klinische Methoden.....	30
2.2.2 Labor Methoden.....	33
2.2.3 Laborparameter zum Endpunkt Hämolyse T14.....	36
2.2.4 Datenmanagement	41
2.2.5 Statistische Berechnungen	41
2.2.6 Ethisches Statut	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Studienpopulation.....	43

3.2	Endpunkt Hämolyse an T14	46
3.2.1	Unterschiede zwischen AL und FOSPIP	49
3.3	Anämie	52
3.4	Ehemals-infizierte Erythrozyten	53
3.4.1	Messvalidierung (Autofluoreszenz)	53
3.4.2	Vorkommen von oie in der Studienpopulation.....	53
3.4.3	Kinetik der ehemals-infizierten Erythrozyten.....	59
3.5	Mögliche Einflussfaktoren auf Hämolyse.....	60
4	Diskussion.....	62
4.1	Schlussfolgerung.....	70
5	Literaturverzeichnis	71
	Eidesstattliche Versicherung	80
	Lebenslauf	81
	Veröffentlichungen.....	83
	Danksagung	84

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Entwicklungszyklus der Plasmodien	8
Abbildung 1-2: Verteilung der Malaria weltweit 2018.....	12
Abbildung 1-3: Beziehung von Alter und Schwere der Malariaausprägung in einem Malariaendemiegebiet mit moderater Transmission	15
Abbildung 1-4: Hämoglobinverläufe nach Artemisinintherapie	21
Abbildung 1-5: Beispiele für Hämolyseverläufe nach unkomplizierter Malaria und ACT mit Hb- und LDH-Verläufen	22
Abbildung 2-1: Landkarte Gabun mit markierten Studienorten (x) Lambaréné und Fougamou	28
Abbildung 2-2: Temperatur und Regenfall im Monatsdurchschnitt in Gabun zwischen den Jahren 1901-2016.....	29
Abbildung 2-3: Verteilung der bestätigten Malariafälle in Gabun nach Region, 2017	29
Abbildung 2-4: Beispiel Anfertigung dicker Tropfen und Ausstrich auf Objektträger	33
Abbildung 2-5: Punktwolkendiagramm mit 100.000 Ereignissen einer beispielhaften Probe mit Vorwärts- und Seitenstreuung in der Durchflusszytometrie.....	39
Abbildung 2-6: Repräsentative Negativkontrolle einer Malaria-negativen Probe mit 0,1 % autofluoreszierendem Zellanteil.....	39
Abbildung 2-7: Eingegrenzte Zielpopulation aus Abbildung 2-6 in einem neuen Plot zur weiteren Differenzierung.....	40
Abbildung 3-1: Flussdiagramm der Studienpopulation	44
Abbildung 3-2: Mediane Hb-, LDH- und Retikulozytenwerte (IQB) der PatientInnen mit und ohne Hämolyse an T14 im Verlauf. Die gestrichelte Linie indiziert den Grenzwert für LDH bei 345 U/L, die Klammer hebt einen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen hervor.	47
Abbildung 3-3: Auftreten von Hämolyse an T14 in den unterschiedlichen Therapiegruppen in % (abs.)	49
Abbildung 3-4: Mediane Hb-, LDH- und Retikulozytenwerte (IQB) der PatientInnen je nach Therapie an T14 im Verlauf	50
Abbildung 3-5: Anämieverteilung im Verlauf in % (abs.).....	52

Abbildung 3-6: oie/pL an T3 bei PatientInnen mit und ohne Hämolyse an T14. Die gestrichelte Linie stellt den publizierten Schwellenwert als Vorhersageparameter für das Auftreten einer Hämolyse bei 0,18/pL dar.....	54
Abbildung 3-7: Korrelation zwischen Parasitämie an T0 (%) und der Anteil der oie (%) an T3.	54
Abbildung 3-8: Einzelkurven der PatientInnen >2 % Parasitämie mit Pitting Werten <2 %	56
Abbildung 3-9: Verlaufskurve der PatientInnen A-D mit Hämolyseparametern und Hämoglobinverläufen dargestellt	57
Abbildung 3-10: Durchflusszytometrie Messung zur Quantifizierung von RESA (FL1)- und PI (FL3)-positiven Zellen beispielhaft an einer Patientin mit initial hoher Parasitämie im Verlauf von T3 bis 28 (vgl. Abbildung 3-9-D)	58
Abbildung 3-11: Anteil der 60 PatientInnen mit vorhandenen Pittingwerten zu allen Zeitpunkten jeweils ober- und unterhalb der Nachweisgrenze im Verlauf	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Charakteristika der sechs humanpathogenen Plasmodien	10
Tabelle 1-2: Endemizitätsgrade der Malaria	11
Tabelle 1-3: Artemisinin-basierte Kombinationstherapien (ACT)	17
Tabelle 1-4: Definitionen von verzögerter Hämolyse nach Artemisinin-Therapie.....	24
Tabelle 2-1: Gewichtsadaptierte Dosierung Artemether-Lumefantrin	31
Tabelle 2-2: Untersuchungen an den Studienzeitpunkten	32
Tabelle 2-3: Anzahl zu zählender Gesichtsfelder nach Lamberéné Methode	34
Tabelle 2-4: Gruppenaufteilung im Hinblick auf Hämolyse	36
Tabelle 2-5: Hb-Bereiche in g/dL zur Klassifikation der Schweregrade von Anämie nach WHO.....	37
Tabelle 2-6: Emissionsspektren der Fluoreszenzen für BD Accuri® C6.....	38
Tabelle 3-1: Baseline Kenndaten der Studienpopulation	45
Tabelle 3-2: Absolute Hämoglobin-, Retikulozyten- und LDH-Werte (Median mit IQB) der Hämolyse- und Vergleichsgruppe im Verlauf	48
Tabelle 3-3: Hämoglobinverläufe der PatientInnen mit und ohne Hämolyse (Median in g/dL mit Bereich)	49
Tabelle 3-4: Absolute Hämoglobin-, Retikulozyten- und LDH-Werte (Median mit IQB) der AL- und Fospip-Population im Verlauf.....	51
Tabelle 3-5: Hämoglobinverläufe je nach Therapie	52
Tabelle 3-6: Mediane der individuellen Hämoglobinveränderungen zwischen den einzelnen Studientagen im Vergleich zwischen PatientInnen mit einer Parasitämie ≥ 2 % und < 2 %	59
Tabelle 3-7: Verläufe der oie- und Hb-Werte der PatientInnen > 2 % Parasitämie zwischen T3-14 im Median (Bereich)	59
Tabelle 3-8: Potenzielle Risikofaktoren für Hämolyse.....	61

ABKÜRZUNGEN

ACT – Artemisinin-based combination therapy	ITN – Insecticide Treated Net
AL – Artemether-Lumefantrin	LDH – Laktatdehydrogenase
BSA – Bovine Serum Albumin	M – Malaria
CERMEL – Centre de Recherches Médicales de Lambaréné	OIE – Once-infected erythrocytes (Ehemals-infizierte Erythrozyten)
CRMN – Centre de Recherches Médicales de la Ngounié	PADH – Post-artemisinin delayed hemolysis
EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure	PBS – Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
EIR – Entomologische Inokulationsrate	PCR – Polymerase Chain Reaction
FSC – Forward Scatter	<i>Pf</i> – <i>Plasmodium falciparum</i>
FOSPIP – Fosmidomycin/Piperaquin	<i>PfEIR</i> – <i>Plasmodium falciparum</i> Entomologische Inokulationsrate
G6PD – Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	ρ LDH – Plasmodium Laktatdehydrogenase
GF – Gesichtsfeld	PI – Propidium Jodid
g/dL - Gramm pro Deziliter	<i>Pm</i> – <i>Plasmodium malariae</i>
Hb – Hämoglobin	<i>Po</i> – <i>Plasmodium ovale</i>
HIV – Humanes Immundefizienz Virus	RDT – Rapid Diagnostic Test (Schnelldiagnostest)
HPF – High Power Field	RESA – ring-infected erythrocyte surface antigen
HpO – Ahaptoglobinämie	ROS – Reactive Oxygen Species
HRP-2 – Histidine-rich Protein 2	SSC – Side Scatter
IKZ - Inkubationszeit	T – Tag
IFN- γ – Interferon γ	TNF – Tumor Nekrose Faktor
IL-10 – Interleukin-10	WHO – World Health Organization
IPTp-SP – Intermittent preventive Treatment in pregnancy with Sulfadoxine-Pyrimethamine	
IRS – Indoor Residual Spraying	

ZUSAMMENFASSUNG

Jüngste Berichte deuten darauf hin, dass ein erheblicher Teil der mit Artemisininen bei schwerer Malaria behandelten PatientInnen eine verzögerte hämolytische Reaktion (Post-Artemisinin delayed hemolysis - PADH) etwa zwei bis sechs Wochen nach Behandlung erfährt, die eine durch Malaria hervorgerufene Hämolyse übersteigt [1–3]. Bisher wurden keine Todesfälle auf PADH zurückgeführt, jedoch wurde bei einem afrikanischen Kind mit PADH ein Hämoglobin (Hb)-Nadir von 2,8 g/dL berichtet [4]. Derzeit wird die PADH auf einen verzögerten Zellzerfall von ehemals-infizierten Erythrozyten (oie) zurückgeführt, deren intrazellulär gelegene Parasiten nach Artemisinin-Therapie durch den Prozess des Pittings in der Milz entfernt wurden [5]. Die unkomplizierte Malaria ist in Endemiegebieten um ein Vielfaches häufiger als die schwere Malaria. Die wenigen Studien über PADH nach oraler Artemisinin-basierter Kombinationstherapie (ACT) bei unkomplizierter Malaria beschrieben einen Rückgang der Hämatokritwerte oder Abfall des Hbs bei <10% der PatientInnen [6–8]. Bei einer sehr sensitiven Definition von Hämolyse zeigten jedoch acht von 20 PatientInnen mit importierter unkomplizierter Malaria eine Hämolyse nach oraler ACT [9]. Ziel der Arbeit ist, das Vorkommen einer verzögerten Hämolyse bei unkomplizierter Malaria nach oraler Therapie in einem Malaria-Endemiegebiet zu untersuchen [10]. Hierfür wurde eine prospektive Beobachtungsstudie am Centre de Recherches Médicales de Lambaréné und am Centre de Recherches Médicales de la Ngounié in Fougamou durchgeführt. Der primäre Endpunkt verzögerter Hämolyse wurde definiert als erniedrigter Haptoglobinwert und erhöhte Laktatdehydrogenase an T14. Die PatientInnen wurden gemäß regionaler Empfehlung mit ACTs behandelt. Zeitgleich fand am Studienort eine ein-armige Phase-2-Studie zur Testung von Fosmidomycin-Piperaquine (Fospip) als Non-ACT bei unkomplizierter Malaria statt. PatientInnen, die an dieser Studie teilnahmen, wurde ebenfalls eine Teilnahme in unserer Studie angeboten. Zwischen März 2015 und Januar 2016 wurden n=93 PatientInnen mit unkomplizierter Malaria rekrutiert, von denen 69 bezüglich des primären Endpunktes an T14 evaluierbar waren. Sechs PatientInnen (9 %) erfüllten die Kriterien einer verzögerten Hämolyse. Hb-Abfälle nach der Therapie wurden nicht beobachtet (kompensierte Hämolyse). Bei 76 % der Studien-PatientInnen bestand am Screeningtag eine mittlere bis schwere Anämie, an T14 wurde bei keinem der PatientInnen eine schwere Anämie beobachtet. Risikofaktoren wie Alter, initiale

Parasitämie, prätherapeutischer Hb-Wert und das Therapieregime (ACT vs. Fospip) zeigten keine Assoziation mit dem Auftreten einer verzögerten Hämolyse. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Parasitämie und dem Auftreten von oie nach Therapie festgestellt, jedoch nicht zwischen dem Auftreten von oie und einer Hämolyse bzw. Hb-Veränderungen. Der vorpublizierte oie-Schwellenwert als Risikofaktor für das Auftreten einer PADH (0,18/pL) [5] wurde von einer Patientin überschritten, die keine Hämolyse zeigte.

ABSTRACT

Recent reports suggest that a substantial proportion of patients treated with artemisinin drugs for severe malaria experience delayed hemolytic reactions exceeding the hemolysis attributable to malaria [1,2]. Delayed hemolysis occurs two to six weeks after antimalarial treatment [3]. So far, no deaths have been attributed to post-artemisinin delayed hemolysis (PADH), yet a nadir in hemoglobin (Hb) as low as 2.8 g/dL was reported in an African child with PADH [4]. PADH is linked to the destruction of circulating once-infected erythrocytes (oie) from which parasites have been removed by the process of “pitting” in the spleen after artemisinin treatment [5]. As the incidence of uncomplicated malaria exceeds that of severe malaria by far, our study aimed to observe the incidence of delayed hemolysis in uncomplicated malaria after oral Artemisinin-based combination therapy (ACT). Only few studies have described hemoglobin declines in patients with uncomplicated malaria after ACT. The overall incidence was under 10% [6,7,11]. With a very sensitive definition of hemolysis 40% of patients with imported malaria presented hemolysis after oral ACT in another study [9].

In our study delayed hemolysis was defined as low haptoglobin and increased lactate dehydrogenase level on day 14. During March 2015 and January 2016 n=93 patients with uncomplicated malaria were recruited in Gabon. Patients were treated with ACTs according to local recommendations. At the same time a phase-2-study for Fosmidomycin-Piperaquine (Fospip) as Non-ACT for uncomplicated malaria was conducted. Patients recruited until January 2016 were also recruited within our study.

Six of 69 patients (9 %) met the criteria of delayed hemolysis, yet none of them exhibited a decline in hemoglobin levels, indicating compensated hemolysis. In 76 % of the study-population moderate to severe anemia was observed during screening, but no severe

anemia was observed on day 14. Risk factors such as age, parasitemia, pre-treatment Hb-levels and treatment regimen (ACT vs. Fospip) did not show any significant association with the occurrence of hemolysis. A significant correlation was seen between the initial parasitemia level and occurrence of oie, but there was no significant correlation between oie-level and occurrence of delayed hemolysis or decline in Hb after treatment. The pre-published threshold of oie (0.18/pL) [5] for PADH was exceeded only by one patient, who did not present delayed hemolysis.

1 EINLEITUNG

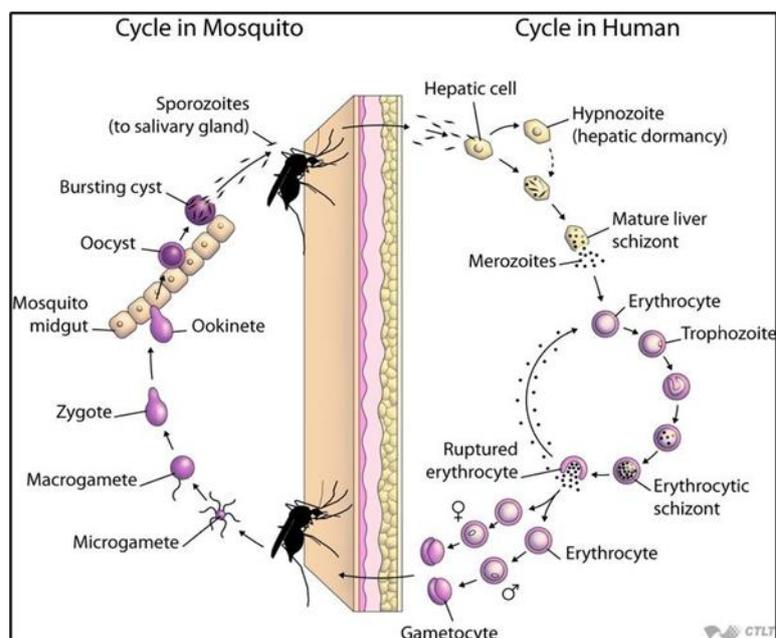
1.1 MALARIA

Die human-parasitären Erreger der Gattung *Plasmodium* verursachen weltweit hohe Morbidität und Mortalität. Zwischen 2000 und 2015 konnte eine Reduktion der Malariainzidenz um 37 % im Rahmen der WHO Millenniumsziele erreicht werden. Dennoch starben bei etwa 229 Millionen Malariainfektionen im Jahr 2019 weltweit geschätzt 409.000 PatientInnen an der Infektion. Die Malaria ist damit die bedeutsamste parasitäre Erkrankung des Menschen [12].

1.1.1 Vektor, Erreger und Lebenszyklus

Die Erreger der Malaria sind Protozoen der Gattung *Plasmodium*. Unter den bisher bekannten Plasmodien gibt es sechs Spezies, die humanpathogen sind. Der weltweit häufigste Erreger ist *P. falciparum*, der das klinische Bild Malaria tropica verursacht. *P. ovale* mit seinen zwei sympatrischen Spezies *curtisi* und *walikeri* [13] sowie *P. vivax* sind Verursacher der Malaria tertiana, *P. malariae* der Malaria quartana und *P. knowlesi* der Malaria quotidiana. Letztere ist in Südostasien ursprünglich nur bei Makaken aufgetreten, jedoch seit 1965, wenn auch selten, beim Menschen entdeckt worden [14,15].

Abbildung 1-1: Entwicklungszyklus der Plasmodien



(Quelle: 'Life cycle of the malaria parasite' from *Epidemiology of Infectious Diseases*. <http://ocw.jhsph.edu>. Copyright © Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health.) (CC BY-NC-SA).

Im Menschen beginnt die asexuelle Vermehrung zunächst mit der 1) *präerythrozytären Phase* des Erregers. Sporozoiten gelangen über die Blutbahn in Hepatozyten und entwickeln sich dort zu Gewebs-Schizonten, aus denen zum Ende der Leberphase Merozoiten hervorgehen. Diese Merozoiten, etwa 2.000-30.000 pro Gewebs-Schizont je nach Spezies, werden wieder in die Blutbahn ausgeschüttet und invadieren Erythrozyten. Sporozoiten von *P. vivax* und *ovale* können neben der unmittelbaren Umwandlung auch als sogenannte Hypnozoiten im Hepatozyten persistieren und sich erst nach Wochen bis Jahren zu Schizonten weiterentwickeln. Bei erneuter Aktivität des Zyklus nach diesem Ruhestadium spricht man von einem *Relapse*.

Mit Eindringen in die Erythrozyten beginnt die 2) *erythrozytäre Phase*, in welcher der Erreger sich vom Merozoiten zum Trophozoiten weiterentwickelt. Dieser lässt sich lichtmikroskopisch als Ring darstellen und wächst zum reifen Schizonten heran. Intraerythrozytär konsumiert der Schizont für sein Wachstum bis zu 80 % des Hb der Wirtszelle [16,17]. In einer sogenannten sauren Nahrungsvakuole wird Hb zersetzt, das für das Überleben der Plasmodien lebensnotwendig ist. Bei der Zersetzung bildet sich freies Häm, das für den Parasiten toxisch ist, weshalb er es in eine unlösliche kristalline Form umwandelt, das sogenannte Hämozoin, auch Malaria-Pigment genannt. Beim Heranreifen bildet der Schizont wieder Merozoiten aus, 8-32 je nach Spezies, die am Ende der Reifung durch Ruptur des Erythrozyten freigesetzt werden. Durch die exponentielle Ausbildung der Merozoiten und deren Freisetzung kommt es zu den malarientypischen Fieberschüben. Der Zyklus der Blutschizogonie von *P. falciparum* dauert ca. 48 Stunden und ist meist asynchron. Der Rhythmus von *P. vivax* und *ovale* dauert ebenfalls 48-50 Stunden und synchronisiert sich mit zunehmender Infektionsdauer, sodass die Fieberschübe regelmäßig jeden dritten Tag auftreten können. Daher entstand der Name *M. tertiana*. Bei *P. malariae* umfasst die Blutschizogonie 72 Stunden und typischerweise wird jeder vierte Tag von Fieber begleitet (*M. quartana*). *P. knowlesi* hat den kürzesten Zyklus mit 24 Stunden [15,18]. Die freigewordenen Merozoiten können dann wieder nicht-infizierte Erythrozyten befallen und den asexuellen Zyklus fortsetzen, oder zu männlichen und weiblichen Gametozyten heranreifen. Werden die Gametozyten wieder von Mücken im Rahmen einer Blutmahlzeit aufgenommen, kann der sexuelle Kreislauf von vorne beginnen [19,20]. In der folgenden Tabelle 1-1 ist eine Übersicht der Charakteristika aller sechs humanpathogenen Plasmodien aufgelistet.

Tabelle 1-1: Charakteristika der sechs humanpathogenen Plasmodien [15, 18, 19,21]

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i> (<i>curtisi</i>/ <i>wallikeri</i>)	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
<i>Inkubationszeit (d)</i>	3-14	15	17	28	12
<i>Erythrozytärer Zyklus (h)</i>	48	ca. 48	50	72	24
<i>Ø Parasitämie /µL (max.)</i>	20.000- 500.000 (2.000.000)	20.000 (50.000)	9.000 (30.000)	6.000 (20.000)	10.000- 100.000 (k.A.)
<i>Rezidive/Relapse</i>	-	+	+	-	-

Ø Durchschnitt, k.A. keine Angabe

1.1.2 Epidemiologie

Die Verbreitung der Malaria beschränkt sich vor allem auf die tropischen und subtropischen Regionen des Globus. 2017 traten in 87 Ländern weltweit autochtone Malariainfektionen auf [22,23]. Etwa 92 % der Erkrankten betrafen die WHO-Region Afrika, 5 % Süd-Ost-Asien, 2 % die Region östlicher Mittelmeerraum, 0,9 % die Region West-Pazifik und 0,1 % die Region der Amerikanischen Länder [23].

Als Indikator für den Ausbreitungsgrad der Malaria dient die Endemizität. Häufig unterscheidet man Regionen stabiler und instabiler Übertragungsraten. In Regionen mit instabiler Malaria-Transmission kommt es zu starken saisonalen Unterschieden und teilweise zum Auftreten von epidemischen Ausbrüchen. Bei stabiler Malaria Transmission besteht eine kontinuierlich hohe Prävalenz, die durch eine hohe Aktivität der Anophelesmücken aufrechterhalten wird. Die Quantifizierung der Stabilität erfolgt mit der sogenannten Entomologischen Inokulationsrate (EIR), welche die infizierten Stiche eines Individuums pro Jahr bemisst. In Regionen stabiler Transmission beträgt die EIR >10 [24].

In den 1950er Jahren erstellte die WHO eine Klassifikation basierend auf dem Anteil der Kinder im Alter zwischen zwei und neun Jahren mit tastbar vergrößerter Milz. Da in Gebieten mit sehr hoher Prävalenz bereits im jungen Kindesalter die Parasitenrate durch Semiimmunität zurückgehen kann, wird in sog. holoendemischen Gebieten der Anteil betroffener Säuglinge verwendet. Später wurde dieses Maß durch die Prävalenz einer mikroskopisch nachweisbaren Parasitämie ersetzt (Tabelle 1-2) [19,25,26].

Tabelle 1-2: Endemizitätsgrade der Malaria

Malariaendemizität	Splenomegalie/ nachweisbare Parasitämie (%)[□]	Bedeutung
Hypoendemisch	0-10	Geringe Übertragung
Mesoendemisch	11-50	Variable geografische Zonen mit unterschiedlichem Übertragungsrisiko
Hyperendemische	51-75	Intensive Übertragung, saisonal
Holoendemisch	>75 ^{□□}	Intensive Übertragung, ganzjährig

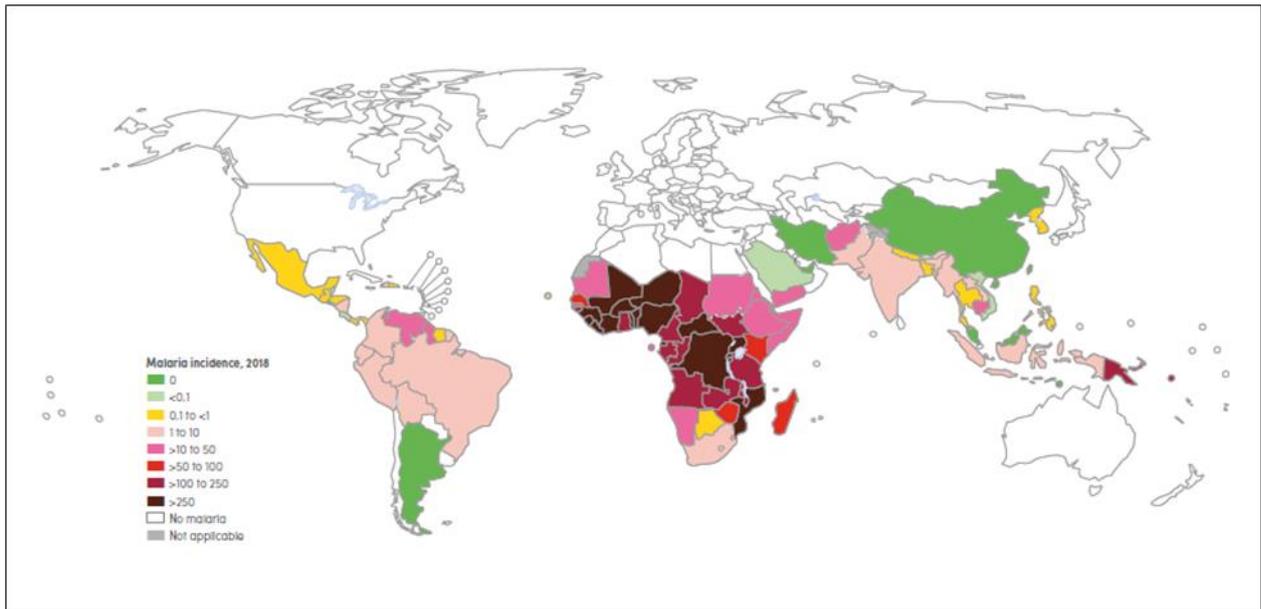
[□]Anteil der 2-9 Jährigen, ^{□□} Anteil betroffener Säuglinge (<1 Jahr)

Laut „World Malaria Report 2020“ [12] stieg die Anzahl an Malariafällen weltweit von 211 Millionen (2015) auf ca. 229 Millionen (2019) an, wovon 94 % zur WHO Region Afrika zählten. Die Inzidenzraten weltweit lagen 2019 bei 57 Fällen pro 1.000 einer Risikopopulation. Die WHO Region Afrika wies mit 225 Fällen pro 1.000 im Jahr 2019 die höchste Rate weltweit auf, mit leicht stagnierender Tendenz. Die absolute Mortalität weltweit sank von 607.000 im Jahr 2010 auf 409.000 im Jahr 2019. Die Mortalitätsrate in Afrika sank zwischen den Jahren 2010 und 2015 von 12,5 auf 5,4 pro 10.000 [27]. Dennoch sind weiterhin vor allem Kinder unter fünf Jahren schwer betroffen. Allein im Jahr 2018 verstarben weltweit 272.000 Kinder vor ihrem fünften Lebensjahr an Malaria und hatten damit einen Anteil von 67 % an der Gesamtmortalität [28].

1.1.2.1 Verteilung Erreger

Die Anophelesmücke, die den Plasmodien als Vektor dient, hält sich in Äquatornähe unter 2.500 m und anderorts <1.500-1.800 m Höhe sowie innerhalb eines Temperatur-optimums von 26-29 °C auf [29]. Der Anteil der *M. tropica* mit *P. falciparum* unter den Malariainfektionen liegt weltweit bei 70-85 %, wobei die Verteilung vor allem in Afrika (90 %), dann in Asien und Ozeanien (45 %) und schließlich Lateinamerika (5 %) zu verzeichnen ist. *P. vivax* ist geografisch am weitesten verbreitet, tritt jedoch vor allem in Lateinamerika und Südostasien auf. Dies ist auf eine genetische Ausprägung in der afrikanischen Bevölkerung zurückzuführen, die zu ca. 90 % Duffy-negativ ist. Das Duffy-Antigen dient *P. vivax* und *knowlesi* als Rezeptor für die Invasion von Erythrozyten. *P. ovale* und *malariae* sind vor allem prävalent in Afrika, sporadisch auch in Südostasien [20]. Die weltweite Verteilung im Jahr 2018 ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Abbildung 1-2: Verteilung der Malaria weltweit 2018



(Quelle: WHO. World malaria report 2019, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>; 2019) (CC BY-NC-SA 3.0 IGO).

1.1.3 Klinische Eigenschaften der Malaria

Das klinische Bild der Malaria verläuft in einem Kontinuum. Nach der Infektion kommt es zunächst zu einer asymptomatischen Parasitämie. Es folgt die unkomplizierte Malaria, die unbehandelt in eine schwere Malaria übergehen und schließlich zum Tod führen kann. Faktoren, die den Schweregrad einer Malaria beeinflussen, sind unter anderem die Plasmodien-Spezies, das Alter der Infizierten und die erworbene „Semi-Immunität“, genetische Voraussetzungen wie das Duffy-Antigen, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Mangel, Sichelzellanämie oder Thalassämie, der Ernährungsstatus und der Zeitpunkt sowie die Wirksamkeit der Therapie [19]. Das häufigste klinische Symptom ist Fieber. Jedoch sind allgemeine unspezifische Symptome besonders in endemischen Regionen gängig und die Absenz von Fieber schließt die Malaria nicht aus [30].

1.1.3.1 Unkomplizierte Malaria

Bei unkomplizierter Malaria liegt eine Parasitämie <10 % ohne Organbeteiligung vor. Die meisten PatientInnen mit unkomplizierter Malaria weisen neben Fieber weitere unspezifische Symptome auf. Hierzu zählen unter anderem Kopfschmerzen, Fatigue, Unwohlsein und muskuloskelettale Schmerzen. Vor allem in endemischen Regionen bei stabiler Transmission sind Anämie, Splenomegalie, Hepatomegalie bei jungen Kindern und leichter Ikterus eher bei Erwachsenen apparent [31]. Eine unkomplizierte

Hyperparasitämie liegt ab einer Parasitämie von $\geq 4\%$ ohne klinische Kriterien einer schweren Malaria vor [24].

1.1.3.2 Schwere Malaria

Definition der schweren Malaria durch *P. falciparum* laut WHO durch folgende Kriterien [32]:

- Hyperparasitämie $>10\%$ (ca. 500.000/ μL) ohne weitere vitale Organbeeinträchtigungen
- Organbeeinträchtigungen ohne alternative Ursachen als die der Malaria
 - Bewusstseinsstörung (GCS <11 , Blantyre-Koma-Skala <3)
 - Erschöpfung mit Unfähigkeit des Stehens oder Sitzens
 - >2 Krampfanfälle innerhalb 24 h
 - Schwere Azidose (Basendefizit >8 mEq/L, HCO_3^- <15 mmol/L, ≥ 5 mmol/L Plasmalaktat)
 - Schwere Hypoglykämie (Blutglukose <40 mg/dL)
 - Schwere Anämie (Hb ≤ 5 g/dL bei Kindern <12 J., <7 g/dL bei Erwachsenen) bei einer Parasitämie $>10.000/\mu\text{L}$
 - Nierenversagen (Kreatinin >265 $\mu\text{mol/L}$ oder Harnstoff im Blut >20 mmol/L)
 - Ikterus (Bilirubin >3 mg/dL mit Parasitämie $>100.000/\mu\text{L}$)
 - Lungenödem
 - Blutungsneigung
 - Schock

Besonders bei Infektionen mit *P. falciparum* kann es zu einem exponentiellen Wachstum der Erreger, der Induktion von inflammatorischen Prozessen des Wirtes und der Obstruktion der Mikrovaskularisation kommen [33]. Die Obstruktion beruht auf dem Mechanismus der „Sequestrierung“. Hierbei entkommt der Parasit dem Abbau in der Milz durch Zytoadhärenz der infizierten Erythrozyten am Gefäßwandendothel. Folglich kommt es zur verminderten Gewebsdurchblutung einzelner Organe und entzündliche Aktivierungsprozesse werden vorangetrieben. Der obstruktive Prozess wird durch die Bildung von Rosetten verstärkt, die durch das Verklumpen von infizierten mit nicht-infizierten Erythrozyten oder Thrombozyten entstehen [34,35]. Die komplizierte Malaria mit ihren Folgen bis hin zum Tod betrifft vor allem junge Kinder in endemischen Gebieten.

Neben einer Reihe verschiedener Komplikationen treten vor allem drei häufiger allein oder kombiniert auf:

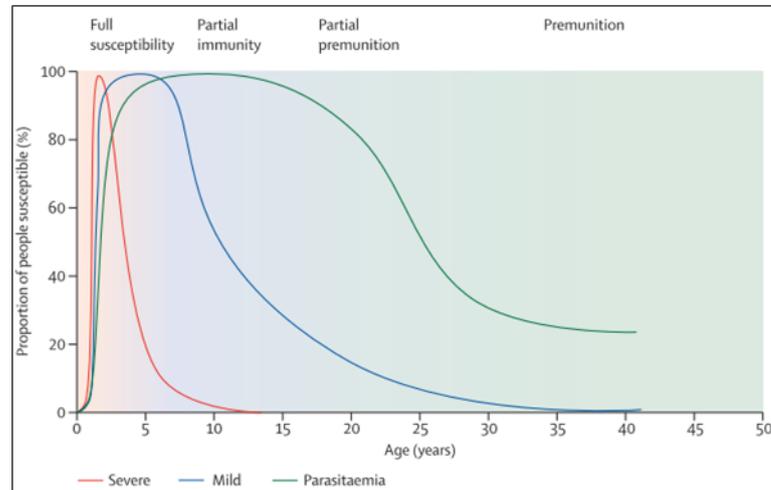
- Schwere Anämie
- zerebrale Malaria
- metabolische Azidose

In Gebieten mit niedrigeren Transmissionsraten äußert sich das klinische Bild der schweren Malaria am häufigsten mit Hyperparasitämie, Lungenödem oder Nierenversagen [36].

1.1.4 Erworbene Semi-Immunität

In Malaria Endemiegebieten erwerben die EinwohnerInnen eine sogenannte Semi-Immunität gegenüber einer Malaria. Nach einer Vielzahl von durchgemachten Infektionen kommt es zu verminderten Symptomen bis hin zu asymptomatischen Verläufen [20]. Je geringer die Transmissionsrate der Region ist, desto größer sind die Intervalle aufeinanderfolgender Reinfektionen und somit wird die Immunität geringfügiger aufrechterhalten. Es gibt Hinweise, dass bereits eine Infektion in hyperendemischen Gebieten einen gewissen Schutz gegen schwere Symptome bietet (schwere nicht-zerebrale Malaria), in Gebieten geringerer Transmissionsrate müssten hingegen mindestens drei Infektionen für die Ausbildung eines solchen Immunschutzes durchlebt werden [37]. Das Risiko, an einer schweren Malaria zu erkranken, sinkt in Hochendemiegebieten durchschnittlich im Alter von 5-10 Jahren. Säuglinge bis zum Alter von ca. sechs Monaten haben in diesen Gebieten über maternale Antikörper einen Nestschutz, sodass auch diese weniger von schwerer Malaria betroffen sind [25]. Bei andauernder Exposition entwickelt das Immunsystem einen Schutz gegen die klinische Ausbildung der Krankheit und zuletzt sogar gegen eine mikroskopisch detektierbare Parasitämie. Dieser Schutz bietet jedoch keine sterile bzw. absolute Immunität und verfällt bei Ausbleiben kontinuierlicher Exposition nach spätestens 14 Jahren [38]. In Abbildung 1-3 wird der Verlauf der Immunitätsentwicklung schematisch dargestellt.

Abbildung 1-3: Beziehung von Alter und Schwere der Malariaausprägung in einem Malariaendemiegebiet mit moderater Transmission. Bei konstanter Exposition von Malaria sinkt die Ausprägungsintensität der Klinik mit dem Alter. Zunächst sinkt die Anfälligkeit für eine schwere Malaria, dann auch für eine leichte Malaria sowie zuletzt das Auftreten einer mikroskopisch nachweisbaren Parasitämie.



(Quelle: White, N. J. et al. Malaria. *Lancet Lond. Engl.* **383**, 723–735; 2014 © Elsevier)

1.1.5 Diagnostik

Für die Diagnostik stehen das klinische Bild und das Blutbild, der Antigennachweis durch Schnelltests, der mikroskopische Erregernachweis, sowie molekularbiologische Nachweisverfahren wie die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction - PCR) zur Verfügung. Für die klinische Diagnostik wird zunächst auf das Leitsymptom Fieber geachtet. Laborchemisch treten häufig Thrombozytopenie, sowie erhöhtes indirektes Bilirubin und eine erhöhte LDH als Hämolysewerte auf. Diese sind für die Diagnosestellung jedoch nicht obligat. Beim Antigennachweis gibt es je nach Hersteller verschiedene Antigene, welche diagnostiziert werden. Spezifisch bei *P. falciparum* ist die Identifizierung von Histidine-rich protein 2 (HRP-2). Alle humanpathogenen *Plasmodien* weisen außerdem eine *Plasmodien* spezifische Laktatdehydrogenase (*pLDH*) auf [30]. Da jedoch bei den Schnelltests auch falsch positive Ergebnisse (z.B. bei gleichzeitig positivem Rheumafaktor) oder auch falsch negative Ergebnisse (z.B. durch *PfHRP2*-negative *P.f.*) [39] auftreten können, ist der mikroskopische Parasitennachweis Goldstandard. Zum mikroskopischen Nachweis dient der dicke Tropfen zur Bestimmung der absoluten Parasitämie. Hierbei wird Vollblut ohne Fixierung auf einem Objektträger aufgetragen, getrocknet, und mit Giemsa-Lösung angefärbt. Im Anschluss kann mit einem Mikroskop die Malaria diagnostiziert werden. Im Blut-Ausstrich können die verschiedenen *Plasmodien* Spezies besser differenziert werden.

1.1.6 Therapie

Die wichtigsten Antimalaria-Medikamente können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: Quininderivate, Folsäureantagonisten und Artemisinininderivate.

Das Ursprungspräparat **Quinin** ist einer der ältesten Anti-Malaria Wirkstoffe und blieb bis in die 1920er Jahre das Mittel der Wahl, bis synthetische Derivate weiterentwickelt wurden und alternativ auf den Markt kamen. Bei der Therapie der schweren Malaria spielt Quinin bis heute eine Rolle. Während der Schwangerschaft kommt es vor allem im ersten Trimester zum Einsatz [24]. **Chloroquin** (CQ) [40], ein 4-Aminoquinolin, bewährte sich mit seiner hohen Wirksamkeit, niedrigen Kosten und mäßigen Nebenwirkungen als hervorragendes Nachfolgepräparat. Durch die alkalische Eigenschaft sammelt sich das Chloroquin in der sauren Nahrungsvakuole des Parasiten und bindet freies Häm, sodass die Kristallisation von Hämozoin, einem notwendigen Schritt im Stoffwechsel des Parasiten, unterbunden wird. Bereits nach 15 Jahren breiter Anwendung entwickelten sich jedoch Resistenzen bei *P. falciparum* Stämmen. Chloroquin wird folglich nur noch zur Prophylaxe und Therapie in wenigen Gebieten ohne bestehender Resistenz und zur Therapie von Non-*falciparum* Spezies verwendet.

Die einzigen Präparate gegen die hepatischen Hypnozoiten des *P. vivax* bzw. *P. ovale* sind die 8-Aminoquinoline **Primaquin** und sein Derivat **Tafenoquin**. Sie verhindern zudem die Gametozyten Ausbildung aller weiteren Plasmodien-Arten. Vor längerer Einnahme sollte ein G6PDH-Mangel ausgeschlossen werden, da beide Medikamente hier zu Hämolyse oder einer Methämoglobinämie führen können.

Weitere Vertreter, die auch gegen viele Chloroquin-resistente Stämme wirken sind u.a. **Amodiaquin** und **Piperaquin**. Der Wirkmechanismus beider Medikamente ist dem des Chloroquin ähnlich. Der letzte Vertreter der Wirkstoffgruppe, **Mefloquin** (Lariam®), wurde Mitte der 1980er Jahre im Zuge von Resistenzen durch die Armee der Vereinigten Staaten entwickelt. Jedoch traten häufiger Nebenwirkungen psycho-vegetativer Art wie Depressionen, epileptische Anfälle und psychotische Symptome auf. Mefloquin wird als Alternative bei der Prophylaxe und der Behandlung unkomplizierter multiresistenter Malaria genutzt [40–42].

Folsäureantagonisten hemmen die Dihydrofolat Reduktase (DHFR) des Parasiten, sodass keine Tetrahydrofolsäure entstehen kann, die unter anderem für die Synthese von Aminosäuren und der DNA Replikation der Plasmodien benötigt wird [43]. **Proguanil**

ist ein Folsäureantagonist und ist durch geringe Toxizität gut verträglich. Es verhindert die Reifung von Trophozoiten und Gametozyten [19]. In der Kombination mit **Atovaquon**, welches den mitochondrialen Elektronentransport im Cytochrom-b1-Komplex der Protozoen-Mitochondrien-Membran hemmt, haben beide Medikamente einen synergistischen Effekt und werden auf dem Markt unter dem Handelsnamen Malarone® verkauft [44]. Sulfadoxin und Pyrimethamin werden ebenfalls als Kombinationspräparat eingesetzt und von der WHO zur intermittierenden Präventivbehandlung (IPTp-SP) während der Schwangerschaft [45,46] sowie in Kombination mit Amodiaquin als saisonale Malaria Chemoprävention für Kinder in Endemiegebieten Afrikas empfohlen [47].

Anfang der 1970er Jahre wurde aus der chinesischen *Artemisia annua* das Artemisinin extrahiert. Artemisinin dient als Grundlage für zahlreiche Derivate. Die Parasiten werden sehr effektiv in frühen Trophozoiten-/Ringstadien angegriffen. Artemisinine sind wirksam gegen multiresistente Erreger und haben eine gute Verträglichkeit. Die Wirkstoffe haben eine kurze Halbwertszeit, sodass sie in Form von Kombinationspräparaten, den ACT, verwendet werden:

Tabelle 1-3: Artemisinin-basierte Kombinationstherapien (ACT) [24]

Artemether-Lumefantrin
Artesunat-Amodiaquin
Artesunat-Mefloquin
Dihydroartemisinin-Piperaquin
Artesunat-Sulfadoxin-Pyrimethamin
Artesunat-Pyronaridin

Seitdem gezeigt wurde, dass Artemisinine im Vergleich zu Quinin die Mortalitätsraten von schwerer Malaria signifikant senken, werden sie von der WHO als primäre Standardtherapie bei schwerer Malaria empfohlen [24,48,49]. Auch bei Reiserückkehrern wird dieses Therapieregime angewandt [24]. Für die unkomplizierte Malaria ist die ACT ebenfalls die Standardtherapie in allen Endemiegebieten.

Bei abnehmender Artemisinin-Suzeptibilität in einigen Endemiegebieten besteht der dringende Bedarf von neuen Non-ACT Wirkstoffen. Hier scheint unter anderem Fosmidomycin effiziente Clearanceraten als Kombinationspräparat mit Piperaquin bei unkomplizierter Malaria nachzuweisen. Es hemmt die D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase [50].

Das *therapeutische Vorgehen* ist von mehreren Faktoren abhängig. Ausschlaggebend sind die Plasmodienart, die Schwere des klinischen Verlaufs, mögliche Resistenzen gegen pharmakologische Wirkstoffgruppen sowie Vorerkrankungen der PatientInnen.

Bei der Malaria tropica erfolgt zunächst eine Einschätzung, ob es sich bei der klinischen Manifestation um einen schweren oder unkomplizierten Verlauf handelt. Bei einem unkomplizierten Verlauf kann die ACT von Anfang an oral verabreicht werden und die Behandlung in Endemiegebieten erfolgt in der Regel ambulant. Bei Nicht-Immunen wird jedoch eine stationäre Behandlung empfohlen. Sind die Kriterien einer schweren Malaria erfüllt, empfiehlt die WHO eine umgehende intravenöse oder intramuskuläre Artemisinintherapie für mindestens 24 Stunden. Sobald möglich wird die Medikation dann auf eine orale ACT umgestellt und für drei Tage fortgesetzt.

Bei der Malaria tertiana empfiehlt die WHO eine sogenannte radikale Therapie, welche die erythrozytäre und hypnozoite Phase umfasst. Die Therapie der Blutphase erfolgt entweder mit oraler ACT-Gabe oder Chloroquin. Die hepatischen Hypnozoiten werden zur Verhinderung von *Relapses* mit Primaquin oder Tafenoquin behandelt.

Schließlich umfasst die vollständige Behandlung die *supportive Therapie*. Vor allem bei der schweren Malaria ist die Hospitalisierung und Überwachung auf der Intensivstation notwendig um schnellstmöglich Komplikationen behandeln zu können.

1.2 ANÄMIE

Anämie ist ein weltweites öffentliches Gesundheitsproblem. Vor allem in Entwicklungsländern ist sie durch schlechte Hygienestandards, die Inflammationsprozesse begünstigen, Mangelernährung und parasitäre Infektionen bedingt [51,52]. Die Prävalenz von Anämie (Hb <11 g/dL) in elf französisch-sprachigen afrikanischen Ländern lag bei 72,4 % der Kinder zwischen 6-59 Monaten [53]. Auch die hohe Prävalenz von Sichelzellanämie (21,1 %) [54] und G6PDH-Mangel (13 %) [55] trägt zur multifaktoriellen Genese der Anämie in Sub-Sahara Afrika bei. Im Kontext einer *Plasmodien*-Infektion wurde im Tschad bei allen untersuchten Schwangeren und bei 54 % der Kinder eine Anämie festgestellt [56].

1.2.1 Malaria assoziierte Anämie

Die Genese der Malaria assoziierten Anämie ist multifaktoriell:

1) Hämolyse von infizierten Erythrozyten, 2) Hämolyse von nicht-infizierten Erythrozyten [57,58], 3) erhöhte Aktivität der Milz und 4) Beeinträchtigung der Erythropoese [59,60].

Etwa 48 Stunden nach Fieberbeginn findet eine vermehrte Zerstörung der Erythrozyten statt, die sich mit einem initialen Hämatokritabfall bemerkbar macht. Die Zerstörung lässt sich auf die Ruptur der infizierten Erythrozyten zurückführen, da die Membran an Flexibilität verliert und die Erythrozyten somit anfälliger für Verletzungen in der Blutzirkulation werden. Die Schwere der Destruktion korreliert dabei mit der Parasitämie (ad 1) [61]. Darüber hinaus kommt es durch Ausbildung von Antikörpern gegen die Erythrozytenoberfläche und durch Veränderungen der Erythrozytenmembran zur Hämolyse nicht-infizierter Erythrozyten. Zudem erfolgt die Phagozytose von befallenen sowie nicht befallenen Erythrozyten, die durch Hyperaktivität des Retikuloendothelialen Systems und der Makrophagen verursacht wird (ad 2). Vor allem in Endemiegebieten finden rekurrente und chronische Infektionen statt, die dann zur Splenomegalie führen [62]. Infolgedessen entwickelt sich ein Hypersplenismus, der auch bei klinisch gesunden Einwohnern in Malaria-Endemiegebieten zu chronischer Anämie beitragen kann (ad 3). Begleitinfektionen viraler oder bakterieller Natur und medikamentenabhängige Anämien scheinen zusätzlich Einfluss auf Malaria-assoziierte Anämien zu haben. Fälle von Schwarzwasserfieber wurden beschrieben, die durch die Medikamentengabe von Quinin, Mefloquin oder auch Halofantrin ausgelöst wurden. Die genannten Medikamente scheinen in der Kombination mit einem RBC Protein als Antigen zu fungieren, und durch Immunreaktionen schwere intravasale Hämolysen sowie eine Hämoglobinurie zu bedingen (ad 4) [63].

1.3 VERZÖGERTE HÄMOLYSE NACH THERAPIE

Das Auftreten einer verzögerten Hämolyse nach Therapie wurde bei etwas mehr als 20 % der PatientInnen nach Therapie mit Artesunat bei schwerer Malaria beschrieben [5,64]. In den Jahren 2006 – 2010 beobachtete man erste Fälle von verzögerter Hämolyse nach Therapie bei europäischen Reiserückkehrern. Sechs von 25 (24%) PatientInnen fielen posttherapeutisch mit selbstlimitierender Hämolyse auf, die nach Therapieabschluss über vier Wochen lang anhielt oder zwischen T14-31 auftrat. Fünf dieser sechs PatientInnen bedurften einer Transfusion. Da sich diese mehr als eine Woche nach Beginn der Malariasymptomatik und nach kompletter Beseitigung der Parasiten entwickelten, war der Verlust nicht allein durch die Destruktion von infizierten Erythrozyten zu erklären. Eine

Form von klassischer Medikamenten-abhängiger Autoimmun-Hämolyse war aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Artesunat unwahrscheinlich. Außerdem fielen spezifische Antikörpertests der behandelten PatientInnen negativ aus [64]. Jedoch gab es ein Fallbeispiel, bei dem der direkte Coombs Test positiv ausfiel und die Behandlung mit Kortikosteroiden zu einer Verbesserung der Klinik führte [1].

Eine Hypothese zum Pathomechanismus der verzögerten Hämolyse, die breite Akzeptanz erreicht hat, ist das Phänomen des „Pitting“. Hierbei entfernt die Milz intra-erythrozytäre Parasiten ohne dabei die Wirtszelle zu zerstören und die sogenannten oie werden danach wieder in die Peripherie freigesetzt [65]. Wenn Erythrozyten von *Plasmodien* befallen sind, fallen sie durch ein vergrößertes Volumen und eine starrere Wandstruktur auf und werden dadurch von der Milz detektiert. Die Veränderungen gehen mit dem Reifeprozess der Parasiten einher. Je reifer der Parasit, desto größer die Veränderung und Rigidität der Zellmembran. Die Therapie mit Quinin greift eher reifere Plasmodien-Stadien an, sodass ein direkter Zellzerfall bei Therapie wahrscheinlich ist. Artesunat-Derivate greifen als bislang einzige Wirkstoffklasse auch jüngere Ringstadien an, bei denen die Rigidität der Erythrozytenmembran noch nicht wesentlich erhöht ist [66]. Nachdem die abgetöteten jungen Ringstadien durch den Prozess des Pitting entfernt wurden, können oie nach Artemisinin-Therapie weiter zirkulieren [67]. Charakteristischerweise exprimieren sie spezifische Oberflächenproteine wie z.B. „ring-infected erythrocyte surface antigen“ (RESA) und „*P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1“ (PfEMP-1), die noch als Residuen des Parasiten an der Zelle verbleiben [68,69]. Durch die Veränderungen der Membran haben die oie eine verkürzte Lebenszeit, die im Median mit 7,6 Tagen berechnet wurde [70]. Bisher wurden folgende Risikofaktoren für das Auftreten einer verzögerten Hämolyse beschrieben:

Die Anzahl der oie nach Therapie schien bestimmend für das Auftreten einer verzögerten Hämolyse bei schwerer Malaria von Reiserückkehrern zu sein [5]. Hier wurde ein Schwellenwert von 0,18 oie/pL beschrieben, der bei Überschreiten der Anzahl mit einer Sensitivität von 89 % und einer Spezifität von 83 % das Auftreten einer Hämolyse (>10 % Hb-Abfall oder >10 % LDH-Anstieg nach T7) vorhersagen soll. Jedoch wurden bei unkomplizierter hoch-parasitärer Malaria (>100.000/μL) bei Semi-Immunen weniger Pitting und weniger klinisch relevante Hämolysen beobachtet [7]. Außerdem scheint ein jüngeres Alter mit dem Auftreten einer Hämolyse in Endemiegebieten zu korrelieren [3,4]. Weiterhin wurden bei Kindern zwischen 2-4 Jahren in Malaria-Endemiegebieten

verspätete Parasiten Clearance- und gleichzeitig höhere Pitting-Raten beobachtet als bei Kindern zwischen 5-8 Jahren. Bei jüngeren Kindern in Endemiegebieten scheint Pitting als Hauptmechanismus bei der Beseitigung der Parasiten zu dienen, wohingegen bei älteren Kindern/Semi-Immunen die Parasiten durch schnellere immunologische Mechanismen eliminiert werden [71]. Eine hohe Parasitendichte bei sowohl schwerer als auch unkomplizierter Malaria korrelierte mit dem Auftreten von Hämolyse [4,72]. Höhere Parasitämien korrelierten auch mit höheren Hb-Verlusten während der Therapie und im Verlauf [6]. Der Hb-Wert prätherapeutisch korrelierte mit einem Hb-Verlust nach Therapie bei unkomplizierter Malaria. PatientInnen, die sich vor Therapie mit Anämie vorstellten, hatten einen geringeren Hb-Verlust, sowie eine schnellere Kompensationsrate des Hb-Wertes pro Tag als PatientInnen mit normwertigem Hb-prätherapeutisch [6]. Bisher wurde PADH vor allem nach intravenöser Artemisinin-Therapie beobachtet, in Einzelfällen jedoch auch nach intrarektaler, intramuskulärer und oraler Medikation. Es gab die Annahme, dass die klinischen Symptome auf die Produkte eines spezifischen Herstellers zurückzuführen wären. Der Verdacht fiel auf die chinesische Firma Guilin Pharma, wurde jedoch revidiert, nachdem auch bei Produkten anderer Hersteller Fälle von PADH beschrieben wurden [3]. Die unterschiedlichen Hb-Verläufe nach Artemisinintherapie sind schematisch in Abbildung 1-4 dargestellt.

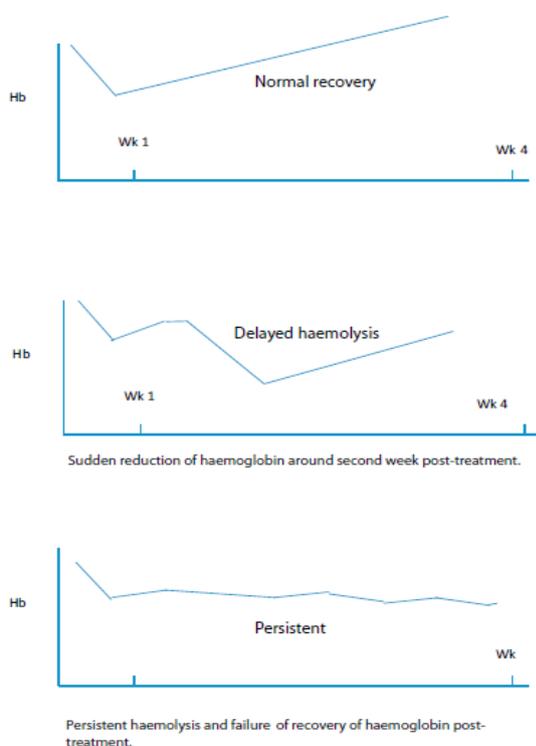


Abbildung 1-4: Hämoglobinverläufe nach Artemisinintherapie. Die Beschreibung der Bilder erfolgt von oben nach unten:

Ansteigender Verlauf:

Nadir des Hb vor T8, anschließend normalisieren sich die Hämolysemarker und verbleiben stabil.

Verzögerte Hämolyse nach Therapie:

Erneuter Abfall des Hb zwischen T8-28.

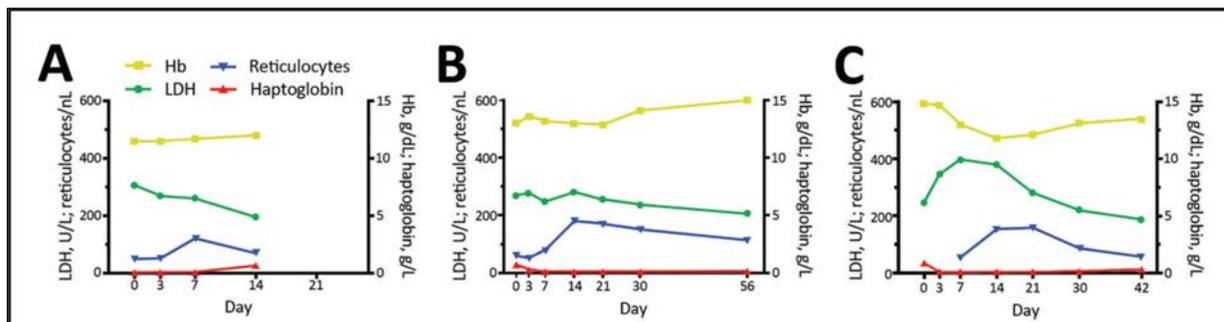
Anhaltender Verlauf:

Anhaltende Anämie vor und nach T8

(Quelle: Rehman, K., Lötsch, F., Kreamsner, P. G. & Ramharter, M. Haemolysis associated with the treatment of malaria with artemisinin derivatives : a systematic review of current evidence. *Int. J. Infect. Dis.* **29**, 268–273; 2014) (CC BY-NC-SA)

In einer Studie zu verzögerter Hämolyse nach oraler ACT-Gabe bei unkomplizierter Malaria wurden zwei weitere Verläufe unterschieden, kompensierte (B) und unkomensierte (C) Hämolysen (Abbildung 1-5). Die unkomensierte Hämolyse glich dem Verlauf der verzögerten Hämolyse, mit einem Hb-Verlust von $\geq 1,5$ g/dL zwischen T3-14. Bei der kompensierten Hämolyse wird der Hb-Verlust im Rahmen der Hämolyse durch verstärkte Erythropoese ausgeglichen [9].

Abbildung 1-5: Beispiele für Hämolyseverläufe nach unkomplizierter Malaria und ACT mit Hb- und LDH-Verläufen. A) Patient ohne Hämolyse B) Patient mit kompensierter Hämolyse C) Patient mit unkomensierter Hämolyse



(Quelle: Kurth, F. *et al.* Hemolysis after oral artemisinin combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1381–1386; 2016)

1.3.1 Diagnostik

Oie kann man durch das Anfärben von Oberflächenproteinen quantifizieren. Für die Immunfluoreszenz werden Blutausrichte angefertigt, mit Methanol fixiert, luftgetrocknet und schließlich mit Anti-RESA Maus Antikörper und Propidium Jodid (PI) inkubiert. Durch den RESA Antikörper stellt man fest, ob ein Plasmodium Erreger in den Erythrozyten eingedrungen und in der Zellwand Bestandteile hinterlassen hat. Mithilfe des Propidium Jodids lässt sich DNA anfärben [73], sodass bei bestehenden intrazellulären Erregern eine Anfärbung sowohl von RESA als auch PI besteht. Bei der Diagnostik können so infizierte Erythrozyten von oie differenziert werden. Nach der Inkubation lassen sich die oie entweder als Ausrichte mit einem Immunfluoreszenz Mikroskop ablesen oder mittels Durchflusszytometrie quantifizieren. Neben den spezifischen „Pitting“-Parametern werden Hb-Verläufe und Hämolyseparameter bewertet. Hier finden sich verschiedene Definitionen in der vorbeschriebenen Literatur. Positive Hämolyseparameter wurden mit erniedrigtem Haptoglobin ($< 0,3$ mg/dL oder $< 0,1$ g/L) und gleichzeitig erhöhter LDH (> 350 U/L oder > 390 U/L) definiert. Hb-Abfälle von > 10 % mehr als sieben Tage nach Behandlung oder jegliche Abfälle zwischen T7-14 mit oder ohne positiven

Hämolysemarkern wurden bisher als PADH nach intravenöser Therapie definiert [4,5,74]. In jüngeren Studien bei unkomplizierter Malaria nach oraler Therapie wurden vor allem Hb-Veränderungen, Auftreten von Anämie oder ≥ 10 % Reduzierung des Hb-Wertes zwischen T7-42 betrachtet [6,7]. Zusammenfassend sind die Definitionen von verzögerter Hämolyse nach Artemisinin-Therapie in Tabelle 1-4 aufgelistet.

Haptoglobin ist ein sehr sensitiver Parameter bei intravasaler Hämolyse. Es ist ein Plasmaprotein, das freies Hb bindet. Beim Anfallen von freiem Hb sinkt der Haptoglobinwert unter den Normwert und dient der Diagnosesicherung einer intravasalen Hämolyse. Haptoglobin gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine und kann bei gleichzeitig bestehender Entzündungsreaktion trotz Hämolyse erhöht bzw. normwertig sein. Daher ist die gleichzeitige Abnahme von C-reaktivem Protein (CRP) Kontrollen sinnvoll, um mögliche falsch hohe Haptoglobinwerte zu detektieren.

Die **Laktatdehydrogenase** ist ein Enzym, das ubiquitär im Körper vorkommt. Zu einem hohen Anteil befindet sie sich auch in Erythrozyten, und fällt bei Hämolyse vermehrt im Serum an. Die LDH Konzentration im Serum kann jedoch auch bei jeglichem anderen Zellzerfall erhöht sein und ist daher ein sehr unspezifischer Hämolyse-Parameter.

Tabelle 1-4: Definitionen von verzögerter Hämolyse nach Artemisinin-Therapie

komplizierte Malaria	
2011 Zoller [64]	Einteilung in <ul style="list-style-type: none"> ▪ „Recurring hemolysis“ ▪ „Persistent hemolysis“
2013 Rolling [72]	Hb-Abfall + LDH Erhöhung T7-20
2014 Jaureguiberry [5]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hämolyse: Haptoglobin <0,1 g/L +/- LDH >390 U/L ▪ PADH: >10 % Hb-Abfall oder >10% LDH Anstieg ≥T8 nach Behandlung
2015 Jaureguiberry [74]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hämolyse: Haptoglobin <0,1 g/L +/- LDH >390 U/L ▪ PADH: >10 % Hb-Abfall oder >10% LDH Anstieg >T8 nach Behandlung ▪ +/- jegliches Auftreten akuter Hämolyse >T8
2014 Rolling [4]	gleichzeitiges Vorhandensein von: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Haptoglobin <0,3 mg/dL an T14 ▪ Hb-Abfall T7-14 ▪ LDH-Anstieg T7-14 mit LDH T14 >350 U/L
2017 Gómez-Junyent [75]	Hb-Abfall + positive Hämolysemarker (nicht näher bezeichnet) T7-21 nach ACT
unkomplizierte Malaria	
2016 Kurth [9]	Haptoglobin <0,3 g/L + LDH > Normgrenze an T14 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Unkompensierte Hämolyse: Hb-Abfall ≥1,5 g/dL T3-14 ▪ Kompensierte Hämolyse: Hb-Abfall <1,5 g/dL bzw. kein Abfall
2017 Sowunmi [11]	Prävalenz von Anämie (Hkt <30 %) vor und nach Therapie
2017 Zwang [6]	Hb-Veränderungen und Anämie nach Therapie
2017 Fanello [7]	≥10 % Hb-Abfall T7-42 zu jeglichem Vorwert seit Therapie
Reviews	
2014 Rehman [3]	Hb Abfall und erniedrigtes Haptoglobin mit erhöhtem LDH >T7

1.3.2 Haptoglobin Negativität

In mehreren Publikationen wurde ein komplettes Fehlen von Haptoglobin (Ahaptoglobinämie - HpO) oder erniedrigte Werte von zirkulierendem Haptoglobin (Hypohaptoglobinämie) bei Individuen beschrieben. In der Republik Kongo wurden Schulkinder in unterschiedlich stark betroffenen Malariagebieten im Hinblick auf HpO untersucht. Hier fanden sich in Regionen niedriger entomologischer Inokulations- und Prävalenzraten von Malaria (<1 infektiöser Stich pro Person pro Jahr; <10 % Prävalenz) eine Prävalenz von 2,2-2,9 % HpO. Dagegen wurden in hochendemischen Regionen bei einer EIR von >1.000 infektiösen Stichen und 94 % Malaria Prävalenz eine HpO Prävalenz von 48 % gemessen, auch wenn die Ursache nicht bekannt war [76]. Gleichzeitig gemessene malariometrische Indizes (Parasitämie, Splenomegalie, Antikörper) bestätigten die Häufung von HpO bei erhöhter Prävalenz der Malaria [77,78]. Ein infektionsbedingter erhöhter Verbrauch von Haptoglobin und Erholung der Haptoglobinwerte in der Konvaleszenzphase legten am ehesten eine sekundäre HpO nahe [78]. Demgegenüber beschrieb eine Studie von 1966 ein gehäuftes Auftreten von HpO in afrikanischen Populationen, die genetische Faktoren als Ursache postulierten [79]. Dies wurde durch eine Fall-Kontroll Studie von 2018 in Nigeria bestätigt, die eine genetische Variante korrelierend mit Hypohaptoglobinämie identifizierte. Sie wurde als genetischer Risikofaktor für das Entstehen einer schweren Malaria-induzierten Anämie beschrieben [80].

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Verzögerte hämolytische Reaktionen nach intravenöser Artesunattherapie bei schwerer Malaria wurden in einer Vielzahl von Fällen beschrieben. In Untersuchungen bei nicht-immunen Reiserückkehrern mit schwerer Malaria entwickelten etwa 20 % der PatientInnen nach Artesunatgabe eine PADH, von denen etwa 20 % einer Transfusion bedurften [5,64,74]. Bislang wurden jedoch wenige prospektive Studien durchgeführt, in denen hämolytische Reaktionen nach oraler ACT bei unkomplizierter Malaria untersucht wurden. In einer prospektiven Studie bei Reiserückkehrern mit unkomplizierter Malaria in Berlin wurden im Zeitraum Mai 2014 bis April 2015 erstmalig bei acht von 20 PatientInnen nach oraler Therapie verzögerte Hämolysen beschrieben [9]. Unkomplizierte Malaria und orale ACT ist in Endemiegebieten um ein Vielfaches häufiger als schwere Malaria und intravenöse Therapie. Durch die hohe Inzidenz und die häufig rasch

aufeinanderfolgenden Reinfektionen würden mutmaßlich auch geringe, subklinische Hämolysen nach Therapie einen mitunter wesentlichen Beitrag zur hohen Prävalenz von chronischer Anämie in Malaria Risikopopulationen leisten. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Prävalenz von verzögerter Hämolyse nach Artemisinintherapie bei unkomplizierter Malaria im Zeitraum von 28 Tagen nach oraler Therapie in einem Endemiegebiet zu erfassen. Darüber hinaus werden potenzielle Risikofaktoren für Hämolyse nach Therapie untersucht. Ein besonderer Fokus wird hierbei auf das Auftreten und die Kinetik von oie gelegt.

2 MATERIALEN UND METHODEN

2.1 STUDIENRAHMEN

2.1.1 Studiendesign und Zielsetzung

Die „*Once-infected erythrocytes*“ (oie) Studie war eine prospektive Beobachtungsstudie, zur Rolle von oie und Hämolyse nach Therapie bei unkomplizierter Malaria in Gabun.

Der primäre Endpunkt war die Erfassung von Hämolyse zwei Wochen nach Therapiebeginn, definiert durch einen erniedrigten Haptoglobin Wert ($<0,3$ g/L) und einen LDH Wert oberhalb der Normgrenze von 345 U/L. Sekundäre Endpunkte waren die Untersuchung möglicher Risikofaktoren (Alter, initiale Parasitämie, Anzahl oie, Hb-Wert prätherapeutisch, Therapieregime) und die Analyse der Hb-Verläufe bei PatientInnen mit und ohne Hämolyse während der Behandlung und Nachsorge.

2.1.2 Studienzeitraum

Der Studienzeitraum umfasste März 2015 bis August 2017. Die Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen erfolgte zwischen Mai 2015 und Januar 2016 in Gabun, die Datenaufbereitung, -bereinigung und -analyse in Deutschland von Februar 2016 bis August 2017.

2.1.3 Studienort

Die Studie wurde im „Centre de Recherches Médicales de Lambaréné“ (CERMEL) in Lambaréné, und im „Centre de Recherches Médicales de la Ngounié“ (CRMN) in Fougamou, Gabun, durchgeführt. Die PatientInnen wurden aus den umliegenden Gebieten der Provinzen Moyen-Ogooué und Ngounié rekrutiert. In Abbildung 2-1 sind die Lokalisationen markiert. Das CERMEL befindet sich auf dem Gelände des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné. Seit 1981 findet im CERMEL Forschungsarbeit zu Tropenkrankheiten (u.a. Malaria, Tuberkulose, Helminthosen) statt, die zum heutigen Zeitpunkt durch ein klinisches, parasitologisches, immunologisches, mikrobiologisches, sowie ein Tuberkulose-spezifisches Labor unterstützt wird. Das in Fougamou ansässige CRMN ist an das lokale Krankenhaus angegliedert [81].

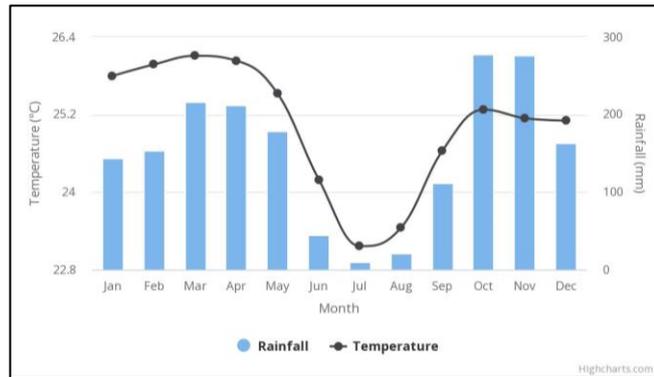
Abbildung 2-1: Landkarte Gabun mit markierten Studienorten (x) Lambaréné und Fougamou



(Quelle: in Anlehnung an "Gabon, administrative divisions – de – colored.svg"
https://wikipedia.org/wiki/Provinzen_von_Gabun) (CC BY-SA 3.0)

Gabun befindet sich in Zentralafrika an der Atlantikküste. Das Land hat eine Küstenlänge von 885 km, liegt auf Höhe des Äquators und wird durch die Länder Äquatorialguinea und Kamerun sowie im Südosten durch die Republik Kongo begrenzt. Mit einer Fläche von 267.667 km² und einer Einwohnerzahl von ca. 2.025.000 (2017) hat das Land eine Bevölkerungsdichte von 8,00 je km². Die Landschaft besteht zu 81 % aus Urwaldfläche. Das tropische Klima des Landes spiegelt sich in der Durchschnittstemperatur von 26 °C und einer durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit von 85 % wider. Im Laufe des Jahres weist das Klima einen tri-phasischen Verlauf auf, das mit einer milderen Regenzeit von Januar bis Mai, einer Trockenzeit mit verhältnismäßig kühleren Temperaturen von Juni bis August, sowie zuletzt von einer stärkeren Regenzeit mit durchschnittlichen Regenfällen von bis zu 279 mm im Monat charakterisiert wird (Abbildung 2-2) [82–84].

Abbildung 2-2: Temperatur und Regenfall im Monatsdurchschnitt in Gabun zwischen den Jahren 1901-2016

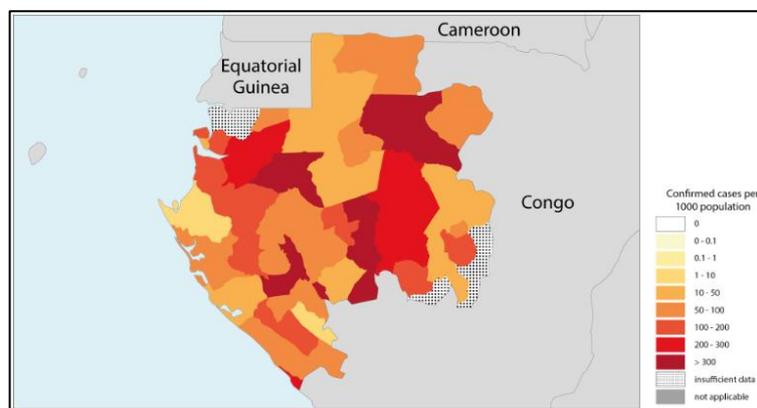


(Quelle: World Bank Climate Change Knowledge Portal. *Average monthly temperature and Rainfall in Gabon from 1901-2016*. ©World Bank. <https://climateknowledgeportal.worldbank.org/country/gabon/>) (CC BY-3.0-IGO)

2.1.4 Malaria Endemizität in Gabun

Gabun gilt als Endemiegebiet mit ganzjährigen stabilen Transmissionsraten und geringen saisonalen Schwankungen. Abbildung 2-3 zeigt, dass im Jahr 2017 in allen Regionen des Landes >1/1.000 Malariafälle gezählt wurden, in manchen Regionen >300/1.000 Fälle. Vor allem in Lambaréné und ländlicher Umgebung liegt bei EIRs von 23 bis 61 eine stabile ganzjährige Transmissionsrate vor [85]. Im Studienort Fougamou und Umgebung betrug die Infektionsprävalenz in den Jahren 2008 bis 2016 etwa 37 %, die Parasitenrate bei 2-10-Jährigen etwa 46 %. Der dominierende Anteil (79 %) der Infektionen war auf *P. falciparum* Monoinfektionen, der Rest auf Mischinfektionen mit *P. ovale* oder *malariae*, zurückzuführen [86]. Die Hauptvektoren sind die Stechmücken *Anopheles funestus* und *gambiae* [82].

Abbildung 2-3: Verteilung der bestätigten Malariafälle in Gabun nach Region, 2017



(Quelle: WHO. *Malaria - Country profiles, Gabon*. https://www.who.int/malaria/publications/countryprofiles/profile_gab_en.pdf?ua=1.) (CC BY-NC-SA 3.0 IGO)

2.2 METHODEN

2.2.1 Klinische Methoden

2.2.1.1 Screening

Zunächst erfolgte eine anamnestische Erhebung von Fiebersymptomen zum aktuellen Zeitpunkt oder in den letzten sieben Tagen in den oben beschriebenen Gebieten. Bei positiver Anamnese wurde ein Malaria-Schnelltest durchgeführt. Bei positivem Testergebnis wurde mit dickem Tropfen und Blutaussstrich die Erregerdiagnostik und Bestimmung der Parasitämie durchgeführt. Daraufhin wurden die PatientInnen hinsichtlich folgender Ein- und Ausschlusskriterien evaluiert:

Einschlusskriterien

- akute symptomatische *P.f.* Monoinfektion oder *P.f.* mit *P.m.* oder *P.o.* Mischinfektion mit einer asexuellen peripheren Parasitämie von $>50/\mu\text{L}$ Blut
 - beide Geschlechter im Alter zwischen 6 Monaten und 70 Jahren, Mindestgewicht von 5 kg
 - schriftliche unterschriebene Einverständniserklärung oder Einverständnis in Form eines Daumenabdruckes
 - Bereitwilligkeit zur Teilnahme an Folgeuntersuchungen für 28 Tage
-

Ausschlusskriterien

- Einnahme von Anti-Malaria Medikamenten innerhalb der vergangenen sechs Wochen vor Studieneinschluss
 - Einnahme von Medikamenten mit hämolytischen Nebenwirkungen in den vergangenen zwölf Wochen vor Studieneinschluss
 - aktive lymphoproliferative Erkrankungen
 - autoimmunhämolytische Anämien
 - bekannter G6PDH -Mangel, Sichelzellanämie oder andere bekannte Hämoglobinopathien
 - mechanische Herzklappen
-

Nach Studieneinschluss wurde eine orale Therapie mit Artemether-Lumefantrin (20 mg Artemether/ 120 mg Lumefantrin pro Tablette) (Coartem® Novartis, Schweiz) durchgeführt. Die Dosierungen wurden, wie in Tabelle 2-1 angegeben, gewichtsadaptiert

verabreicht. Die initiale Einnahme wurde am Studienort supervidiert. Die anschließenden Einnahmen erfolgten acht, 24, 36, 48 und 60 Stunden später.

Tabelle 2-1: Gewichtsadaptierte Dosierung Artemether-Lumefantrin

Gewicht (kg)	Anzahl der Tabletten (Einzeleinnahme/Gesamt)
>35	4/24
25-25	3/18
15-25	2/12
5-15	1/6

Im Zeitraum von März 2014 bis Juni 2016 fand am selben Studienort eine ein-armige Phase-2-Studie zur Testung von Fosmidomycin-Piperaquin als Nicht-ACT bei unkomplizierter Malaria (Fospip-Studie) statt [50]. Die Studie wurde in zwei Intervalle aufgeteilt. Das erste Intervall schloss PatientInnen ≥ 5 Jahren ein und war zum Beginn der oie-Studie bereits abgeschlossen. Im zweiten Intervall wurden Kinder im Alter von einem bis fünf Jahren rekrutiert. PatientInnen, die bis Januar 2016 an der Fospip-Studie teilnahmen, wurde gleichzeitig auch eine Teilnahme an der oie-Studie angeboten. PatientInnen der Fospip-Studie wurden mit Fosmidomycin Natrium Kapseln in einer Dosierung von 30 mg/kg (150 – 1.800 mg) einmal täglich und Piperaquin Triphosphat Tabletten in einer Dosierung von 16 mg/kg (80 – 960 mg) zweimal täglich behandelt (Allphamed PHARBIL Arzneimittel GmbH, Deutschland). Insgesamt umfasste die vollständige Therapie sechs Einnahmen mit einem Intervall von je 12 Stunden. Die StudienteilnehmerInnen wurden für die gesamte Zeit der Therapie hospitalisiert und alle Einnahmen supervidiert. Im Folgenden sind die Ein- und Ausschlusskriterien der **Fospip-Studie** aufgeführt:

Einschlusskriterien

- mikroskopisch bestätigte *P.f.* Monoinfektion (Parasitendichte 1.000 – 150.000/ μ L)
- beide Geschlechter im Alter von 1 - 5 Jahren, Körpergewicht von 5 – 25 kg
- unterschriebene Einverständniserklärung eines Erziehungsberechtigten

Ausschlusskriterien

- klinische Symptome einer schweren Malaria
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Begleitmedikation mit Einfluss auf die Leberfunktion
- Nierenschäden
- Hämoglobinwert <7,5 g/dL
- Leukozyten >12.000/ μ L
- kardiovaskuläre Vorerkrankung einschließlich Herzrhythmusstörungen mit einer QTc-Zeit Verlängerung \geq 450 ms
- vorangehende Antimalaria- oder Antibiotikatherapie in den letzten 28 Tagen

2.2.1.2 Verlaufskontrollen

An Tag 3 ± 1 , 7 ± 1 , 14 ± 2 und 28 ± 2 nach Therapiebeginn erfolgten klinische, laborchemische und parasitologische Kontrollen (Tabelle 2-2). Die Untersuchungen fanden überwiegend in den Studienzentren statt, im Falle einer Verhinderung der PatientInnen zum Studienzeitpunkt wurden sie durch ausgebildetes Gesundheitspersonal ambulant zu Hause visitiert.

Tabelle 2-2: Untersuchungen an den Studienzeitpunkten

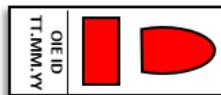
	T0	T3 \pm 1	T7 \pm 1	T14 \pm 2	T28 \pm 2
Einwilligungserklärung	x				
Demografische Daten, Körpergewicht, Größe, med. Vorgeschichte, Medikation	x				
Körperliche Untersuchung & Malaria Symptome & klinische Zeichen für Hämolyse oder Anämie	x	x	x	x	x
Vitalparameter (Blutdruck, Herzfrequenz) & Temperatur	x	x	x	x	x
Laborkontrolle (Blutbild, Biochemie) inkl. Hämolyseparameter	x	x	x	x	x
Parasitenzählung					
▪ Dicker Tropfen	x	x	x	x	x
▪ Blutausstrich	x				
Immunofluoreszenz/ oie	x	x	x	x	x
Unerwünschte Ereignisse	Stets zu beachten				
Begleitmedikation					

2.2.2 Labor Methoden

2.2.2.1 Malariadiagnostik

Die Schnelltests (Rapid Diagnostic Test – RDT) (Paracheck Device, Orchid Biomedical Systems) wurden am Ort der aufgesuchten PatientInnen durchgeführt. Blutausstriche und dicke Tropfen wurden beide auf demselben Objektträger angefertigt (Abbildung 2-4):

Abbildung 2-4: Beispiel Anfertigung dicker Tropfen und Ausstrich auf Objektträger



Als erstes Screening und für die PatientInnen der oie-Studie erfolgte die Anfärbung und Quantifizierung der Objektträger nach **Lambaréné Methode**. Nach Einschluss in die Fospip-Studie erfolgte eine weitere Anfertigung und Auszählung nach **WHO Methode**.

Nach **Lambaréné Methode** wurde für den dicken Tropfen 10 µL EDTA Vollblut in einem Bereich von 10 x 18 mm pipettiert. Ein vorgezeichnetes Blatt Papier diente als Vorlage, das unterhalb des Objektträgers gelegt wurde. Danach wurde der Objektträger in einer Wärmebank getrocknet. Es erfolgte die Anfärbung mit 20 % Giemsa-Lösung für 20 Minuten (Giemsa R-Solution, Merck, Darmstadt). Anschließend wurde die Lösung mit Wasser abgewaschen und die Objektträger luftgetrocknet. Der dicke Tropfen wurde dann in 100-facher Auflösung unter Immersionsöl am Mikroskop ausgelesen (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan oder Olympus CH 30, Tokyo, Japan). Zunächst wurde die Menge der Parasiten pro Gesichtsfeld (GF) gezählt. Bei 0 – 10 Parasiten pro GF wurden insgesamt 100 GF ausgezählt [87]. Die weitere Vorgehensweise ist in Tabelle 2-3 dargestellt.

Tabelle 2-3: Anzahl zu zählender Gesichtsfelder nach Lamberéné Methode

Parasiten/GF	>100	50-100	10-50	0-10
Zu zählende GF	20	30	50	100

(Quelle: Löhr, Sascha „Nachweisgrenzen der Mikroskopie von *Plasmodium falciparum* in einem endemischen Malariagebiet Zentralafrikas“, Dissertations Publikation Universität Tübingen, 2015)

Nach der Auszählung wurde die Parasitämie mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Parasiten}}{\mu\text{L Blut}} = \frac{n \text{ Parasiten}}{n \text{ Gesichtsfelder}} \times \text{Mikroskopierfaktor}^a$$

Die Vorbereitung des dicken Tropfens nach **WHO Methode** erfolgte wie nach Lambaréné Methode. Nur die Anfärbung wurde mit 10 % Giemsa-Lösung für 8 – 10 Minuten durchgeführt (Giemsa R-Solution, Merck, Darmstadt) und anschließend unter einer 20-30-fachen Vergrößerung am Mikroskop untersucht (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan oder Olympus CH 30, Tokyo, Japan). Zu Beginn wurde ein typisches Gesichtsfeld mit Parasiten und Leukozyten aufgesucht. Im Verlauf wurden die Objektträger mäanderförmig durchsucht und die Menge der Parasiten sowie der Leukozyten in jedem Gesichtsfeld ausgezählt. Wenn nach 200 ausgezählten Leukozyten die Anzahl der Parasiten ≥ 100 lag, war die Zählung ausreichend. Wenn nach 200 gezählten Leukozyten die Anzahl der Parasiten ≤ 99 lag, wurden weitere Gesichtsfelder untersucht, bis insgesamt 500 Leukozyten ausgezählt wurden. Die folgende Formel ermittelte die Parasitämie:

$$\frac{\text{Parasiten}}{\mu\text{L Blut}} = \frac{n \text{ Parasiten} \times 8.000 \text{ Leukozyten}/\mu\text{L}}{n \text{ Leukozyten}}$$

(Quelle: WHO, Malaria parasite counting, „Malaria microscopy standard operating procedure – MM-SOP-09“)

Für die Speziesdiagnostik erfolgte die Anfertigung eines Blutausriches. Etwa 2 μL EDTA Blut wurde auf den Objektträger pipettiert und ausgestrichen, mit Methanol ca. eine Minute fixiert und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Ausstriche mit der gleichen Färbemethode wie die des dicken Tropfens je nach WHO- oder Lambaréné Methode (s.o.) behandelt.

^a 560 oder 800, je nach Mikroskop

Die Quantifizierung und Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Leser. Eine dritte Lesung erfolgte (1) bei einem positiven und einem negativen Ergebnis, (2) wenn die Parasitendichte <300 Parasiten/μL betrug und die Differenz der zwei Lesungen >100 Parasiten/μL war, oder (3) die Parasitendichte >300/μL betrug und ein Ergebnis doppelt so groß wie das andere war. Bei zwei Auswertungen wurde das Endergebnis aus dem Mittelwert berechnet. Bei drei Auswertungen war das Endergebnis (1) negativ, wenn zwei von drei Ergebnissen negativ waren, (2) der berechnete Mittelwert, bei zwei positiven Ergebnissen, oder (3) der Mittelwert der zwei am nächsten liegenden Auswertungen, wenn drei Ergebnisse positiv waren. Das Erstellen, Färben und Auslesen der Objektträger fand entweder im CERMEL oder CRMN statt.

2.2.2.2 Blutbild und klinische Chemie

Das Blutbild wurde mithilfe des Gerätes „ABX Pentra 60®“ (HORIBA Ltd, Kyoto, Japan) gemessen. Die Retikulozytenzahl wurde manuell ausgezählt. Dafür wurden 20 μL EDTA-Vollblut mit 30 μL Billiant-Kresyl-Blau-Färbung für zehn Minuten inkubiert, anschließend ausgestrichen und innerhalb der nächsten 24 Stunden ausgezählt. Hierfür wurden in der 100-fachen Vergrößerung des Mikroskops 1.000 Erythrozyten und die gleichzeitig vorliegenden Retikulozyten gezählt. Die Auszählung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, wenn das Ergebnis > 20 % Differenz betrug, wurde ein drittes Mal ausgezählt. Der Durchschnitt der Ergebnisse wurde in % angegeben. Die Berechnung des Retikulozytenproduktionsindex (RPI) erfolgte mit folgender Formel:

$$RPI = \frac{\text{Retikulozytenzahl (\%)} \times \text{Hämatokrit (l/l)}}{\text{Reifungszeit (d)}^b \times 0,45 \text{ (l/l)}}$$

Bei einem RPI ≥2 handelt es sich um eine Anämie mit adäquater Regeneration, ein RPI <2 weist auf eine inadäquate Regeneration hin.

Die biochemischen Laborparameter CRP, LDH, Haptoglobin, Kreatinin und Bilirubin wurden mithilfe des Geräts „Cobas Mira Plus®“ (HORIBA Ltd, Kyoto) und die Elektrolytwerte (Natrium und Kalium) durch „SPOTCHEM™ EL SE-1520“ (Arkay, Kyoto, Japan) analysiert. Hierfür erfolgte die Zentrifugation der Blutproben zur Gewinnung des

^b Je nach Hämatokritwert muss die Reifungszeit angepasst werden:

Hämatokrit (l/l)	Reifungszeit (d)
≥0,40	1
0,31-0,4	1,5
≤0,3	2

Plasmas mit 3.600 Umdrehungen pro Minute für zehn Minuten mit dem Gerät „Rotanta 460 R“ (Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Die Analysen wurden im CERMEL durchgeführt. Für Proben aus dem CRMN erfolgte die Zentrifugation (idem s.oben) und Extraktion von Serum in Fougamou mit anschließendem Probentransport ans CERMEL .

2.2.3 Laborparameter zum Endpunkt Hämolyse T14

2.2.3.1 Hämolysekriterien

Für die Parameter **Haptoglobin** und **CRP** wurde zusätzliches Probenmaterial eingefroren um Doppelbestimmungen in Berlin durchzuführen. Hierfür wurde jeweils Plasma von EDTA- und Lithium-Heparin-Blut aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren. Nach Abschluss der Rekrutierung in Gabun erfolgte der gekühlte Transport nach Deutschland und die unmittelbare Analyse im Labor Berlin der Charité Universitätsmedizin, Berlin.

Die untere Normgrenze von **Haptoglobin** lag bei 0,3 mg/dL, geringere Werte wurden als negativ gewertet. Die Grenze erschließt sich aus den Referenzwerten des Labors Berlin und CERMEL sowie der standardisierten Referenzwerte der „International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine“ (IFCC) [88]. Als **LDH**-Grenzwert wurden gemäß den am CERMEL bestehenden altersentsprechenden Normwerten für 1-18-Jährige ein Wert von 345 U/L definiert.

Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen abhängig von den Hämolyseparametern (Tabelle 2-4). Bei negativen Haptoglobinwerten und erhöhter LDH wurden die PatientInnen der Hämolysegruppe (HG) zugeordnet. PatientInnen mit normalem Haptoglobin- und LDH-Wert, oder allein erhöhtem LDH-Wert bildeten die Vergleichsgruppe (VG).

Tabelle 2-4: Gruppenaufteilung im Hinblick auf Hämolyse

Gruppe	Parameter
Vergleichsgruppe	LDH und Hapto unauffällig / LDH ↑ / Hapto ↓
Hämolysegruppe	Hapto ↓ + LDH ↑

Bei erhöhtem CRP und LDH an T14 konnte trotz normwertigem Haptoglobin keine Hämolyse ausgeschlossen werden. Bei Vorliegen dieser Konstellation erfolgte die konservative Einordnung in die Gruppe ohne Hämolyse. Bei erniedrigtem Haptoglobin mit normwertigem LDH, wurden die betroffenen PatientInnen, bei Verdacht auf eine Ahaptoglobinämie, dahingehend überprüft ob an weiteren Visiten ebenfalls ein

erniedrigtes Haptoglobin auftrat. Falls alle Studienzeitpunkte negatives Haptoglobin aufwiesen, wurde der Patient aus den Analysen der Hämolyseparameter ausgeschlossen.

2.2.3.2 Hämoglobinverläufe

Folgende Zeiträume wurden für die Analyse der Hb-Verläufe in den einzelnen Patienten-Gruppen definiert:

- Δ Hb T0-T3 – Therapiezeitraum
- Δ Hb T3-T14 – Hämolysezeitraum nach Therapie
 - i. Δ Hb T3-7: frühe Phase einer Hämolyse
 - ii. Δ Hb T7-14: späte Phase einer Hämolyse
- Δ Hb T0-T14 – Gesamtzeitraum

2.2.3.3 Definition Anämie

An die WHO-Definition angelehnt wurde Anämie wie folgt klassifiziert:

Tabelle 2-5: Hb-Bereiche in g/dL zur Klassifikation der Schweregrade von Anämie nach WHO

Population	Anämie (g/dL)			
	Keine Anämie	Mild ^a	Moderat	Schwer
Kinder 6-59M	≥11	10-10,9	7-9,9	<7
Kinder 5-11J	≥11,5	11-11,4	8-10,9	<8
Kinder 12-14J	≥12	11-11,9	8-10,9	<8
Frauen >14J	≥12	11-11,9	8-10,9	<8
Männer >14J	≥13	11-12,9	8-10,9	<8

^a bestehender Eisenmangel ohne klinischer Anämie

(Quelle: Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva: World Health Organization; 2011). (CC BY-NC-SA 3.0 IGO)

Da per Definition noch keine klinische Anämie bei milder Anämie vorliegt, wurde in der Auswertung die milde Form nicht als Anämie gewertet. Die Klassifikation erfolgte in keine Anämie, moderate und schwere Anämie. Im Falle einer Behandlung mit Transfusion bei schwerer Anämie wurden die PatientInnen für den Endpunkt Hämolyse T14 ausgeschlossen.

2.2.3.4 Ehemals-infizierte Erythrozyten

Für die Quantifizierung der oie erfolgten fünf Schritte: (1) Materialgewinnung, (2) Reinigung, (3) Fixierung, (4) Färbung und (5) Analyse mit Durchflusszytometer [68]:

(1) Für die Gewinnung von reinen Erythrozyten wurde zunächst EDTA-Vollblut für 5 min. mit einer Geschwindigkeit von 1.300 RPM zentrifugiert. Anschließend konnte das Plasma und der Leukozytenfilm verworfen werden. 50 µL des übrigbleibenden Pellets wurden heraus pipettiert. (2) Für die Reinigung wurde jeweils 500 µL PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, Thermo Fischer Scientific) in das Röhrchen hineingegeben, vorsichtig auf- und abpipettiert, bei 900 G für zwei Minuten zentrifugiert und anschließend das überschüssige PBS verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. (3) Zur Fixierung wurde das Pellet mit 0,05 % Glutaraldehyd Lösung (Glutaraldehyd 25 %, Sigma Aldrich G6257) vermischt und für 30 Minuten in Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS abgewaschen. (4) 5 µL des fixierten Pellets wurde vor der Anfärbung mit 45 µL Saponin vermischt um die Zellpermeabilisierung zu erhöhen. Dann wurden die Erythrozyten mit anti RESA Mab (Klon 28/2, Walter and Elisabeth Hall Institute, WEHI Antibody Facility, Melbourne, Australien) sowie mit PI (Propidiumjodid®; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 30 Minuten inkubiert, wieder gewaschen und im nächsten Schritt mit einem Alexa Fluor 488 markierten Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antikörper (Thermo Fisher, Waltham, USA) für weitere 30 Minuten angefärbt. Eine letzte Waschung erfolgte und die Mischung wurde in 200 µL Pufferlösung (Lösung aus PBS und Bovine Serum Albumin, BSA) verdünnt. (5) Die Messung erfolgte in einem Accuri C6 Durchflusszytometer (BD-Biosciences, Franklin Lakes, USA) mit den in Tabelle 2-6 gezeigten Spezifikationen.

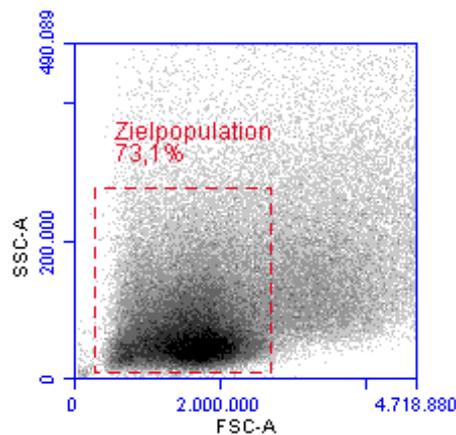
Tabelle 2-6: Emissionsspektren der Fluoreszenzen für BD Accuri® C6

Färbung	Laser	Standard Filter	Detektor
Alexa Fluor® 488	488 nm	533/30	FL1
PI	488 nm	585/40, 670 LP	FL2, FL3

(Quelle: BD Accuri Optical Filter Guide "Emissionsspektren (Fluoreszenz) BD Deutschland")

Die digitalisierten Daten wurden mit der BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21 dargestellt und analysiert. Für jede Probe wurden mindestens 100.000 Ereignisse eingespeist. Das erste Gating der Ziel-Zellpopulation nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) erfolgte visuell (Abbildung 2-5).

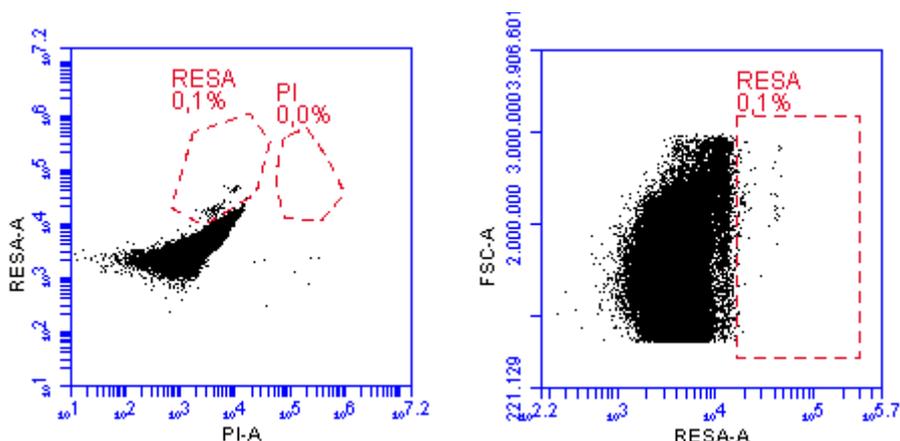
Abbildung 2-5: Punktwolkendiagramm mit 100.000 Ereignissen einer beispielhaften Probe mit Vorwärts- und Seitenstreuung in der Durchflusszytometrie. Die Zielpopulation wurde mithilfe eines Gatings fokussiert eingegrenzt (rote Box).



2.2.3.4.1 Nachweisgrenze in der Durchflusszytometrie

Zellbestandteile können durch Streuung von Laserlicht Eigenfluoreszenz produzieren. Um diese Rauschsignale von den markierten Fluorochromen zu differenzieren, wurden Negativkontrollen von Malaria-negativen ProbandInnen mit der gleichen Färbemethodik markiert und untersucht. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen wurde als Autofluoreszenz gewertet und die maximale Anzahl als Nachweisgrenze festgelegt (Abbildung 2-6). Proben, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen.

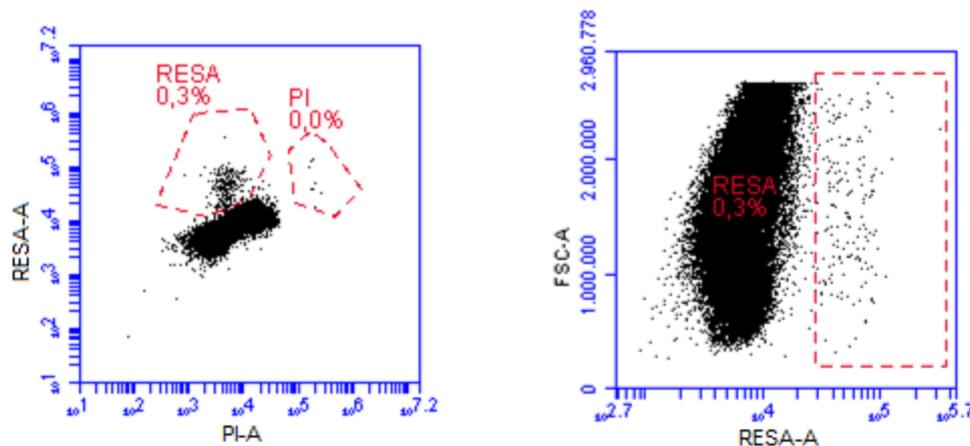
Abbildung 2-6: Repräsentative Negativkontrolle einer Malaria-negativen Probe mit 0,1 % autofluoreszierendem Zellanteil



Die Gating-Strategie für RESA (FL1) und PI (FL3) ist in Abbildung 2-7 exemplarisch dargestellt. Bei jedem Probendurchlauf erfolgte zunächst die FACS-Analyse einer ungefärbten Probe. Wie bei den Negativkontrollen der Malaria-negativen Proben wurden

die Gating Fenster bei jedem Mess-Durchlauf angepasst. Alle doppel-positiven Zellen mit RESA und PI Markierung wurden als infizierte Zellen gewertet und aus der Analyse ausgeschlossen. Die RESA-positiven und PI-negativen Zellen wurden als oie gewertet. Die Evaluierung der oie erfolgte am dritten Tag nach Therapiebeginn. Bei Werten oberhalb der Nachweisgrenze an T3 erfolgten weitere Abnahmen an Tag 7±1, 14±2, und 28±2 oder an jedem anderen Tag bei unvorhergesehenen Visiten.

Abbildung 2-7: Beide Abbildungen zeigen die eingegrenzte Zielpopulation aus Abbildung 2-6 in einem neuen Plot zur weiteren Differenzierung. Die linke Abbildung zeigt das Gating von PI-positiven (FL-3 Kanal) und RESA-positiven (FL-1 Kanal) Zellen. Somit erfolgte die Quantifizierung der oie (RESA-pos.) und der infizierten Erythrozyten (RESA und PI-pos.). In der rechten Abbildung wurde die RESA-pos. Population im Verhältnis zu ihrer Größe (FSC) aufgetragen und aufgrund der präziseren Darstellung zusätzlich zur Quantifizierung genutzt.



2.2.3.4.2 Weitere Analysen

Die Berechnung der absoluten oie-Zahl erfolgte aus dem relativen oie-Anteil und der Erythrozytenzahl/pL. Die Berechnung der Pitting Quote, d.h. dem Anteil von parasitierten Erythrozyten, der nach Behandlung in oie umgewandelt wurde, erfolgte nach folgender Formel:

$$Pitting\ Quote = \frac{oie\ T3\ (\%)}{Parasitämie\ T0\ (\%)} \times 100$$

Zur Beschreibung der oie-Kinetik erfolgte die Berechnung des Abbaus von oie innerhalb der ersten (T3-7), der zweiten (T7-14) Woche sowie dem gesamten Zeitraum nach Therapie nach folgenden Formeln:

oie Abbau erste Woche: oie T3 – T7 (/pL)

oie Abbau zweite Woche: oie T7 – T14 (/pL)

oie Abbau nach Therapie: oie T3 – T14 (/pL)

2.2.4 Datenmanagement

2.2.4.1 Datensammlung und –sicherung

Alle Informationen der PatientInnen und dazugehörigen Ergebnisse wurden in Papierbasierten Dokumentationsbögen (Case Report Form, CRF) beim direkten Kontakt mit den PatientInnen erfasst. Jeden TeilnehmerInnen wurde während des Screenings ein Pseudonym vergeben, das zur Identifikation von Ergebnissen im Labor und Untersuchungen genutzt wurde. Dieses Pseudonym wurde auch bei weiteren statistischen Auswertungen gebraucht. Die im Labor analysierten Werte wurden als Papierdruck an die CRFs geheftet. Diese wurden dann am Studienort gelagert und verbleiben dort für mindestens zehn Jahre nach Erscheinen der Veröffentlichungen der Studienergebnisse. Lediglich der Hauptuntersuchungsleiter und direkt autorisiertes Personal hatten Zugriff auf die CRF und andere Ausgangsdokumente.

2.2.4.2 Datenerfassung und -bereinigung

Am Ende der Rekrutierungsphase fand eine elektronische Erfassung aller Informationen in eine Datenbank durch das Programm Epi Info™ Version 3.5.4. (2012, CDC, Atlanta, GA, USA) statt. Diese wurden lokal und auf externen Speicherträgern gesichert. Vor der Analysearbeit erfolgte eine Datenbereinigung zur Entfernung von Duplikaten und falsch erfassten Werten durch Analysen der Werteverteilung und stichprobenartige Verifikation der Quelldokumente.

2.2.5 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die verwendeten Programme der statistischen Auswertung waren JMP Version 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) und Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016). Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung bzw. Median mit Bereich oder

Interquartilbereich (IQB) in Absolutzahlen oder in Prozent aufgeführt. Die Parasitendichte wurde log transformiert als geometrischer Mittelwert angegeben und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall ermittelt.

2.2.5.1 Fallzahlplanung

Auf der Basis von Daten aus vorangegangenen Studien wurde die Annahme getroffen, dass ca. 20 % der behandelten PatientInnen von einer verzögerten Hämolyse nach Therapie betroffen sind. Darauf aufbauend erfolgte die Fallzahlplanung zur Bestimmung einer Proportion von 20 % Hämolyse mit ± 10 % Präzision und 95 % Konfidenzintervall ($n = 65$). Die Berechnung nahm eine Gesamtrate von 30 % für Lost-to-Follow up oder Therapieversagen an, sodass eine notwendige Anzahl von 93 PatientInnen zum Erreichen des Endpunktes an T14 für 65 PatientInnen errechnet wurde.

2.2.5.2 Assoziationsberechnung

Der Zusammenhang zwischen zwei Gruppen (Gruppen mit und ohne Auftreten von Hämolyse bzw. Therapiegruppen) bei kategorialen Variablen wurde mit dem Pearson's Chi-Quadrat Test geprüft. Bei der Analyse von kontinuierlichen Variablen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test angewandt. Für den Zusammenhang von initialer Parasitämie und der Ausbildung von oie an T3, sowie den Zusammenhang von Alter und Pitting Quote wurde eine lineare Regressionsanalyse mit R^2 als Bestimmtheitsmaß angewandt. Zur Beschreibung der Wahrscheinlichkeit von kategorialen Risikofaktoren auf ein Hämolyseereignis wurde die Odds Ratio mit entsprechendem 95%-Konfidenzintervall errechnet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

2.2.6 Ethisches Statut

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und den Grundprinzipien der Internationalen Konferenz für Harmonisation – Gute Wissenschaftliche Praxis (ICH-GCP) ausgeführt. Das Studienprotokoll und das Formblatt der schriftlichen Einwilligungserklärung wurden vom „Institutional Ethics Committee of CERMEL“ überprüft. Nach Aufklärung über Inhalt, Risiken und Vorteile der Studie durch einen der Studienärzte erfolgte die schriftliche Einwilligung aller TeilnehmerInnen bzw. ihrer Erziehungsberechtigter im Falle von Minderjährigen. Die Studie wurde auf der „WHO International Clinical Trials Registry Platform“ (DRKS00007104) registriert.

3 ERGEBNISSE

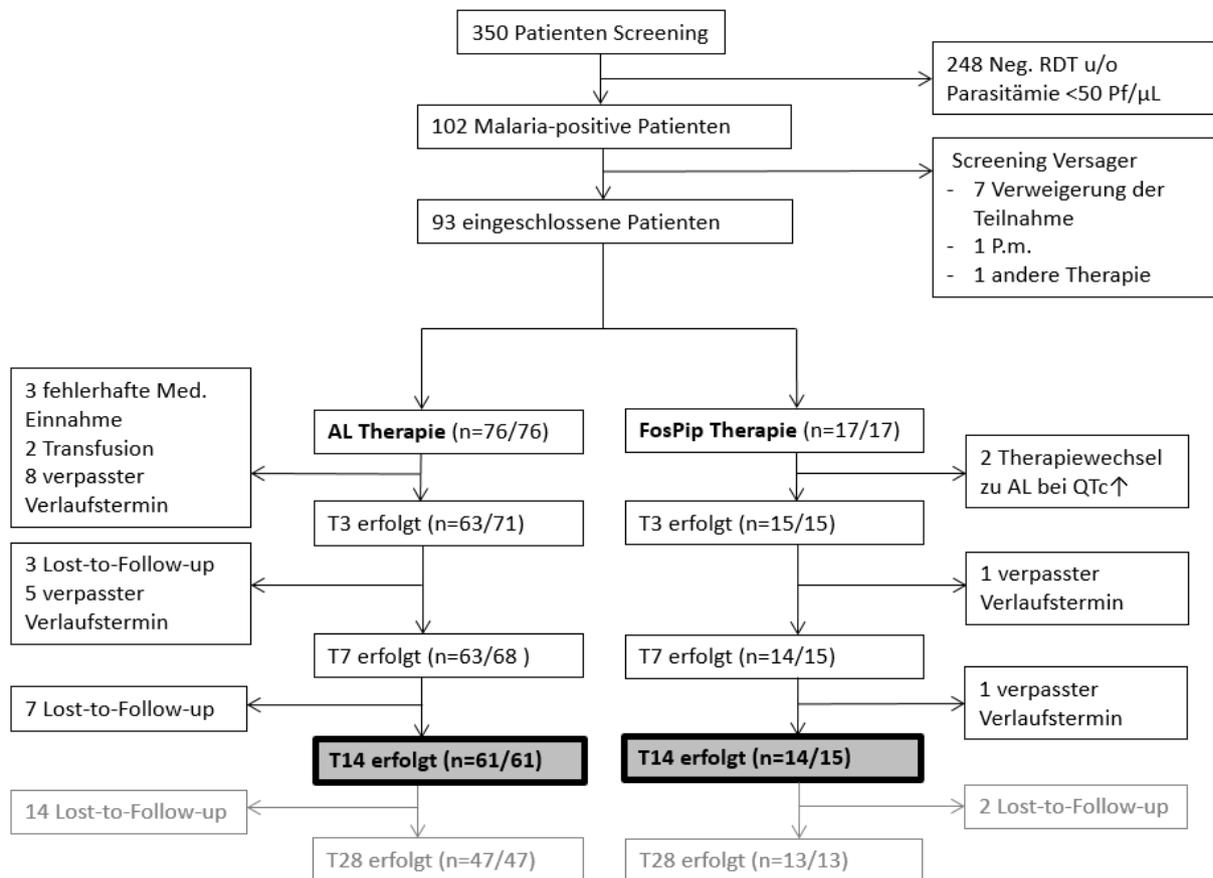
3.1 STUDIENPOPULATION

Im Zeitraum zwischen Mai 2015 und Januar 2016 wurden 350 PatientInnen gescreent, die aktuell oder in den letzten sieben Tagen anamnestisch Fieber angaben. 102 PatientInnen wurden mit positivem Schnelltest und einer asexuellen Parasitämie $>50/\mu\text{L}$ als Malaria positiv bewertet. Neun dieser PatientInnen wiesen Ausschlusskriterien auf: Ein Patient hatte eine *P.m.* Monoinfektion, ein Patient war bereits mit einem anderen Therapieregime innerhalb der letzten Wochen therapiert worden und sieben weitere verweigerten ihre Teilnahme an der Studie. Somit wurden 93 PatientInnen in die Studie inkludiert. 17 PatientInnen (17/93; 18 %) wurden im Rahmen der parallel durchgeführten klinischen Phase-2 Studie mit Fosmidomycin/Piperaquin (Fospip) behandelt. Die übrigen PatientInnen (76/93; 82 %) wurden mit Artemether/Lumefantrin (AL) behandelt. Im vorliegenden Flussdiagramm (Abbildung 3-1) ist der Verlauf vom Screening der PatientInnen bis zum letzten Kontrolltermin dargestellt.

Im Behandlungsarm AL nahmen drei PatientInnen die Medikation nicht in der vorgesehenen Dosierung ein, zwei weitere erhielten Transfusionen bei schwerer Anämie und wurden daher von weiteren Analysen ausgeschlossen. Zehn PatientInnen (10/76; 13 %) schieden aus der Nachbeobachtung vor T14 und weitere 14 (18 % der AL-Gesamtpopulation) vor T28 aus.

Im Behandlungsarm Fospip wurde bei zwei PatientInnen die Einnahme der Studienmedikation abgebrochen, da sie eine QTc-Zeit von >450 ms nach erster Dosis entwickelten. Sie wurden gemäß dem Studienprotokoll mit AL weitertherapiert und aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Bis zum T14 wurden alle PatientInnen gesehen und zwei PatientInnen (11 % der Fospip-Gesamtpopulation) schieden aus der Nachbeobachtung vor T28 aus („Lost-to-follow-up“).

Abbildung 3-1: Flussdiagramm der Studienpopulation. Primärer Endpunkt grau hinterlegt.



Die Ausgangswerte der PatientInnen in beiden Behandlungsgruppen waren bezüglich der klinischen Parameter und der Laborwerte vergleichbar (Tabelle 3-1). PatientInnen in der Behandlungsgruppe FosPip hatten infolge der Einschlusskriterien in die FosPip Studie eine etwas höhere Parasitämie als PatientInnen unter der Behandlung mit AL, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (geometrisches Mittel 8.262/ μL mit FosPip vs. 4.189/ μL mit AL, $p=0,08$). Allerdings waren die drei PatientInnen mit der höchsten Parasitämie $>5\%$ in der Behandlungsgruppe AL. Statistisch signifikante Unterschiede unter den Behandlungsgruppen ergaben sich beim Alter, dem Hb-Wert, der Erythrozyten Konzentration, dem Hämatokrit und dem Kreatininwert.

Tabelle 3-1: Baseline Kenndaten der Studienpopulation

Charakteristiken	AL (n=76)	Fospip (n=17)	p-Wert	Gesamt (n=93)
Geschlecht				
männlich abs. (%)	38/76 (50)	12/17 (70)	0,15	50/93 (54)
Alter (Jahre)‡	8 (4;12) (0,5-55)	4 (4;5) (3-5)	0,008*	5 (9;10) (0,5-55)
Parasitendichte				
geo. Ø (/uL)‡	4.189 (114-330.600)	8.262 (779-105.070)	0,08	4.791 (114-330.600)
(%)‡	0,08 (0,003-9,028)	0,25 (0,019-2,295)	0,05	0,09 (0,003-9,03)
Temperatur				
axillär (°C)	36,9 (36,6-37,1)	36,9 (36,5-37,3)	0,99	36,9 (36,7-37,1)
Hämoglobin (g/dL)‡	9,9 (8,5;11,3)	8,9 (8,3;9,5)	0,04*	9,5 (8,5;11,0)
Hämatokrit (%)	31 (30-32)	28 (27-29)	0,02*	30 (29-31)
MCV (fL)	74 (72-76)	76 (80-71)	0,38	74 (73-76)
MCH (pg)	24 (23-24)	24 (22-25)	0,35	24 (23-24)
Erythrozyten (pL)	4,2 (4,0-4,3)	3,8 (3,5-4,0)	0,01*	4,1 (4,0-4,2)
Thrombozyten (nL)	176 (156-197)	186 (149-223)	0,40	178 (160-196)
Leukozyten (nL)	8,3 (7,6-9,0)	8,6 (7,6-9,5)	0,41	8,3 (7,8-8,9)
Retikulozyten relativ (%)‡	0,8 (0,5;1,5)	0,7 (0,4;2,0)	0,82	0,8 (0,5;1,5)
LDH (U/L)‡	300 (248;353)	287 (213;349)	0,67	294 (246;353)
GOT (U/L)	28 (25-30)	27 (24-30)	0,79	28 (26-30)
GPT (U/L)	15 (13-16)	18 (13-23)	0,22	15 (14-17)
Kreatinin (µmol/L)	37,5 (33,5-41,5)	24,5 (18,2-30,8)	0,002*	34,8 (31,2-38,3)
Haptoglobin (g/L)	0,56 (0,4-0,7)	0,46 (0,1-0,8)	0,56	0,5 (0,4-0,7)
Bilirubin (µmol/L)	12,6 (10,5-14,7)	12,95 (8,8-17,1)	0,58	12,7 (10,8-14,5)

wenn nicht anders markiert Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, † Median (Interquartilbereich), ‡ Median (Bereich), Ø Durchschnitt, * statistisch signifikanter Wert, KI Konfidenzintervall

3.2 ENDPUNKT HÄMOLYSE AN T14

Zum Studienzeitpunkt T14 wurden die notwendigen Laborwerte für den Endpunkt Hämolyse (LDH, Haptoglobin) für 69/75 PatientInnen erhoben. Bei den restlichen sechs PatientInnen konnten die Hämolyseparameter technisch bedingt nicht bestimmt werden. Die Kriterien einer Hämolyse an T14 erfüllten 6/69 PatientInnen (9 %).

Neben den sechs PatientInnen mit Hämolyse hatten 17 weitere PatientInnen negative Haptoglobinwerte an T14 mit normwertiger LDH. Folglich hatten in der Summe 23/69 PatientInnen (34 %) ein erniedrigtes Haptoglobin an T14. Bei neun dieser 23 PatientInnen, waren die Haptoglobinwerte zu keinem der gemessenen Studien-Zeitpunkte normwertig, wobei fünf dieser PatientInnen noch an T28 negative Werte aufwiesen. Auch ein Patient der Hämolysegruppe hatte an jedem gemessenen Studien-Zeitpunkt ein erniedrigtes Haptoglobin (Messungen an T7, T14 und T28). Valide LDH-Werte an T14 lagen bei insgesamt 72 PatientInnen vor. Neben den sechs PatientInnen mit Hämolyse hatten weitere acht (12 %) erhöhte LDH-Werte mit normwertigem Haptoglobin. Von diesen hatten zwei erhöhte CRP-Werte, sodass im Rahmen einer akuten Phase Reaktion das Haptoglobin erhöht und damit eine bei Hämolyse erniedrigte Wert verdeckt sein könnte. Diese hatten jeweils ansteigende Hb-Parameter im Verlauf.

Doppelbestimmungen für CRP an T14 erfolgte bei 20 Proben. Haptoglobin wurde bei insgesamt 32 Proben doppelt bestimmt, davon waren 16 Proben an T14 mit 14 doppelten Probemessungen und 2 ergänzenden Messungen. Ergänzt wurden Proben, die bedingt durch technische Messfehler keinen auswertbaren Wert aus dem CERMEL vorwiesen. Im Vergleich bestanden zwischen den Laborergebnissen aus dem CERMEL und dem Labor Berlin keine signifikanten Unterschiede, sodass keine Veränderung in der Klassifikation der PatientInnen aufgrund der Doppelbestimmungen erfolgte.

In Abbildung 3-2 sind die klinischen Laborparameter Hb, LDH und Retikulozyten der Hämolyse- und Vergleichsgruppe dargestellt. Insgesamt zeigen beide Gruppen einen sehr ähnlichen Verlauf der Laborwerte ohne signifikante Unterschiede, abgesehen vom definitionsgemäßen Unterschied in der LDH an T14. Am Screeningtag hatten beide Gruppen ähnliche Ausgangswerte. An T3 stieg die LDH in der HG mehr an als in der VG, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied. Am siebten Tag waren die LDH-Werte wieder vergleichbar und die Retikulozyten stiegen in beiden Gruppen, aber vor allem in der VG an und fielen an T14 wieder ab. Die medianen Hb-Werte am Screeningtag waren

in beiden Gruppen vergleichbar. An T3 sank der Hb-Wert der HG, in der VG blieb der Wert nahezu konstant. Zwischen T3 und T28 stiegen die Werte der HG dann stärker an, sodass am letzten Kontrolltermin beide Gruppen vergleichbare Werte aufwiesen. In Tabelle 3-2 ist eine Übersicht aller Parameter der Verlaufsdiagramme aufgelistet. Tabelle 3-3 zeigt die Hb-Verläufe der PatientInnen mit und ohne Hämolyse. Ein Abfall der Hb Werte in der Phase nach Therapie (T3-14) wurde bei keinem der PatientInnen in der HG beobachtet (unterer Wert des Δ Hb Bereichs ≥ 0).

Abbildung 3-2: Mediane Hb-, LDH- und Retikulozytenwerte (IQB) der PatientInnen mit und ohne Hämolyse an T14 im Verlauf. Die gestrichelte Linie indiziert den Grenzwert für LDH bei 345 U/L, die Klammer hebt einen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen hervor.

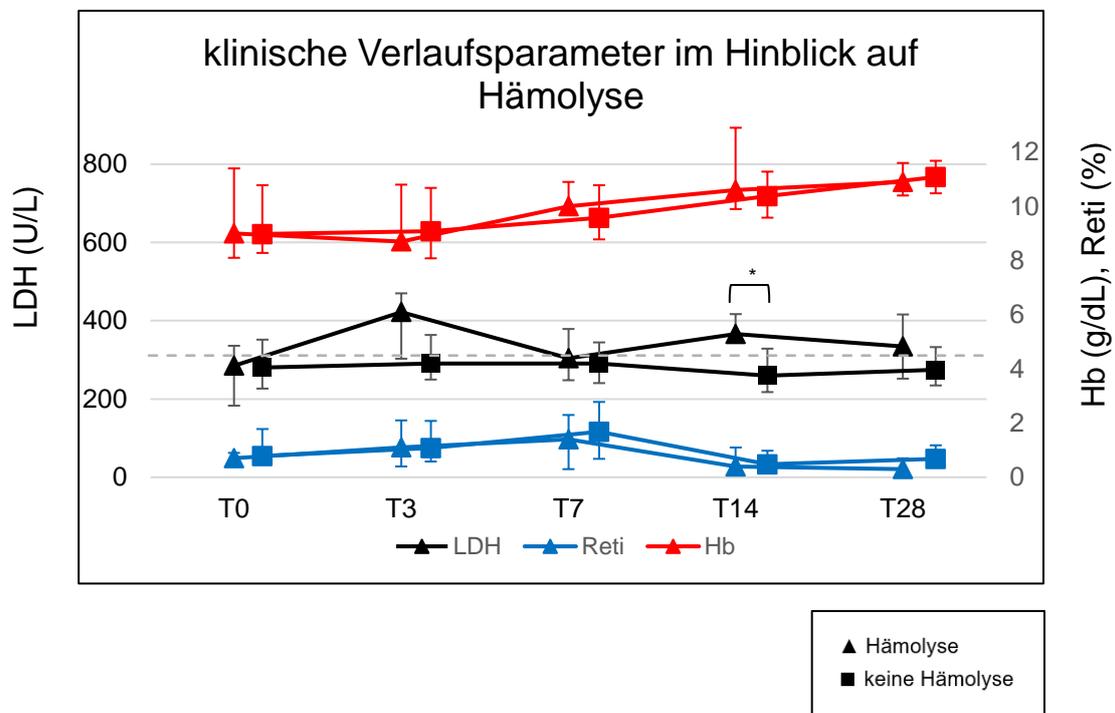


Tabelle 3-2: Absolute Hämoglobin-, Retikulozyten- und LDH-Werte (Median mit IQB) der Hämolyse- und Vergleichsgruppe im Verlauf

Charakteristiken	Hämolysegruppe n=6	Vergleichsgruppe n=63	p-Wert
T0			
Hb (g/dL)	9,0 (8,1;11,4) n=6	9,2 (8,4;10,8) n=60	0,81
LDH (U/L)	285 (183;336) n=4	282 (228;353) n=54	0,71
Retikulozyten (%)	0,7 (0,5;0,9) n=3	0,8 (0,5;1,8) n=46	0,72
T3			
Hb (g/dL)	8,7 (8,4;10,8) n=4	9,1 (8,1;10,7) n=57	0,90
LDH (U/L)	422 (303;470) n=4	292 (251;365) n=58	0,08
Retikulozyten (%)	1,1 (0,4;2,1) n=4	1,1 (0,6;2,1) n=42	0,86
T7			
Hb (g/dL)	10,0 (9,8;10,9) n=6	9,6 (8,8;10,9) n=56	0,42
LDH (U/L)	304 (248;379) n=6	292 (242;346) n=56	0,66
Retikulozyten (%)	1,4 (0,3;2,3) n=4	1,7 (0,7;2,8) n=41	0,43
T14			
Hb (g/dL)	10,6 (9,9;12,9) n=6	10,4 (9,6;11,3) n=60	0,40
LDH (U/L)	366 (351;417) n=6	261 (219;330) n=59	0,002*
Retikulozyten (%)	0,4 (0,3;1,1) n=4	0,5 (0,2;1,0) n=44	0,79
T28			
Hb (g/dL)	10,9 (10,4;11,6) n=5	11,1 (10,5;11,7) n=48	0,71
LDH (U/L)	334 (252;416) n=4	276 (236;334) n=39	0,47
Retikulozyten (%)	0,3 (0,2;0,7) n=3	0,7 (0,4;1,2) n=25	0,14

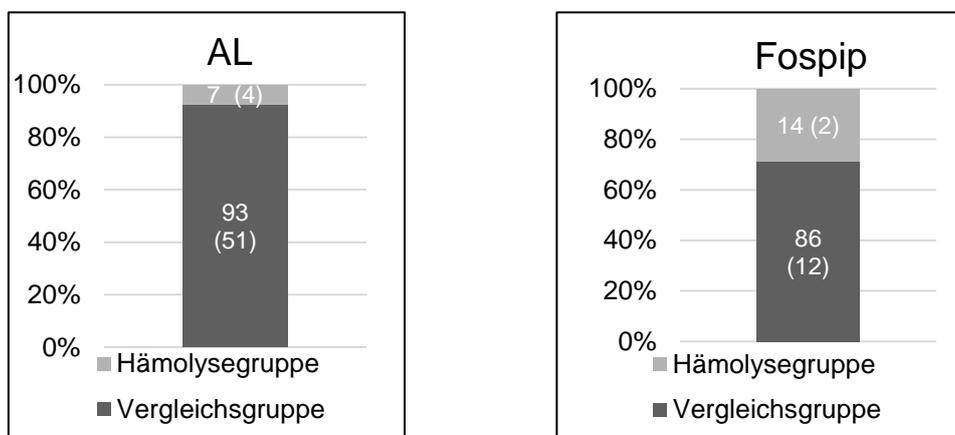
Tabelle 3-3: Hämoglobinverläufe der PatientInnen mit und ohne Hämolyse (Median in g/dL mit Bereich)

Δ Hb	Hämolysegruppe n=6	Vergleichsgruppe n=63	p-Wert
T0-3	0,35 (-0,1 - 0,8) ^c n=4	-0,1 (-2,9 - 1,4) n=56	0,18
T3-14	1,5 (0,7 - 2,4) n=4	1,2 (-0,8 - 3,9) n=57	0,58
T3-7	0,9 (0,0 - 1,5) n=4	0,5 (-0,7 - 2,5) n=55	0,60
T7-14	0,7 (0,0 - 2,5) n=6	0,6 (-2,0 - 3,5) n=56	0,71
T0-14	1,6 (0,9 - 2,3) n=6	1,0 (-1,5 - 3,5) n=59	0,07
T14-28	0,1 (-0,8 - 1,3) n=5	0,5 (-3,3 - 3,3) n=48	0,45
T0-28	2,4 (0,6 - 3,4) n=5	1,6 (-1,2 - 4,0) n=48	0,47

3.2.1 Unterschiede zwischen AL und FOSPIP

Von den 69 PatientInnen, bei denen valide Messwerte der Hämolyseparameter an T14 zur Verfügung standen, wurden 55 PatientInnen mit AL und 14 PatientInnen mit Fospip therapiert. 4/55 PatientInnen in der AL Population (7 %) und 2/14 PatientInnen in der Fospip Population (14 %) hatten eine Hämolyse an T14. Die Odds für das Auftreten von Hämolyse für die Therapie mit AL zu Fospip lag bei 0,5 (0,1-2,9).

Abbildung 3-3: Auftreten von Hämolyse an T14 in den unterschiedlichen Therapiegruppen in % (abs.)



^cBei zwei PatientInnen fehlte der Hb-Wert an T3, wodurch der mediane Δ Hb-Wert T0-3 verhältnismäßig hoch ausfiel

In Abbildung 3-4 sind die medianen Werte von LDH, Retikulozyten sowie Hb für die PatientInnen mit AL und Fospip-Therapie abgebildet. Die medianen LDH-Werte nach AL-Behandlung sind an allen Studienzeitpunkten unterhalb des Grenzwertes von 345 U/L. An T28 fiel ein Anstieg des medianen LDH-Werts oberhalb des Grenzwertes bei den PatientInnen nach Fospip-Behandlung auf. Im Vergleich war der Unterschied zu PatientInnen nach AL-Behandlung jedoch nicht signifikant. Die Hb-Werte der PatientInnen in der Fospip-Population waren am Screeningtag (T0) signifikant niedriger als in der AL-Population. An T3 vergrößerte sich die Differenz, glich sich aber im Verlauf wieder an. Am letzten Tag waren die Hb-Werte nahezu identisch. In Tabelle 3-4 sind die einzelnen Parameter der Verläufe zur Übersicht aufgelistet. Die Hb-Werte beider Therapiegruppen nahmen kontinuierlich zu. Während der Therapiezeit stagnierte der Hb-Wert, stieg aber vor allem in der Fospip-Population zwischen T3-14 signifikant an. Insgesamt fand sich in dieser Gruppe eine größere Zunahme vom Screeningtag bis zum T14.

Abbildung 3-4: Mediane Hb-, LDH- und Retikulozytenwerte (IQB) der PatientInnen je nach Therapie an T14 im Verlauf. Die gestrichelte Linie indiziert den Grenzwert für LDH bei 345 U/L, die Klammer markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen.

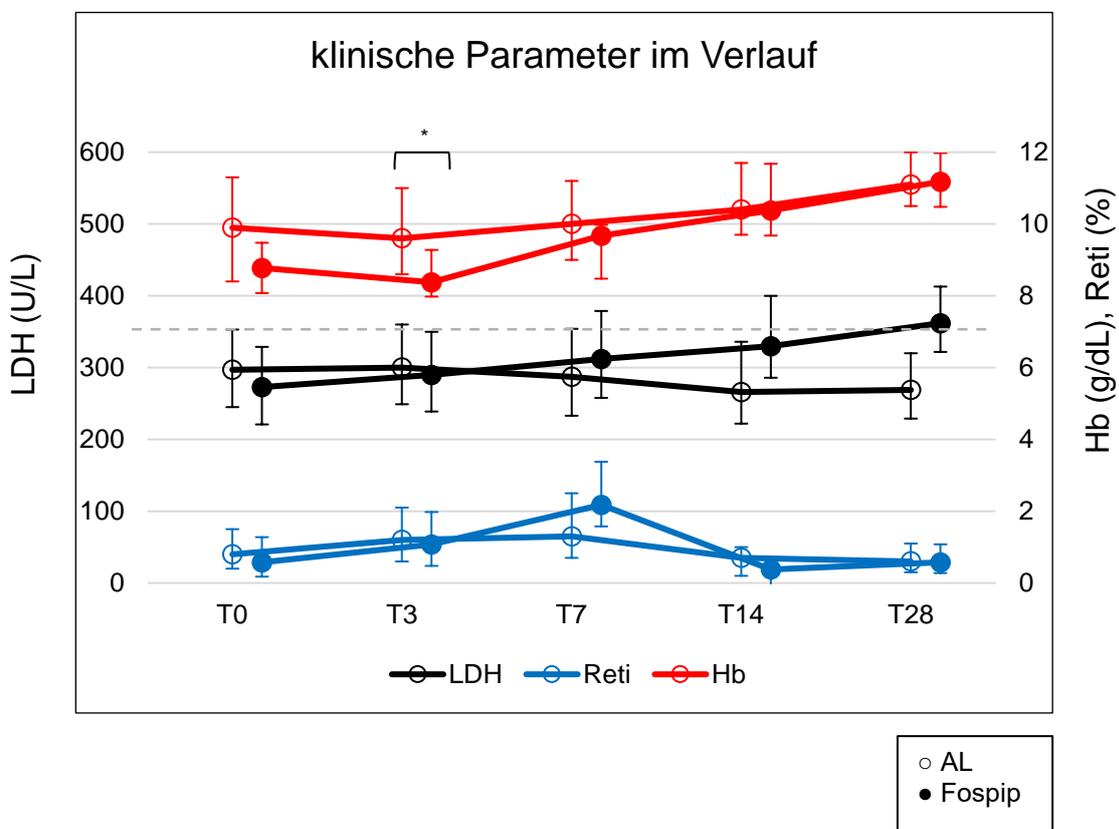


Tabelle 3-4: Absolute Hämoglobin-, Retikulozyten- und LDH-Werte (Median mit IQB) der AL- und Fospip-Population im Verlauf

	AL n=76	Fospip n=17	p-Wert
T0			
Hb (g/dL)	9,9 (8,5;11,3) n=68	8,9 (8,3;9,5) n=14	0,06
LDH (U/L)	297 (245;353) n=60	274 (207;345) n=13	0,52
Retikulozyten (%)	0,8 (0,5;1,5) n=44	0,6 (0,4;1,4) n=11	0,54
T3			
Hb (g/dL)	9,6 (8,6;10,9) n=62	8,8 (8,0;10,9) n=14	0,03*
LDH (U/L)	300 (249;360) n=62	291 (253;426) n=14	0,87
Retikulozyten (%)	1,2 (0,6;2,1) n=38	1,1 (0,5;2,4) n=15	0,98
T7			
Hb (g/dL)	10,0 (9,0;11,2) n=63	9,8 (8,8;10,0) n=12	0,13
LDH (U/L)	287 (233;354) n=61	318 (274;356) n=12	0,31
Retikulozyten (%)	1,3 (0,6;2,5) n=42	2,2 (0,7;2,7) n=12	0,32
T14			
Hb (g/dL)	10,4 (9,7;11,7) n=60	10,4 (9,8-10,9) n=13	0,58
LDH (U/L)	266 (222;336) n=59	331 (243;366) n=13	0,08
Retikulozyten (%)	0,7 (0,2;1,0) n=40	0,4 (0,3;0,6) n=11	0,60
T28			
Hb (g/dL)	11,0 (10,4-12,0) n=47	11,2 (10,9;11,6) n=11	0,65
LDH (U/L)	269 (228;320) n=40	363 (286;463) n=6	0,05
Retikulozyten (%)	0,6 (0,3;1,1) n=24	0,6 (0,2;1,1) n=7	0,65

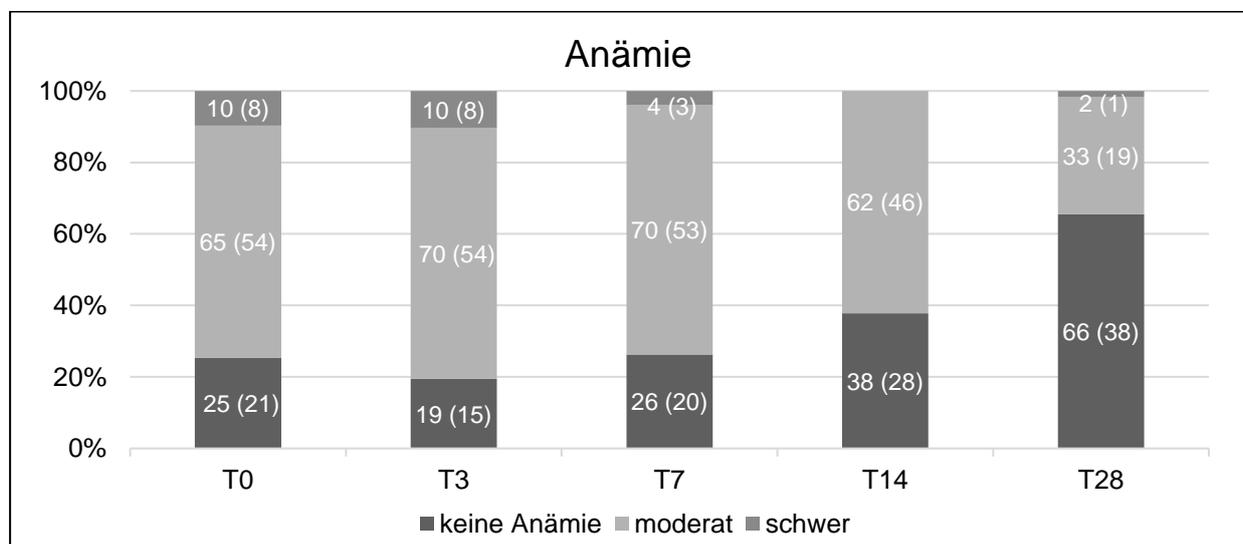
Tabelle 3-5: Hämoglobinverläufe je nach Therapie

Δ Hb (g/dL) Median (Bereich)	AL n=76	Fospip n=17	p-Wert
T0-3	0,0 (-2,9 - 2,0) n=58	-0,1 (-2,1 - 1,4) n=15	0,77
T3-14	0,9 (-0,8 - 3,9) n=53	1,6 (0,7 - 3,0) n=14	0,02*
T3-7	0,4 (-0,8 - 2,8) n=57	0,7 (-0,6 - 2,3) n=13	0,41
T7-14	0,5 (-2 - 3,5) n=56	0,8 (0,0 - 2,3) n=12	0,38
T0-14	1,0 (-1,5 - 3,5) n=57	1,4 (0,2 - 2,4) n=14	0,17
T14-28	0,3 (-3,3 - 3,3) n=47	0,8 (-0,3 - 2,8) n=11	0,18
T0-28	1,1 (-1,2 - 4,0) n=47	2,4 (1,2 - 3,4) n=11	0,02*

3.3 ANÄMIE

Das folgende Diagramm (Abbildung 3-5) zeigt die Prävalenz der unterschiedlichen Schweregrade von Anämie zu den einzelnen Studienzeitpunkten. 75 % der PatientInnen präsentierten eine moderate oder schwere Anämie am Screeningtag. An T3 fiel eine leichte Verschiebung hin zur moderaten Anämie auf, bei welcher der Anteil von 65 % auf 70 % zunahm und der Anteil ohne Anämie von 25 % auf 19 % abnahm. Im weiteren Verlauf stiegen die Hb-Werte stetig an, sodass ab T14 mit einer Ausnahme keine schwere Anämie mehr auftrat und die Prävalenz der moderaten Anämie von anfänglich 65 % an T0 auf ca. die Hälfte (33 %) an T28 sank.

Abbildung 3-5: Anämieverteilung im Verlauf in % (abs.)



Am letzten Verlaufstermin fiel eine einjährige Patientin mit schwerer Anämie auf. Sie wies einen Hb-Abfall von 10 g/dL auf 6,7 g/dL zwischen T14 und T28 auf. Seit zwei Tagen bestand Husten ohne Fieber, eine Reinfektion wurde ausgeschlossen. Die LDH-Parameter stiegen zwischen T14-28 von 429 U/L auf 554 U/L an, wurden aber von einem durchweg normwertigem Haptoglobin begleitet. Das CRP war an beiden Tagen technisch bedingt nicht bestimmbar. Eine verzögerte Hämolyse kann bei der Patientin nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei teils fehlenden Parametern erfolgte die Einteilung in die Patientengruppe ohne Hämolyse.

Ein dreijähriger Patient präsentierte bei Aufnahme ein stark erniedrigtes Hb von 6,9 g/dL mit einer initialen Parasitämie von 70.000/ μ L. Ein weiterer dreijähriger Patient stellte sich mit einer schweren Anämie mit einem Hb-Wert von 5,2 g/dL und einer Parasitendichte von 6.777/ μ L am Aufnahmetag vor. Beide bekamen eine orale Therapie mit AL und erhielten einen Tag nach Therapiebeginn Erythrozytenkonzentrate. Bei der Kontrolle an T3 betrug der Hb-Wert des ersten Patienten 8,8 g/dL und an T14 schließlich 9,3 g/dL. Der zweite Patient hatte an T3 einen Hb-Wert von 11,4 g/dL und an T14 einen Wert von 11,6 g/dL mit gleichzeitig bestehenden positiven Hämolyseparametern. Der Hb-Wert war an T28 weiterhin stabil bei 11,7 g/dL. Aufgrund der Transfusion wurden beide Patienten aus den weiteren Analysen zu Hämolyse und Hb-Verlauf ausgeschlossen.

3.4 EHEMALS-INFIZIERTE ERYTHROZYTEN

3.4.1 Messvalidierung (Autofluoreszenz)

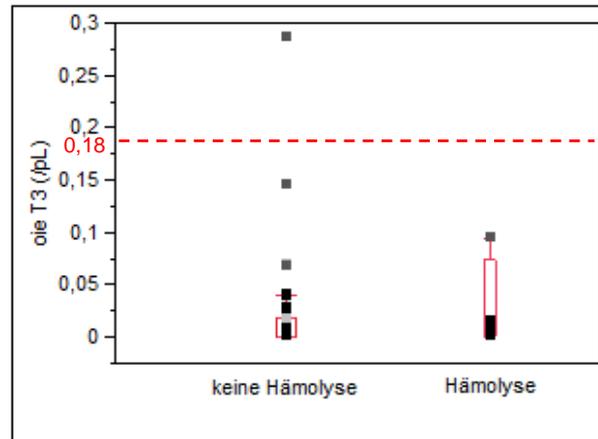
Die Autofluoreszenz wurde bei 18 Negativkontrollen gemessen und wies bei vier Untersuchungen 0,1 % oie und bei weiteren 14 Untersuchungen 0,0 % oies auf. Die untere Nachweisgrenze von validen oie-Werten wurde demzufolge auf $\geq 0,2$ % oies festgelegt [89]. Bei 60/78 PatientInnen konnten valide FACS-Messwerte an T3 ermittelt werden. Insgesamt zeigten 31/60 PatientInnen (52 %) an T3 oie-Werte oberhalb der Nachweisgrenze.

3.4.2 Vorkommen von oie in der Studienpopulation

Bei den 31 PatientInnen mit Werten oberhalb der Nachweisgrenze lag der mediane Anteil der oie an T3 bei 0,39 % (0,30;0,92) mit einem Minimum von 0,20 % und einem Maximum von 10,23 %. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Höhe der oies bei PatientInnen mit und ohne Hämolyse an T14 ($p=0,29$). Der Schwellenwert von

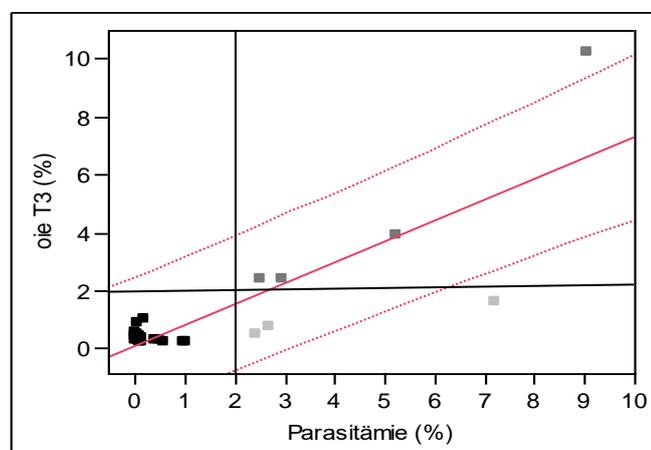
0,18/pL oies wurde von einem Patienten mit einem Wert von 0,29/pL überschritten. Dieser Patient wies keine positiven Hämolyseparameter an T14 auf (Abbildung 3-6).

Abbildung 3-6: oie/pL an T3 bei PatientInnen mit und ohne Hämolyse an T14. Die gestrichelte Linie stellt den publizierten Schwellenwert als Vorhersageparameter für das Auftreten einer Hämolyse bei 0,18/pL dar. Die Farbkodierung orientiert sich an Abbildung 3-7.



Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Screening-Parasitämie und des oie-Anteils an T3 mittels linearer Regression ergab eine Regressionsgerade mit der Funktion $y = 0,15 + 0,71 \times \text{Parasitämie (\%)} (R^2=0,6904, p<0,001)$ (Abbildung 3-7).

Abbildung 3-7: Korrelation zwischen Parasitämie an T0 (%) und der Anteil der oie (%) an T3. Abgebildet ist die Korrelationsgerade (durchgezogene rote Linie) bei linearer Anpassung. Die Konfidenzbänder sind mit einem Niveau von 95 % dargestellt (gestrichelte Linien). Farblich schwarz markiert sind PatientInnen mit einer Parasitämie und einem oie-Wert <2 %. PatientInnen mit einer Parasitämie >2 % wurden bei Pittingwerten >2 % dunkelgrau und bei Werten <2 % hellgrau kodiert. Die schwarzen Linien stellen die Grenzwerte bei jeweils 2 % oie und Parasitämie dar.



Der größte Anteil der PatientInnen (24/31) hatte mit einer Parasitämie $<2\%$ gleichfalls oie-Werte $<2\%$. Die restlichen sieben PatientInnen mit einer Parasitämie $>2\%$ werden im Hinblick auf Pitting-Quote und Verlauf detaillierter betrachtet. Die mediane Pitting-Quote dieser PatientInnen lag bei 74% (22;96). Es fand sich kein Zusammenhang zwischen Alter und Pitting-Quote ($R^2=0,20$; $p=0,32$). Die mediane Pitting-Quote im Therapie-Vergleich lag in der Behandlungsgruppe mit AL ($n=6/7$) bei 52% (21;101) und mit Fospip ($n=1/7$) bei 82% (p -Wert= $0,62$). Drei PatientInnen hatten bei einer Parasitämie von $>2\%$ verhältnismäßig geringe Pitting Quoten mit oie-Werten $<2\%$ an T3. Alle diese PatientInnen hatten eine Therapie mit AL erhalten, zeigten negative Hämolysezeichen an T14 und waren 3, 8 und 10 Jahre alt, davon waren zwei weiblich und einer männlich (Abbildung 3-8).

Die übrigen vier PatientInnen hatten mit einer Parasitämie $>2\%$ auch oie-werte von $>2\%$ an T3. Alle vier PatientInnen zeigten im Verlauf nach Therapie kontinuierlich ansteigende Hb-Verläufe bis zur letzten Verlaufskontrolle (Abbildung 3-9). Eine 3-jährige Patientin dieser Gruppe hatte positive Hämolyseparameter an T14. Die initiale Parasitämie lag bei $87.210/\mu\text{L}$ ($2,49\%$) und der oie-Wert an T3 bei $2,4\%$ resultierend in einer Pitting-Quote von 96% . Die Patientin wurde mit AL behandelt. Der LDH-Wert an T14 lag bei 406 U/L , und sank an T28 auf 277 U/L (Abbildung 3-9-A). Einer der vier PatientInnen wurde mit Fospip therapiert, war 2 Jahre alt und präsentierte eine initiale Parasitämie von $105.070/\mu\text{L}$ ($2,92\%$) und $2,41\%$ oie-Anteil an T3 resultierend in einer Pitting Quote von 83% . An T14 war der Haptoglobinwert mit $0,29\text{ g/L}$ grenzwertig erniedrigt mit einem normwertigen LDH-Wert von 312 U/L . An T28 lag der LDH-Wert bei 534 U/L bei gleichzeitig erhöhtem Haptoglobin. Die Erhöhung des LDH-Wertes ist am ehesten im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu sehen, eine Hb-relevante Hämolyse zeigte sich nicht. Der oie Abbau fand hauptsächlich zwischen T3-7 statt und die Hb-Werte stiegen von $9,7\text{ g/dL}$ auf $11,2\text{ g/dL}$ an. (Abbildung 3-9-B). Eine 10-jährige Patientin mit einer Parasitämie von $229.492/\mu\text{L}$ ($5,21\%$) und einem oie-Wert von $3,9\%$ (Pitting Quote 75%) präsentierte initial einen Hb-Wert von $10,5\text{ g/dL}$. Dieser sank am dritten Tag auf $8,5\text{ g/dL}$ und stieg im Verlauf wieder kontinuierlich an. Die LDH war an T14 im Normbereich. Die Patientin präsentierte an T28 eine Reinfektion (Abbildung 3-9-C). Eine 3-jährige Patientin mit der höchsten Parasitämie der Studienpopulation ($325.000/\mu\text{L}$; $9,03\%$), präsentierte auch den höchsten oie-Wert ($10,23\%$) mit einer Pitting Quote von 113% . Sie wurde mit AL therapiert. Der oie-Verlauf ist gesondert in Abbildung 3-10 dargestellt. Sie überschritt

als einzige den vorpublizierten oie-Schwellenwert an T3. Mit einem Ausgangshämoglobin von 9,1 g/dL sank der Hb-Wert an T3 auf 7,0 g/dL. Nach Therapie zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Hb-Wertes bis zu einem Wert von 10,7 g/dL an T28. Der Retikulozytenwert stieg an T14 auf 8,7 % an (Abbildung 3-9-D). Die Hämolyseparameter an T14 zeigten eine normwertige LDH und ein negatives Haptoglobin mit normwertigem CRP.

Abbildung 3-8: Einzelkurven der PatientInnen >2 % Parasitämie mit Pitting Werten <2 %; x: Parasitämie

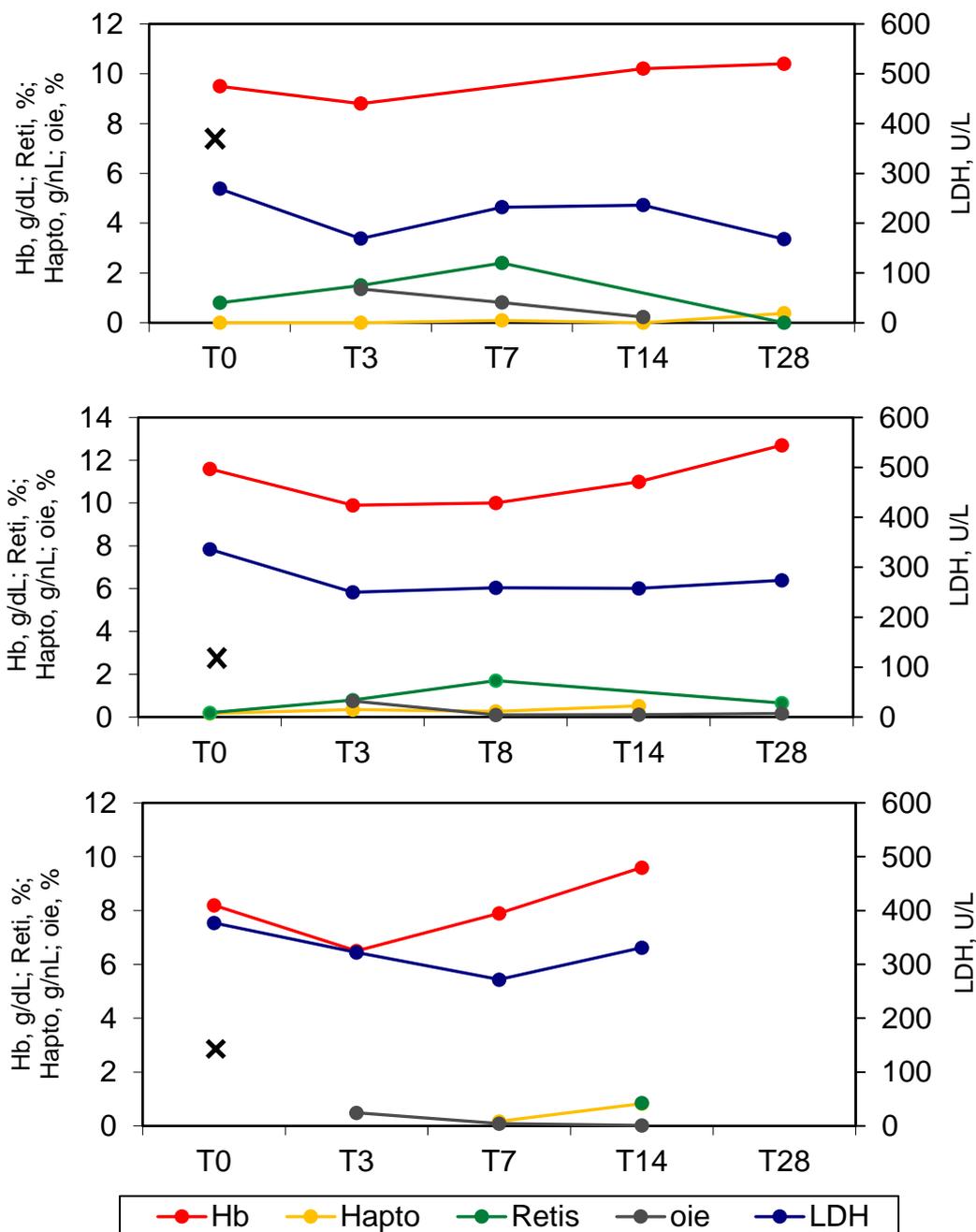


Abbildung 3-9: Verlaufskurve der PatientInnen A-D mit Hämolyseparametern und Hämoglobinverläufen dargestellt; x: Parasitämie; „ie“: infected erythrocytes

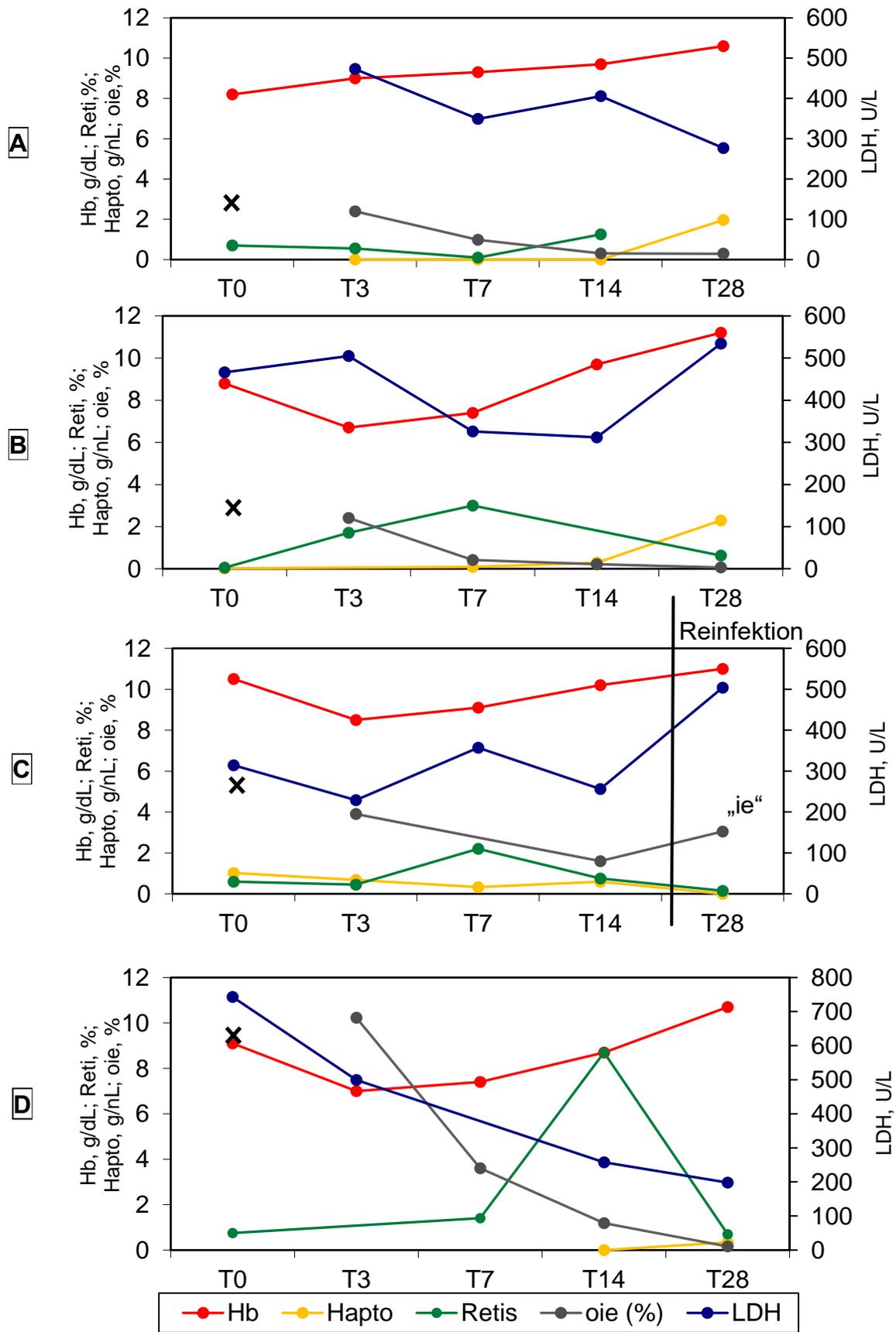
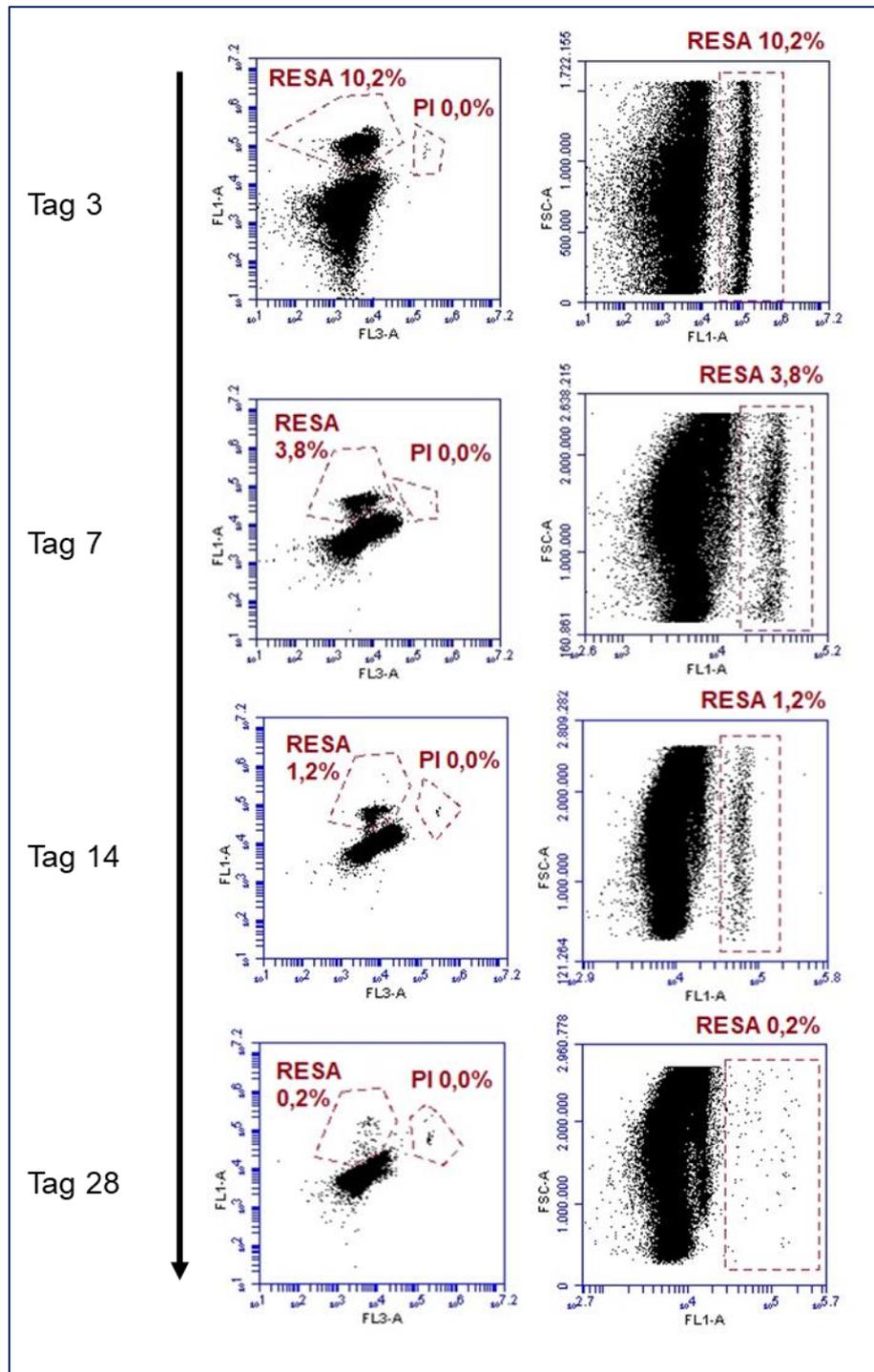


Abbildung 3-10: Durchflusszytometrie Messung zur Quantifizierung von RESA (FL1) und PI (FL3)-positiven Zellen beispielhaft an einer Patientin mit initial hoher Parasitämie im Verlauf von T3 bis 28 (vgl. Abbildung 3-9-D)



Die PatientInnen mit einer Parasitämie $>2\%$ hatten am Screeningtag einen medianen Hb-Wert von 9,1 g/dL (8,2-11,6). Die Tabelle 3-6 zeigt die unterschiedlichen Hb-Veränderungen zwischen PatientInnen mit hoher Parasitendichte ($\geq 2\%$) und niedriger Parasitendichte ($<2\%$). Die höher parasitäre Gruppe hatte einen signifikant höheren

Hb-Verlust während der Therapie (T0-3). Im Verlauf jedoch signifikant höhere Anstiege des Hbs, sowohl in der ersten (T7-14) als auch zweiten Woche (T14-28) nach Behandlung.

Tabelle 3-6: Mediane der individuellen Hämoglobinveränderungen zwischen den einzelnen Studientagen im Vergleich zwischen PatientInnen mit einer Parasitämie $\geq 2\%$ und $< 2\%$

Δ Hb (g/dL) Median (Bereich)	$\geq 2\%$ Parasitämie n=7	$< 2\%$ Parasitämie n=72	p-Wert
T0-3	-1,7 (-2,1 – 0,8) n=7	-0,0 (-2,9 – 2,0) n=63	0,01*
T3-14	1,7 (0,7 – 3,1) n=7	1,1 (-0,8 - 3,9) n=57	0,13
T3-7	0,5 (0,1 - 1,4) n=6	0,5 (-0,8 - 2,5) n=58	0,96
T7-14	1,2 (0,4 - 2,3) n=6	0,5 (-2,0 – 3,5) n=59	0,03*
T0-14	0,7 (-0,6 - 1,5) n=7	1,0 (-1,5 – 3,5) n=63	0,08
T14-28	1,4 (0,2 - 2,0) n=6	0,3 (-3,3 – 3,3) n=51	0,03*
T0-28	1,4 (0,9 – 2,4) n=6	1,7 (-1,2 – 4,0) n=51	0,97

3.4.3 Kinetik der ehemals-infizierten Erythrozyten

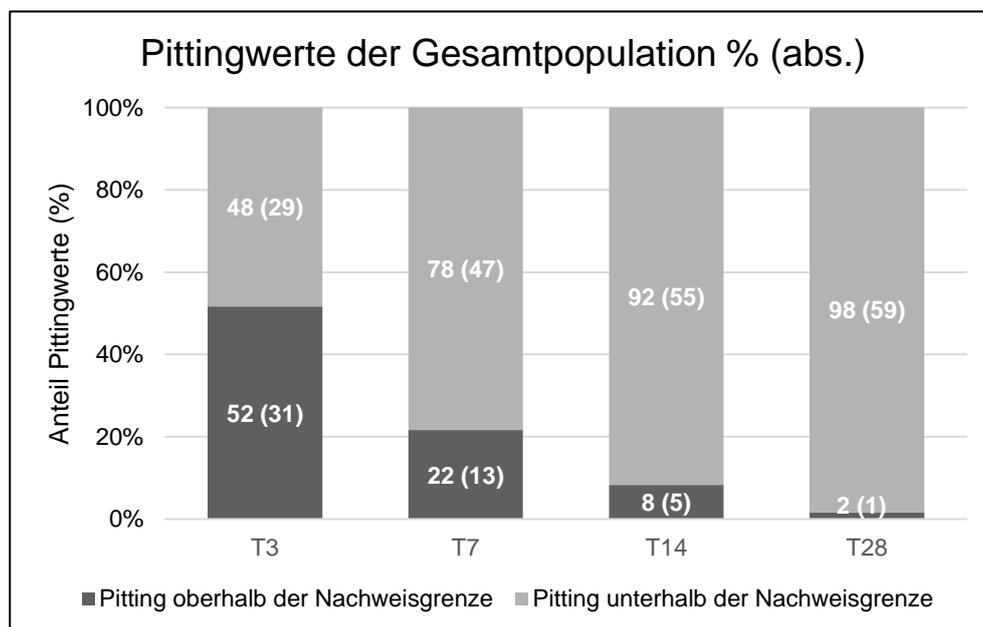
Die Abnahme der oie-Werte bei den sieben PatientInnen mit einer Parasitämie $\geq 2\%$ war zwischen T3-7 tendenziell höher als zwischen T7-14. Der mediane Anstieg der Hb-Werte war in den ersten Tagen nach Therapie (T3-7) dahingegen geringer als in der zweiten Woche nach Therapie (T7-14) (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Verläufe der oie- und Hb-Werte der PatientInnen $> 2\%$ Parasitämie zwischen T3-14 im Median (Bereich)

	Delta oie (/pL)	Delta Hb (g/dL)
T3-14	-0,07 (-0,2 bis -0,01) n=6	1,7 (0,7 bis 3,1) n=7
T3-7	-0,05 (-0,2 bis 0,02) n=5	0,5 (0,1 bis 1,4) n=6
T7-14	-0,03 (-0,06 bis 0,0) n=5	1,2 (0,4 bis 2,3) n=6

In der Gesamtpopulation fand sich prozentual gesehen ebenfalls eine deutlichere Abnahme der oie zwischen T3-7 als zwischen T7-14. In Abbildung 3-11 ist der Anteil der Pittingwerte ober- und unterhalb der Nachweisgrenze aufgeführt. An T3 waren 52 % (31/60) der Pittingwerte oberhalb der Nachweisgrenze. Der größere Anteil an gepitteten Zellen wurde dann zwischen T3-7 abgebaut. Die Differenz der Anteile an Pittingwerten oberhalb der Nachweisgrenze betrug zwischen T3-7 (Woche 1) 30 %-Punkte und zwischen T7-14 (Woche 2) 14 %-Punkte.

Abbildung 3-11: Anteil der 60 PatientInnen mit vorhandenen Pittingwerten zu allen Zeitpunkten jeweils ober- und unterhalb der Nachweisgrenze im Verlauf



3.5 MÖGLICHE EINFLUSSFAKTOREN AUF HÄMOLYSE

Die vorbeschriebenen Risikofaktoren wie das Geschlecht, die Therapieform und der Wirkstoff, Alter, prätherapeutischer Hb-Wert und die Anzahl der gepitteten Zellen für das Auftreten einer Hämolyse konnten in unserer Studienpopulation nicht bestätigt werden. Keines der genannten Faktoren hatte einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer verzögerten Hämolyse nach Therapie.

Tabelle 3-8: Potenzielle Risikofaktoren für Hämolyse

	Vergleichsgruppe (n= 63)	Hämolysegruppe (n=6)	Odds-Ratio (KI 95 %)
Geschlecht männlich abs. (%)	35 (56)	3 (50)	0,8 (0,1-4,3)*
Therapie AL abs. (%)	51 (93)	4 (66)	0,5 (0,1-2,9)**
			p-Wert
Alter (Jahren) †	6 (4;11)	7 (4;22)	0,85
Parasitendichte initial (/µL) geo. Ø (KI 95 %)	4449 (247-80.303) n=59	5239 (178-154.013) n=6	0,72
Hb prätherapeutisch (g/dL) ‡	9,1 (6,1-13,3) n=61	9,0 (7,8-11,5) n=6	0,84
OIE an T3 (%) ‡	0,0 (0,0-10,23) n=46	0,3 (0,0-2,4) n=4	0,29
OIE an T3 (/pL) ‡	0,0 (0,0-0,29) n=46	0,02 (0,0-0,09) n=4	0,37

† Median (IQB), ‡ Median (Bereich), *Odds für das Auftreten von Hämolyse für das männliche zu weibliche Geschlecht, **Odds für das Auftreten von Hämolyse für die Therapie mit AL zu Fospip

4 DISKUSSION

Hämolyse ohne Hb-Verlust

In unserer Studienpopulation hatten 9 % der PatientInnen mit unkomplizierter Malaria nach oraler Behandlung positive Laborparameter im Sinne einer verzögerten Hämolyse an T14.

Seit 2011 wurde in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika wiederholt von Fällen mit verzögerter Hämolyse nach intravenöser Artesunatgabe berichtet. Diese traten bei 19-24 % der PatientInnen mit schwerer Malaria auf [1,4,90,91]. In Malaria-Endemiegebieten sind schwere Verläufe verzögerter hämolytischer Reaktionen deutlich seltener beschrieben worden. Vereinzelt wurden in Hochendemiegebieten jedoch vor allem bei Kindern mit schwerer Malaria sehr starke Hb-Abfälle auf bis zu 2,8-4,0 g/dL durch verzögerte Hämolyse nach intravenöser Artesunat-Therapie berichtet. Diese mussten zum Teil mit Bluttransfusionen kompensiert werden [4,91].

Nach oraler ACT bei unkomplizierter Malaria traten in einer europäischen Studie bei 40 % der ReiserückkehrerInnen verzögerte Hämolysen auf [9]. Hb-Abfälle ab T7 nach Beginn einer Malaria-Therapie wurden bei etwa 6-9 % der PatientInnen mit unkomplizierter Malaria in Sub-Sahara Afrika beobachtet, in den entsprechenden Studien wurden allerdings keine Hämolyseparameter untersucht [6,7,11]. Der Anteil der PatientInnen mit Hb-Abfall in diesen vorpublizierten Studien entspricht in etwa dem Anteil der PatientInnen mit verzögerter Hämolyse an T14 in unserer Studie. Unsere PatientInnen zeigten jedoch trotz verzögerter Hämolyse keinerlei Hb-Abfälle nach Therapie, entweder bedingt durch einen geringeren Verlust von Erythrozyten oder eine kompensatorisch gesteigerte Erythropoese.

Eine Kompensation des Hb-Verlustes durch verzögerte Hämolyse nach Malaria wurde bereits in einer europäischen Studie zu unkomplizierter Malaria und ACT beobachtet. Hier zeigten allerdings nur PatientInnen mit afrikanischem Hintergrund eine suffiziente Kompensation des Hb-Verlustes durch gesteigerte Erythropoese, wohingegen es bei kaukasischen PatientInnen nicht zur Kompensation des durch Hämolyse verursachten Hb-Verlustes kam [9]. Die Anzahl der ProbandInnen mit afrikanischem Hintergrund sowie die Gesamtzahl der PatientInnen in dieser Studie war jedoch klein (n=13/20). Außerdem wurde der Status der Semi-Immunität (letzte bekannte Malaria-Infektion, letzter Langzeit-

Aufenthalt in Endemiegebiet etc.) nicht weiter untersucht. Dennoch ergab sich die Hypothese, dass Semi-Immunität das Auftreten einer verzögerten Hämolyse und den resultierenden Hb-Verlauf beeinflusst und damit den fehlenden Hb-Abfall unserer Studienpopulation erklären würde. Interessanterweise konnte in unserer Studie kein Unterschied in der Höhe der Retikulozyten bei PatientInnen mit und ohne verzögerter Hämolyse detektiert werden. Ein möglicher Grund hierfür könnten Messungenauigkeiten im Rahmen der manuellen Retikulozyten-Auszählung sein. Des Weiteren ist bei niedrigen Parasitendichten von einem verhältnismäßig geringen Verlust der Erythrozyten auszugehen, der keinen gesteigerten Kompensationsmechanismus bedarf. Lediglich eine Patientin (Abbildung 3-9-D) zeigte einen ausgeprägten Retikulozytenanstieg auf 8,7 % an T14, bei allerdings negativen Hämolysezeichen. Die Patientin präsentierte auch die höchste initiale Parasitämie mit 9 % und einen vergleichsweise starken Hb-Abfall während Therapie (-2,1 g/dl T0-T3), wodurch die entsprechend hohe reaktive Retikulozytenantwort mutmaßlich getriggert wurde. Die fehlenden Retikulozytenanstiege könnten also auf die insgesamt in unserer Studienpopulation eher gering ausfallende Parasitenlast zurückzuführen sein. Im Median war diese deutlich niedriger als in der vorbeschriebenen europäischen Studie mit Fällen von kompensierter verzögerter Hämolyse (0,09 % vs. 0,4 %) [9].

Pitting

Von den vorliegenden validen oie-Messungen lagen 48 % der Werte an T3 unterhalb der Nachweisgrenze. Die 31 PatientInnen mit messbaren oie an T3 hatten mit einem medianen oie-Anteil von 0,39 % vergleichsweise geringe Werte, wie für unkomplizierte Malaria mit niedriger initialer Parasitämie zu erwarten war. 13 % der PatientInnen (n=4/31) mit messbaren oie an T3 präsentierten Werte >2 %. Bisher beschriebene Pitting Quoten nach intravenöser ACT bei Reiserückkehrern betragen im Median 78 % [5]. Bei afrikanischen Kindern in Malaria-Endemiegebieten wurden Unterschiede in der Pitting-Quote abhängig vom Alter beschrieben, mit höheren Werten bei jüngeren Kindern (<5 Jahren 92 %) und niedrigeren Werten bei älteren Kindern (9-13-Jährigen 32 %) [71]. Generell zeigten PatientInnen in Endemiegebieten in der Regel geringere Pitting Quoten als Reiserückkehrer [7]. Unsere Studienpopulation mit einem medianen Alter von 3 Jahren zeigte passend dazu im Median eine Pitting Quote von 74 %.

Eine Analyse des zeitlichen oie-Verlaufs wies auf, dass der größere Anteil der oie in unserer Population innerhalb der ersten Woche nach Infektion abgebaut wird (Abbildung

3-11). Hier betrug die Differenz der Anteile an Pittingwerten oberhalb der Nachweisgrenze in der ersten Woche (T3-7) 30 %-Punkte und in der zweiten Woche (T7-14) 14 %-Punkte. Vorbeschriebene Hb-Verläufe von schwerer Malaria beschrieben vor allem verzögerte Hämolysen nach T7, somit wäre der größere oie-Abfall in der zweiten Woche oder später zu erwarten. Hb-Abfälle in der ersten Woche nach Therapie wurden im Rahmen von „persistierenden oder aufsteigenden Verläufen“ beschrieben, entweder mit bzw. ohne Hämolyseparametern vor T8 [5]. PatientInnen dieser frühzeitigeren Abfälle hatten geringere Parasitämien als PatientInnen mit PADH (Anteil der PatientInnen mit Parasitämie >4 % bei aufsteigendem Hb-Verlauf 37 %, persistierendem Hb-Verlauf 50 % vs. 92 % PADH, $p=0,006$) [5]. Eine mögliche Erklärung für den frühzeitigeren oie-Abfall in unserer Population wäre, dass es bei unkomplizierter Malaria durch eine geringere Parasitendichte rascher zu einer kompletten Parasiten Clearance kommt, somit rascher zur Ausbildung von oie. Der oie Peak sowie der Abbau werden möglicherweise früher erreicht als bei schwerer Malaria mit höheren Parasitämien und einem späterem Abfall der oie.

Aktuell wird „Pitting“ und der damit einhergehende oie-Zerfall als Hauptgrund für eine verzögerte Hämolyse angenommen. Eine Pittingschwelle von 0,18/pL oie wurde bei Reiserückkehrern mit schwerer Malaria, als Prädiktor mit 89% Sensitivität und 83% Spezifität für das Auftreten einer verzögerten Hämolyse nach Artemisinin-Therapie vorbeschrieben [5]. In unserer Population wurde diese Schwelle von einer dreijährigen Patientin überschritten (0,29/pL; Abbildung 3-6, Abbildung 3-9-D, Abbildung 3-10), die allerdings keine nachweisbare Hämolyse an T14 entwickelte. Bei frühzeitigem Abbau der oie zwischen T3 und T7 könnte bei dieser Patientin jedoch eine Hämolyse bereits an T7 stattgefunden haben. Da der LDH-Wert an T7 fehlt, kann eine Hämolyse nicht sicher ausgeschlossen werden. Insgesamt ist trotz oie-Abbau sowohl bei der Patientin mit oie-Werten oberhalb der Pittingschwelle sowie bei den übrigen PatientInnen kein Hb-Verlust zu beobachten. Die Pittingschwelle scheint demnach vor allem bei Nichtimmunen (Reisende) mit schwerer Malaria nach intravenöser Artesunatgabe von Bedeutung zu sein [5].

Bisherige Studien zeigten deutlich höhere Pitting Quoten nach ACT im Vergleich zu Quinin oder anderen Nicht-Artemisinin Präparaten [5,7,92]. Eine signifikant höhere Pitting Quote in der Behandlungsgruppe AL im Vergleich zu Fospip konnte nicht gesehen

werden. Die Aussagekraft ist jedoch eingeschränkt bei nur 5 PatientInnen, die mit Fospip behandelt wurden und an T3 oie-Werte oberhalb der Nachweisgrenze vorwiesen.

Alternative Mechanismen zum Pitting

Mit zunehmender Immunität gewinnen Pitting-unabhängige Mechanismen bei der Elimination der Parasiten aus dem Blut an Bedeutung, auch wenn aufgrund der Komplexität der immunologischen Mechanismen bisher noch viele Zusammenhänge unvollständig verstanden sind. So zeigte eine Studie, dass die Höhe der Ausprägung von Malaria-spezifischen IgG als Zeichen einer Semi-Immunität in negativer Korrelation zu den Pitting-Quoten stand [71]. Somit lag die Pitting Quote bei Kindern zwischen 9-13 Jahren lediglich bei 32 % (vs. 92% bei Kindern zwischen 1,5-4 Jahren), eine deutlich geringere Menge rezirkulierender oie als bei der initialen Parasitämie zu erwarten gewesen wäre. In unserer Population konnte keine signifikante Korrelation zwischen Alter und der Pitting Quote gesehen werden. Dies könnte aber auch an den zugrunde liegenden relativ niedrigen Parasitendichten und damit einhergehenden niedrigen oie-Werten liegen.

In der oben zitierten Studie wurde bei Nicht-Immunen die Zeit bis zur Ausbildung der maximalen oie-Werte gemessen und eine Latenzphase von 6 Stunden nach Therapiebeginn festgestellt [71]. Bei Semi-Immunen hingegen erfolgte die Parasitenclearance wesentlich schneller ohne Latenzphase und dafür wesentlich geringeren oie-Werten. In einer anderen Veröffentlichung zeigte sich in einem *ex vivo* Modell, dass in der Milz neben dem Pittingprozess ein höherer Anteil der infizierten Erythrozyten durch eine vermehrte Makrophagenaktivität eliminiert wurden [93]. Dieser Phagozytose Abbau könnte bei Semi-Immunen vielleicht vermehrt zur zügigen Eliminierung von infizierten Erythrozyten führen, als oies ausgebildet werden.

Ein weiterer Mechanismus ist eine Antikörper-vermittelte Monozytenaktivierung bei Semi-Immunen, die sowohl zur direkten Phagozytose von Merozoiten führt, als auch zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und weiteren Mediatoren zur Eliminierung der infizierten Erythrozyten. Hier sind spezifische IgG der Gruppe 1 und 3 gegen die Merozoiten Oberflächenproteine (Merozoite surface protein – MSP) gerichtet. Bei einer Antikörperbindung an infizierte Erythrozyten kommt es folglich zur direkten Phagozytose der Zellen, sodass der Abbau durch die Milz umgangen wird und folglich auch zur geringeren Ausbildung von oie führt [94]. Eine serologische Quantifizierung

dieser MSP2 und -3 spezifischen Antikörper in der Kombination mit Pitting Daten bei Semi-Immunen und Nicht-Immunen könnte weiter Aufschluss geben, in welchem Ausmaß dieser Mechanismus vor allem bei Semi-Immunen zur Parasiten Clearance beiträgt.

Eine weitere Überlegung wäre der Einfluss der Medikamentenapplikation auf die Ausprägung von oie. Nach intravenöser Applikation besteht eine schnellere und höhere Artemisinin Konzentration im Plasma als nach oraler Aufnahme. Die leicht verzögerte Wirkung und geringere Konzentration nach oraler Applikation könnte zu einer unterschiedlichen Abtötung der Plasmodien im Blut mit einer konsekutiv geringeren Menge an oie führen [95]. Da der zeitliche Unterschied bis zur maximalen Konzentration im Plasma zwischen oralem und intravenösem Applikationsweg jedoch nur Minuten bis wenige Stunden beträgt (2 min. vs. 75 min.), ist bei den PatientInnen unserer Studienpopulation mit oraler Behandlung und unkomplizierter Malaria eher die niedrige Parasitämie der ausschlaggebende Faktor für geringere Pitting Raten.

Bei Nicht-Immunen nach schwerer Malaria wurden im Rahmen einer verzögerten Hämolyse häufig große Hb-Abfälle verzeichnet. Diese überstiegen zum Teil den erwarteten Hb-Abfall durch den Abbau von oie deutlich bzw. waren quantitativ nicht allein durch den vorzeitigen Abbau von oie erklärbar. In einer Studie mit Reiserückkehrern bei schwerer Malaria und intravenöser Therapie wäre bei einer medianen initialen Parasitendichte von 8 % und einer medianen Pitting Quote von 78 % an T3 theoretisch ein Hb-Verlust durch reinen oie-Zerfall von etwa 6 % zu erwarten. Ein oie-Wert von 6 % würde einer ehemals-infizierten Erythrozytenzahl von ca. 300.000/ μ L entsprechen, diese Anzahl wiederum etwa einem Hb-Wert von 0,9 g/dL (ca. 6 % des initialen Hb-Wertes). Dieser Wert wurde bei den PatientInnen mit PADH mit einem Hb-Verlust von 16 % zwischen T0-T4 und einem weiteren Abfall von 12 % zwischen T5-T14 jedoch deutlich überstiegen [5]. Dies legt die Hypothese nahe, dass es im Rahmen von verzögerter Hämolyse nach Therapie zusätzlich zum Verlust von nicht-infizierten Erythrozyten kommt. Insgesamt ist bekannt, dass es bei PatientInnen mit Malaria zu einem erheblichen Verlust auch nicht-infizierter Erythrozyten kommt. In einer Studie zu unkomplizierter Malaria mit *Pf*-Infektion bei Semi-Immunen in Thailand konnte gezeigt werden, dass von dem Gesamtverlust an Hämatokrit bis einschließlich sieben Tage nach Malariatherapie lediglich 7,9 % auf die Elimination von infizierten Erythrozyten zurückzuführen war, somit hauptsächlich nicht-infizierte Erythrozyten zum Hb-Verlust beigetragen haben [96].

Bisher gibt es verschiedene mögliche Erklärungen in der Literatur für diesen vermehrten Verlust von infizierten wie auch nicht-infizierten Erythrozyten: Bei infizierten Erythrozyten bewirkt das intrazelluläre Parasitenwachstum eine Veränderung des Zellvolumens, sowie eine reduzierte Verformbarkeit durch Einlagerung parasitärer Plasmaproteine in die Zellmembran [97]. Bei nicht-infizierten Erythrozyten wurde unter anderem ein oxidativer Zellschaden der zuvor intakten Membran durch Hämatin, einem Malaria-induzierten Beiprodukt, beschrieben. Die durch die Metabolisierung entstandenen Abbauprodukte werden bei Ruptur der Erythrozyten und Ausscheidung der Schizonten ins Blut freigesetzt und können somit auch nicht-infizierte Erythrozyten befallen und zur Destabilisierung der Zellwand führen [98]. Durch die reduzierte Stressresistenz sowohl der infizierten als auch nicht-infizierten Zellen kommt es zu einem frühzeitigen Abbau in der Milz. Des Weiteren führen Komplement-vermittelte Reaktionen zur Opsonierung und folglich zum Abbau von nicht-infizierten Erythrozyten [99]. Eine Rolle scheint hierbei der Komplement Rezeptor 1 (CR1) zu spielen, der u.a. auf Erythrozyten exprimiert wird und eine Komplementaktivierung regulieren oder unterbinden kann. Eine geringere Expression von CR1 war mit einer erhöhten Komplementaktivierung assoziiert, die vor allem bei PatientInnen mit schwerer Anämie im Rahmen einer komplizierten Malaria eine erhöhte Phagozytose auch von nicht-infizierten Erythrozyten bewirkte [100]. Der Mechanismus wurde zwar vor allem bei schwerer Malaria beschrieben, gibt jedoch des Weiteren Aufschluss über alternative Abbauewege von nicht unmittelbar besiedelten Zellen. Alternativ wird die Übertragung von sogenannten Mikrovesikeln mit Plasmodien Antigenen auf nicht-infizierte Erythrozyten in der Literatur diskutiert. Diese Vesikel werden möglicherweise zur Kommunikation zwischen infizierten Erythrozyten genutzt und von diesen freigesetzt. Umliegende infizierte Erythrozyten internalisieren diese Vesikel, wodurch die Weiterentwicklung der intrazellulären Parasiten stimuliert wird [101]. Hierbei könnte es jedoch auch zur Übertragung von Vesikeln und damit von Plasmodien-Antigenen auf nicht-infizierte Zellen kommen, wodurch z.B. ein durch Monozyten-Aktivierung verursachter Untergang dieser nicht-infizierter Erythrozyten entstehen könnte. Da unsere ProbandInnen relativ geringe Parasitämien, geringe Anteile von oie nach Therapie und keine Hb-Verluste vorweisen, scheinen diese Mechanismen allerdings eher im Kontext von schwerer bzw. hyperparasitärer Malaria relevant zu sein.

Therapie

PatientInnen, die mit AL und Fospip behandelt wurden, zeigten keine signifikanten

Unterschiede bezüglich des Auftretens einer verzögerten Hämolyse. Prozentual gab es eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu mehr Hämolyse Ereignissen in der Fospip Population, obwohl bisher vor allem ART-behandelte PatientInnen mit verzögerten Hämolyse Ereignissen in Verbindung gesetzt wurden [72]. Allerdings ist die Aussagekraft bezüglich der Therapiegruppen beschränkt, da Unterschiede in den Populationen bzgl. Gruppengröße, Alter, Parasitendichte und Hb-/Erythrozyten-/Hämatokritwert bestanden. Hier war die Population mit Fospip sowohl jünger als auch höherparasitäm, zwei vorbeschriebene Risikofaktoren für das Auftreten einer verzögerten Hämolyse. Beide Therapiegruppen zeigten kontinuierliche Anstiege der Hb-Werte. Jedoch kompensierten die PatientInnen unter Fospip Behandlung ihre niedrigeren Ausgangswerte im Vergleich zur Population nach AL-Behandlung schneller mit tendenziell höheren Retikulozytenwerten. Diese waren aber nicht signifikant unterschiedlich. Eine Beeinträchtigung der Erythropoese durch Artemisinine wurde durch experimentelle Daten vorbeschrieben. Sie bilden durch die Bindung an Eisenionen freie Radikale aus und schädigen dadurch die Zellen. Vor allem junge Retikulozyten mit einem hohen Anteil an Eisen sind davon betroffen, sodass die langsamere Kompensation in der AL-Gruppe möglicherweise auf eine im Vergleich zur Artemisinin-freien Therapie verminderte Retikulozytenproduktion zurückgeführt werden kann [102]. Zusammenfassend kann man festhalten, dass das Auftreten von verzögerter Hämolyse bei PatientInnen nach ACT nicht signifikant häufiger war als nach Nicht-ACT (Pitting Quote der Behandlungsgruppe AL 52 % vs. Fospip 82 %, $p=0,62$).

Haptoglobin

Insgesamt hatten 7% (5/69) unserer PatientInnen durchgehend negative Haptoglobinwerte bis einschließlich T28, wobei valide Messwerte nur an jeweils 2-4/5 Studienzeitpunkten vorlagen. Im Vergleich zu vorbeschriebenen Prävalenzraten von HpO fiel der Anteil in unserer Studie gering aus (4,9 % in Mali [78] und 48 % in Kongo [76]).

Bisher wurde die Normalisierung der Werte bei Malaria-induzierter HpO etwa zwei bis vier Wochen nach Therapie beschrieben, sodass bei den fünf PatientInnen mit negativen Haptoglobinwerten an T28 der Verdacht einer genetisch bedingten HpO besteht [76,78]. Einer dieser PatientInnen präsentierte zudem eine erhöhte LDH an T14, hatte aber konstant ansteigende Hb-Werte und keine weiteren Komplikationen. Es fanden keine genetischen Tests bezüglich der vorbeschriebenen HpO Varianten statt [80]. Auch wenn das Bestehen einer HpO als Risikofaktor für das Auftreten einer schweren Malaria-

induzierten Anämie beschrieben wurde, scheint es in unserer Population keine klinische Relevanz zu haben [80].

Bei afrikanischen Populationen wurden Haptoglobin Phänotypen beschrieben, bei denen eine niedrigere untere Grenze des Normbereichs im Vergleich zu Kaukasiern besteht [103]. Aufgrund der Variabilität von Haptoglobin Typen vor allem in afrikanischen Populationen wäre Hämopexin eine geeignete stabilere Alternative zur besseren Vergleichbarkeit mit unterschiedlichen Populationen [103].

Limitationen

Insgesamt waren die meisten PatientInnen mit unkomplizierter Malaria in unserer Studie auch niedrig-parasitäm, sodass konsekutiv geringe oie-Werte vorlagen. Um einen besseren Vergleich zwischen hohen und niedrig-parasitämen PatientInnen zu erhalten und Faktoren wie den zeitlichen Verlauf von oie *in vivo* genauer beurteilen zu können, wäre die zusätzliche Rekrutierung von PatientInnen mit höherer Parasitämie notwendig gewesen. Ziel unsere Studie war jedoch primär die Untersuchung des Phänomens verzögerter Hämolyse in einem unselektierten Patientengut mit unkomplizierter Malaria in einem Endemiegebiet.

Der Vergleich von PatientInnen nach AL bzw. Fospip Therapie war eingeschränkt, da die Therapiegruppen nicht randomisiert waren. Die Gruppengrößen divergierten und die Baseline Kenndaten der PatientInnen in den einzelnen Behandlungsgruppen waren aufgrund unterschiedlicher Einschlusskriterien teilweise signifikant unterschiedlich. ACTs sind derzeit zweifelsfrei die beste Behandlungsoption für unkomplizierte Malaria und in allen Endemiegebieten empfohlen. Die vorliegende Studie hatte explorativen Charakter, auf ein randomisiertes Studiendesign mit Nicht-ACT Behandlungsarm wurde daher bewusst verzichtet. Für eine aussagekräftigere Untersuchung der Unterschiede zwischen Fospip und ACTs wäre eine randomisierte Studie mit gleichmäßig großen Gruppen und gleichen Baseline Eigenschaften erforderlich. Insgesamt ergibt sich jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse kein Anhalt für ein erhöhtes Auftreten von verzögerten Hämolyse nach ACT im Vergleich zu non-ACT in dieser Population.

Die Analysen erfolgten unter Einbeziehung des relativen Retikulozytenwertes, es wurde jedoch auch der Retikulozytenproduktionsindex zur Bestimmung der tatsächlichen Nachproduktionsrate bestimmt. Insgesamt war die Erythropoese bei dem Großteil der Studienpopulation mit Anämie nicht adäquat. Lediglich eine Patientin mit der höchsten

Parasitämie von 9 % zeigte auch eine adäquate Reaktion der Erythropoese mit einem Retikulozytenproduktionsindex von $>2,6$ %. Jedoch wurden die Retikulozyten aufgrund der technisch eingeschränkten Bedingungen manuell ausgezählt, sodass die Ergebnisse im Vergleich zu einer maschinellen Auszählung sicher weniger exakt sind.

Im Protokoll wurden hämolytisch wirksame Faktoren wie Mangel an G6PD (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase), Sichelzellanämie und weitere Medikamente als Ausschlusskriterium festgelegt. Diese wurden anamnestisch erfragt, jedoch erfolgten keine Laborverfahren zur gesicherten Diagnose.

4.1 SCHLUSSFOLGERUNG

Unsere Studie zeigt mit einer sehr sensitiven Definition von Hämolyse, dass bei unkomplizierter Malaria nach oraler Therapie bei PatientInnen in einem Malaria-Endemiegebiet zu ca. 9% verzögerte Hämolysen auftraten, diese jedoch zu keinen klinisch relevanten Hb-Veränderungen führten. Auch bei PatientInnen mit höheren oie-Werten fanden keine nennenswerten Hb-Abfälle statt, sodass die bestehende Hypothese, dass der Abbau von oie notwendigerweise zu Hämolyse und Hb Verlust führt, nicht ohne Weiteres auf PatientInnen in Endemiegebieten und auf unkomplizierte Malaria nach oraler Therapie anwendbar zu sein scheint.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Raffray L, Receveur M-C, Beguet M, Lauroua P, Pistone T, Malvy D. Severe delayed autoimmune haemolytic anaemia following artesunate administration in severe malaria: a case report. *Malar J.* 11. Oktober 2014;13(1):398.
2. Weltgesundheitsorganisation, WHO. Information note on delayed haemolytic anaemia following treatment with artesunate. [Internet]. WHO. [zitiert 21. April 2019]. Verfügbar unter: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_note_haemolytic_anaemia/en/
3. Rehman K, Lötsch F, Kremsner PG, Ramharter M. Haemolysis associated with the treatment of malaria with artemisinin derivatives : a systematic review of current evidence. *Int J Infect Dis.* 2014;29:268–73.
4. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnikaa AA, Sylverken J, Spahlinger D, Ansong D, Löhr SJZ, Burchard GD, May J, Mordmüller B, Krishna S, Kremsner PG, Cramer JP. Delayed Hemolysis After Treatment With Parenteral Artesunate in African Children With Severe Malaria — A Double-center Prospective Study. *J Infect Dis.* 2014;209:1921–8.
5. Jauréguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, Biligui S, Ciceron L, Mouri O, Kendjo E, Bricaire F, Vray M, Angoulvant A, Mayaux J, Haldar K, Mazier D, Danis M, Caumes E, Thellier M, Buffet P, French Artesunate Working Group. Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood.* 10. Juli 2014;124(2):167–75.
6. Zwang J, Alessandro UD, Ndiaye J, Djimdé AA, Dorsey G. Haemoglobin changes and risk of anaemia following treatment for uncomplicated falciparum malaria in sub-Saharan Africa. *BMC Infect Dis.* 2017;17(443):1–10.
7. Fanello C, Onyamboko M, Lee SJ, Woodrow C, Setaphan S, Chotivanich K, Buffet P, Jauréguiberry S, Rockett K, Stepniewska K, Day NPJ, White NJ, Dondorp AM. Post-treatment haemolysis in African children with hyperparasitaemic falciparum malaria; a randomized comparison of artesunate and quinine. *BMC Infect Dis.* 2017;17(575):1–8.
8. Sowunmi A, Akano K, Ntadom G, Ayede A, Oguche S, Agomo C, Okafor H, Watila I, Meremikwu M, Ogala W, Agomo P, Adowoye E, Fatunmbi B, Aderoyeje T, Happi C, Gbotosho G, Folarin O. Anaemia following Artemisinin-Based Combination Treatments of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in Children : Temporal Patterns of Haematocrit and the Use of Uncomplicated Hyperparasitaemia as a Model for Evaluating Late-Appearing Anaemia. *Chemother Antimicrob Sect.* 2017;62:231–8.
9. Kurth F, Lingscheid T, Steiner F, Stegemann MS, B elard S, Menner N, Pongratz P, Kim J, Bernuth H Von, Mayer B, Damm G, Seehofer D, Salama A, Suttorp N, Zoller T, von Bernuth H, Mayer B, Damm G, Seehofer D, Salama A, Suttorp N, Zoller T. Hemolysis after oral artemisinin combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(8):1381–6.

10. Issifou S, Kendjo E, Missinou MA, Matsiegui PB, Dzeing-Ella A, Dissanami FA, Kombila M, Krishna S, Kremsner PG. Differences in presentation of severe malaria in urban and rural Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* Dezember 2007;77(6):1015–9.
11. Sowunmi A, Fatunmbi B, Akano K, Wewe OA, Agomo C, Finomo F, Ebenebe J, Jiya N, Ambe J, Wammanda R, Ntadom G, Mokuolu O, Emechebe G, Ezeigwe N, Ayede AI, Adewoye EO, Gbotosho GO, Folarin OA, Happi CT, Oguche S, Oyibo WA, Useh F. Factors contributing to anaemia after uncomplicated falciparum malaria in under five year-old Nigerian children ten years following adoption of artemisinin-based combination therapies as first-line antimalarials. *BMC Infect Dis.* 19 2017;17(1):781.
12. Weltgesundheitsorganisation, WHO. World malaria report 2020. [Internet]. [zitiert 23. März 2021]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015791>
13. Zaw MT, Lin Z. Two sympatric types of *Plasmodium ovale* and discrimination by molecular methods. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* Oktober 2017;50(5):559–64.
14. Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. Quotidian-Type Malaria in Man Crown-Gall Tumorigenesis : *Sci Mag.* 1965;
15. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):165–84.
16. Rosenthal PJ, Meshnick SR. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 20. Dezember 1996;83(2):131–9.
17. Esposito A, Tiffert T, Mauritz JMA, Schlachter S, Bannister LH, Kaminski CF, Lew VL. FRET imaging of hemoglobin concentration in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *PloS One.* 2008;3(11):e3780.
18. Butcher GA, Mitchell GH. The role of *Plasmodium knowlesi* in the history of malaria research. *Parasitology.* 2018;145:6–17.
19. Warrell DA. *Essential malariology.* 4. Auflage. London [u.a.]: Arnold; 2002. x+348.
20. Löscher T, Burchard G-D. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: Mit Reise- und Migrationsmedizin.* 4. komplet. Thieme; 2010. 1148 S.
21. Orish V, Afutu L, Ayodele O, Likaj L, Marinkovic A, Sanyaolu A. A 4-Day Incubation Period of *Plasmodium falciparum* Infection in a Nonimmune Patient in Ghana: A Case Report. *Open Forum Infect Dis.* Januar 2019;6(1):ofy169.
22. Shretta R, Liu J, Cotter C, Cohen J, Dolenz C, Makomva K, Newby G, Ménard D, Phillips A, Tatarsky A, Gosling R, Feachem R. Malaria Elimination and Eradication. In: Holmes KK, Bertozzi S, Bloom BR, Jha P, Herausgeber. *Major Infectious Diseases* [Internet]. 3rd Aufl. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017 [zitiert 22. Februar 2019]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525190/>

23. Weltgesundheitsorganisation, WHO. World malaria report 2018. [Internet]. WHO. World Health Organization; [zitiert 3. April 2021]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>
24. Weltgesundheitsorganisation, WHO. Guidelines for malaria. [Internet]. [zitiert 23. März 2021]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-UCN-GMP-2021.01>
25. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, Miller LH, Barillas-Mury C, Pierce SK. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:157–87.
26. Our World in Data - Malaria [Internet]. [zitiert 29. April 2019]. Verfügbar unter: <https://ourworldindata.org/malaria#malaria-prevalence-historically>
27. Gething PW, Casey DC, Weiss DJ, Bisanzio D, Bhatt S, Cameron E, Battle KE, Dalrymple U, Rozier J, Rao PC, Kutz MJ, Barber RM, Huynh C, Shackelford KA, Coates MM, Nguyen G, Fraser MS, Kulikoff R, Wang H, Naghavi M, Smith DL, Murray CJL, Hay SI, Lim SS. Mapping Plasmodium falciparum Mortality in Africa between 1990 and 2015. *N Engl J Med.* 22 2016;375(25):2435–45.
28. Weltgesundheitsorganisation, WHO. World malaria report 2019. [Internet]. [zitiert 12. April 2020]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
29. Shapiro LLM, Whitehead SA, Thomas MB. Quantifying the effects of temperature on mosquito and parasite traits that determine the transmission potential of human malaria. *PLoS Biol.* Oktober 2017;15(10):e2003489.
30. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet Lond Engl.* 22. Februar 2014;383(9918):723–35.
31. Grobusch MP, Kremsner PG. Uncomplicated malaria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;295:83–104.
32. Weltgesundheitsorganisation, WHO. Severe malaria. [Internet]. WHO. [zitiert 14. Mai 2019]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/severe-malaria-tmih-2014/en/>
33. Wassmer SC, Taylor TE, Rathod PK, Mishra SK, Mohanty S, Arevalo-Herrera M, Duraisingh MT, Smith JD. Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *Am J Trop Med Hyg.* September 2015;93(3 Suppl):42–56.
34. Autino B, Corbett Y, Castelli F, Taramelli D. Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012061.
35. Horstmann RD, Dietrich M, Bienzle U, Rasche H. Malaria-induced thrombocytopenia. *Blut.* 1. März 1981;42(3):157–64.

36. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 20. Oktober 2016;167(3):610–24.
37. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med*. März 1999;5(3):340–3.
38. Bouchaud O, Cot M, Kony S, Durand R, Schiemann R, Ralaimazava P, Coulaud J-P, Le Bras J, Deloron P. Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity? *Am J Trop Med Hyg*. Januar 2005;72(1):21–5.
39. Gatton ML, Dunn J, Chaudhry A, Ciketic S, Cunningham J, Cheng Q. Implications of Parasites Lacking Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 on Malaria Morbidity and Control When Rapid Diagnostic Tests Are Used for Diagnosis. *J Infect Dis*. 01 2017;215(7):1156–66.
40. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, Rosenthal PJ, D'Alessandro U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J*. 24. Mai 2011;10:144.
41. Pinheiro LCS, Feitosa LM, Silveira FFD, Boechat N. Current Antimalarial Therapies and Advances in the Development of Semi-Synthetic Artemisinin Derivatives. *An Acad Bras Cienc*. 2018;90(1 Suppl 2):1251–71.
42. Medikamente - Übersicht [Internet]. [zitiert 14. Mai 2019]. Verfügbar unter: <https://www.dtg.org/empfehlungen-und-leitlinien/empfehlungen/malaria/medikamente/medikamente-uebersicht.html>
43. Nzila A, Ward SA, Marsh K, Sims PFG, Hyde JE. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. *Trends Parasitol*. Juni 2005;21(6):292–8.
44. Srivastava IK, Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother*. Juni 1999;43(6):1334–9.
45. Gutman J, Slutsker L. Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine: More Than Just an Antimalarial? *Am J Trop Med Hyg*. 11. Januar 2017;96(1):9–10.
46. Weltgesundheitsorganisation, WHO. Intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp). [Internet]. WHO. [zitiert 14. September 2019]. Verfügbar unter: http://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/pregnancy/en/
47. Weltgesundheitsorganisation, WHO. Policy recommendation: Seasonal malaria chemoprevention (SMC) for Plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa. [Internet]. WHO. [zitiert 14. September 2019]. Verfügbar unter: https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_smc_policy_recommendation/en/

48. Adjuik M, Babiker A, Garner P, Olliaro P, Taylor W, White N, International Artemisinin Study Group. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 3. Januar 2004;363(9402):9–17.
49. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 27. September 2005;366(9487):717–25.
50. Mombo-Ngoma G, Remppis J, Sievers M, Zoleko Manego R, Endamne L, Kabwende L, Veletzky L, Nguyen TT, Groger M, Lötsch F, Mischlinger J, Flohr L, Kim J, Cattaneo C, Hutchinson D, Duparc S, Moehrle J, Velavan TP, Lell B, Ramharter M, Adegnika AA, Mordmüller B, Kremsner PG. Efficacy and Safety of Fosmidomycin-Piperaquine as Nonartemisinin-Based Combination Therapy for Uncomplicated Falciparum Malaria: A Single-Arm, Age De-escalation Proof-of-Concept Study in Gabon. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1. Juni 2018;66(12):1823–30.
51. Schümann K, Solomons NW. Perspective: What Makes It So Difficult to Mitigate Worldwide Anemia Prevalence? *Adv Nutr Bethesda Md.* Mai 2017;8(3):401–8.
52. White NJ. Anaemia and malaria. *Malar J.* 19. Oktober 2018;17(1):371.
53. Diouf S, Folquet M, Mbofung K, Ndiaye O, Brou K, Dupont C, N'dri D, Vuillerod M, Azaïs-Braesco V, Tetanye E. [Prevalence and determinants of anemia in young children in French-speaking Africa. Role of iron deficiency]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr.* November 2015;22(11):1188–97.
54. Délicat-Loembet LM, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Ollomo B, Ossari S, Mezui-me-ndong J, Mbang Mboro T, Becquart P, Nkoghe D, Leroy E, Sica L, Gonzalez J-P, Prugnolle F, Renaud F. Prevalence of the sickle cell trait in Gabon: a nationwide study. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* Juli 2014;25:52–6.
55. Nguetse CN, Meyer CG, Adegnika AA, Agbenyega T, Ogutu BR, Kremsner PG, Velavan TP. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and reduced haemoglobin levels in African children with severe malaria. *Malar J.* 07 2016;15(1):346.
56. Bechir M, Schelling E, Hamit MA, Tanner M, Zinsstag J. Parasitic infections, anemia and malnutrition among rural settled and mobile pastoralist mothers and their children in Chad. *EcoHealth.* Juni 2012;9(2):122–31.
57. Looareesuwan S, Davis TM, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ. Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. *Acta Trop.* Februar 1991;48(4):263–70.
58. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia. *Blood.* 15. Februar 2000;95(4):1481–6.

59. Pathak VA, Ghosh K. Erythropoiesis in Malaria Infections and Factors Modifying the Erythropoietic Response. *Anemia*. 2016;2016:9310905.
60. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. Juni 2000;13(2):277–99.
61. Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, Harinasuta T, Wyler DJ. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med*. 10. September 1987;317(11):675–9.
62. Leoni S, Buonfrate D, Angheben A, Gobbi F, Bisoffi Z. The hyper-reactive malarial splenomegaly: a systematic review of the literature. *Malar J*. 29. April 2015;14:185.
63. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today Pers Ed*. November 2000;16(11):469–76.
64. Zoller T, Junghanss T, Kapaun A, Gjørup I, Richter J, Hugo-persson M, Mørch K, Foroutan B, Suttorp N, Yürek S, Flick H. Intravenous Artesunate for Severe Malaria in Travelers , Europe. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):771–7.
65. Newton PN, Chotivanich K, Chierakul W, Ruangveerayuth R, Teerapong P, Silamut K, Looareesuwan S, White NJ. A comparison of the in vivo kinetics of Plasmodium falciparum ring – infected erythrocyte surface antigen – positive and – negative erythrocytes. *Blood J*. 2001;98(2):450–7.
66. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Dondorp A, Williams T, Angus B, Simpson JA, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Newbold CI. The Mechanisms of Parasite Clearance after Antimalarial Treatment of Plasmodium falciparum Malaria. *J Infect Dis*. 2000;182(August):629–33.
67. Schnitzer B, Sodeman T, Mead ML, Contacos PG. Pitting Function of the Spleen in Malaria: Ultrastructural Observations. *Science*. 14. Juli 1972;177(4044):175–7.
68. Anyona SB, Schrier SL, Gichuki CW, Waitumbi JN. Pitting of malaria parasites and spherocyte formation. *Malar J*. 2006;5(64):1–8.
69. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Mcgready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ. Central Role of the Spleen in Malaria Parasite Clearance. *Int J Infect Dis*. 2002;185(September):1538–41.
70. White NJ. Malaria parasite clearance. *Malar J*. 2017;16(88):1–14.
71. Ndour PA, Lopera-Mesa TM, Diakité SAS, Chiang S, Mouri O, Roussel C, Jauréguiberry S, Biligui S, Kendjo E, Claessens A, Ciceron L, Mazier D, Thellier M, Diakité M, Fairhurst RM, Buffet PA. Plasmodium falciparum clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria. *J Infect Dis*. 15. Januar 2015;211(2):290–7.
72. Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria:

- comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malar J.* 15. Juli 2013;12:241.
73. Pattanapanyasat K, Udomsangpetch R, Webster HK. Two-color flow cytometric analysis of intraerythrocytic malaria parasite DNA and surface membrane-associated antigen in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Cytometry.* 1993;14(4):449–54.
 74. Jauréguiberry S, Thellier M, Ndour PA, Ader F, Roussel C, Sonnevile R, Mayaux J, Matheron S, Angoulvant A, Wyplosz B, Rapp C, Pistone T, Lebrun-Vignes B, Kendjo E, Danis M, Houzé S, Bricaire F, Mazier D, Buffet P, Caumes E, French Artesunate Working Group. Delayed-onset hemolytic anemia in patients with travel-associated severe malaria treated with artesunate, France, 2011-2013. *Emerg Infect Dis.* Mai 2015;21(5):804–12.
 75. Gómez-Junyent J, Ruiz-Panales P, Calvo-Cano A, Gascón J, Muñoz J. Delayed haemolysis after artesunate therapy in a cohort of patients with severe imported malaria due to *Plasmodium falciparum*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Oktober 2017;35(8):516–9.
 76. Trape JF, Fribourg-Blanc A. Ahaptoglobinemia in African populations and its relation to malaria endemicity. *Am J Epidemiol.* Juni 1988;127(6):1282–8.
 77. Boreham PFL, Lenahan JK, Port GR, McGregor IA. Haptoglobin polymorphism and its relationship to malaria infections in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1. Januar 1981;75(2):193–200.
 78. Rougemont A, Dumbo O, Bouvier M, Soula G, Perrin L, Tamoura B, Yerly S, Dolo A, Brenner E, Kodio B. Hypohaptoglobinaemia as an epidemiological and clinical indicator for malaria. Results of two studies in a hyperendemic region in West Africa. *Lancet Lond Engl.* 24. September 1988;2(8613):709–12.
 79. Giblett ER, Motusky AG, Fraser GR. Population genetic studies in the Congo. IV. Haptoglobin and transferrin serum groups in the Congo and in other African population.s. *Am J Hum Genet.* November 1966;18(6):553–8.
 80. Abah SE, Burté F, Marquet S, Brown BJ, Akinkunmi F, Oyinloye G, Afolabi NK, Omokhodion S, Lagunju I, Shokunbi WA, Wahlgren M, Dessein H, Argiro L, Dessein AJ, Noyvert B, Hunt L, Elgar G, Sodeinde O, Holder AA, Fernandez-Reyes D. Low plasma haptoglobin is a risk factor for life-threatening childhood severe malarial anemia and not an exclusive consequence of hemolysis. *Sci Rep* [Internet]. 3. Dezember 2018 [zitiert 31. Mai 2019];8. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6277387/>
 81. CERMELE, Centre de Recherches Médicales de Lambaréné [Internet]. [zitiert 14. Mai 2019]. Verfügbar unter: <https://cermel.org/>
 82. Weltgesundheitsorganisation, WHO. Country profiles Malaria - Gabon. [Internet]. WHO. [zitiert 21. September 2019]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/en/>

83. Africa: Gabon - The World Factbook - Central Intelligence Agency [Internet]. [zitiert 21. September 2019]. Verfügbar unter: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/gb.html>
84. Klima in Gabun [Internet]. [zitiert 21. September 2019]. Verfügbar unter: <https://www.laenderdaten.info/Afrika/Gabun/Klima.php>
85. Sylla EH, Kun JF, Kremsner PG. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Dezember 2000;94(6):652–6.
86. Manego RZ, Mombo-Ngoma G, Witte M, Held J, Gmeiner M, Gebru T, Tazemda B, Mischlinger J, Groger M, Lell B, Adegnika AA, Agnandji ST, Kremsner PG, Mordmüller B, Ramharter M, Matsiegui PB. Demography, maternal health and the epidemiology of malaria and other major infectious diseases in the rural department Tsamba-Magotsi, Ngounie Province, in central African Gabon. *BMC Public Health.* 28 2017;17(1):130.
87. Joanny F, Löhr SJ, Engleitner T, Lell B, Mordmüller B. Limit of blank and limit of detection of Plasmodium falciparum thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa. *Malar J.* 14. Juni 2014;13(1):234.
88. Shih AWY, McFarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *Am J Hematol.* 2014;89(4):443–7.
89. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci.* 1. Januar 2011;2(1):21.
90. Aldámiz-Echevarría Lois T, López-Polín A, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R, Perez-Molina JA. Delayed haemolysis secondary to treatment of severe malaria with intravenous artesunate: Report on the experience of a referral centre for tropical infections in Spain. *Travel Med Infect Dis.* 1. Januar 2017;15:52–6.
91. Burri C, Ferrari G, Ntuku HM, Kitoto AT, Duparc S, Hugo P, Mitembo DK, Lengeler C. Delayed Anemia After Treatment with Injectable Artesunate in the Democratic Republic of the Congo: A Manageable Issue. *Am J Trop Med Hyg.* 1. Oktober 2014;91(4):821–3.
92. Wojnarski M, Mouri O, Chambrion C, Roussel C, Chartrel N, Smith B, Smith P, Thellier M, Buffet P, Ndour PA. Plasmodium falciparum Clearance Is Pitting-Dependent With Artemisinin-Based Drugs but Pitting-Independent With Atovaquone-Proguanil or Mefloquine. *J Infect Dis.* 2. Juli 2019;220(3):535–9.
93. Buffet PA, Milon G, Brousse V, Correas J-M, Dousset B, Couvelard A, Kianmanesh R, Farges O, Sauvanet A, Paye F, Ungeheuer M-N, Ottone C, Khun H, Fiette L, Guigon G, Huerre M, Mercereau-Puijalon O, David PH. Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. *Blood.* 1. Mai 2006;107(9):3745–52.
94. Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, McCallum FJ, Reiling L, Jaworowski A, Anders RF, Marsh K, Beeson JG. Oposonic phagocytosis

- of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med.* 1. Juli 2014;12:108.
95. Kouakou YI, Tod M, Leboucher G, Lavoignat A, Bonnot G, Bienvenu A-L, Picot S. Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria. *Int J Infect Dis.* 1. Dezember 2019;89:30–44.
 96. Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Factors contributing to anemia after uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* November 2001;65(5):614–22.
 97. Lavazec C. Molecular mechanisms of deformability of *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Curr Opin Microbiol.* 1. Dezember 2017;40:138–44.
 98. Omodeo-Salè F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur J Haematol.* 2005;74(4):324–32.
 99. Petz LD. Bystander Immune Cytolysis. *Transfus Med Rev.* 1. April 2006;20(2):110–40.
 100. Stoute JA. Complement receptor 1 and malaria. *Cell Microbiol.* 2011;13(10):1441–50.
 101. Mantel P-Y, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, Ghiran I, Toner M, Irimia D, Ivanov AR, Barteneva N, Marti M. Malaria-Infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. *Cell Host Microbe.* 15. Mai 2013;13(5):521–34.
 102. Clark RL. Hypothesized cause of delayed hemolysis associated with intravenous artesunate. *Med Hypotheses.* Februar 2014;82(2):167–70.
 103. Kasvosve I, Gomo ZA, Gangaidzo IT, Mvundura E, Saungweme T, Moyo VM, Khumalo H, Boelaert JR, Gordeuk VR, Delanghe JR. Reference range of serum haptoglobin is haptoglobin phenotype-dependent in blacks. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* Juni 2000;296(1–2):163–70.

EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Johanna Kim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Hämolyse nach Therapie bei unkomplizierter Malaria in Gabun“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 1) Kurth F, Lingscheid T, Steiner F, Stegemann S. M, Bélard, S, Menner N, Pongratz P, Kim J, Bernuth von H, Mayer B, Damm G, Seehofer D, Salama A, Suttorp N, Zoller T, „Hemolysis after oral artemisinin combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria.“ *Emerg Infect Dis.* 2016;22(8):1381-1386. doi:10.3201/eid2208.151905
- 2) Mombo-Ngoma G, Remppis J, Sievers M, Manego Z. R, Endamne L, Kabwende L, Veletzky L, Nguyen T.T, Groger M, Lötsch F, Mischlinger J, Flohr L, Kim J, Cattaneo C, Hutchinson D, Duparc S, Moehrle J, Velavan P. T, Lell B, Ramharter M, Adegnika A.A, Mordmüller B, Kremsner G.P, „Efficacy and Safety of Fosmidomycin-Piperaquine as Nonartemisinin-Based Combination Therapy for Uncomplicated Falciparum Malaria: A Single-Arm, Age De-escalation Proof-of-Concept Study in Gabon.“ *Clin Infect Dis.* 2018;66(12):1823-1830. doi:10.1093/cid/cix1122
- 3) Groger M, Veletzky L, Lalremruata A, Cattaneo C, Mischlinger J, Zoleko-Manego R, Endamnde L, Klicpera A, Kim J, Nguyen T, Flohr L, Remppis J, Matsiegui PB, Adegnika A.A, Agnandji T.S, Kremsner G.P, Mordmüller B, Mombo-Ngoma G, Ramharter M, “Prospective Clinical Trial Assessing Species-Specific Efficacy of Artemether-Lumefantrine for the Treatment of Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, and Mixed Plasmodium Malaria in Gabon.” *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(3):1-11. doi:10.1128/AAC.01758-17

DANKSAGUNG

Es kommt in der Welt vor allem auf die Helfer an, und die Helfer der Helfer.

- Albert Schweitzer -

Daher größten Dank an PD Dr. med. Florian Kurth. Danke für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, für die konstruktive Kritik und Geduld in allen Höhen und Tiefen. Von deiner Begeisterung für die Forschung und Leidenschaft für die Tropenmedizin und Lambaréné habe ich fürs Leben gelernt.

Ich danke PD Dr. med. Thomas Zoller, Prof. Leif Erik Sander und Prof. Norbert Suttrop für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion an der Klinik m.S. Infektiologie und Pneumologie der Charité.

Vielen Dank an Prof. Peter Kremsner, Prof. Michael Ramharter, Prof. Ghyslain Mombongo-Ngoma und der gesamten Equipe OZ sowie den MitarbeiterInnen des Laboratoire Recherches in Lambaréné und Fougamou. Nur durch die Rahmenbedingungen am CERMEC und CRMN und die Bereitschaft und das Vertrauen der StudienteilnehmerInnen konnte die Idee von OIE entwickelt und durchgeführt werden.

Danke an Ibing und Bik für die Freuden im Alltag, an Maria Esterhuuse für zahlreiche Lehren im Labor und des Lebens, an Hannes und Luzia für das ansteckende Forschungsfieber. Ich erinnere mich gerne an die warmen Abende am Ogooué Strand mit Jonathans Ukulele, Wiebke, Andreas und der restlichen Equipe.

Danke an die alte Berliner WG mit Grace und Lisa, für das Auffangnest. Danke an die CMI Berlin und all die lieben Menschen für die emotionale Unterstützung. Für das Abholen vom Flughafen und Aufpäppeln nach der Rückkehr. Danke an Pia, für das Anfeuern und die Gebete. Danke an die YCCler, die kleine Grace, Majochijak und Enhae, euren endlosen Zuspruch.

Danke an Queen Margot und Bimbo für die Abende des Vergessens und Lebens. Danke an Ruthi und SMK, an die Wurzeln der Heimat.

Was wäre ich ohne die Gebete von 엄마 und 아빠. Du warst schon immer ein großes Vorbild, 오빠. Das Durchhalten hat sich gelohnt.

Danke an Gott.