

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Bedeutung von Koinfektionen mit
Plasmodium falciparum und Parvovirus B19 für
Fieber, Anämie und Krankenhausaufenthalt bei
Kindern in Ghana

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Wiebke Herr
aus Berlin

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

2. Berichterstatter: PD Dr. Alexander Claviez

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2023

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 22.07.2022

gez.:

Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Anämie.....	1
1.1.1. Definition der Anämie und Epidemiologie.....	1
1.1.2. Hämoglobin und Laborparameter.....	2
1.1.3. Klassifikation, Pathophysiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.4. Klinische Symptomatik der Anämie, Prävention und Therapie.....	6
1.2. Parvovirus B19.....	7
1.2.1. Charakteristika und Epidemiologie des Parvovirus B19.....	7
1.2.2. Immunreaktion und Labordiagnostik.....	7
1.2.3. Klinische Symptomatik und Therapieoptionen.....	8
1.2.4. Anämie bei Parvovirus-B19-Infektionen.....	9
1.3. <i>Plasmodium falciparum</i>	11
1.3.1. Epidemiologie.....	11
1.3.2. Lebenszyklus und Übertragung von <i>Plasmodium falciparum</i>	12
1.3.3. Immunreaktion und Labordiagnostik.....	12
1.3.4. Pathophysiologie und klinische Symptomatik.....	13
1.3.5. Anämie bei Infektionen mit <i>Plasmodium falciparum</i>	14
1.4. Koinfektion mit <i>Plasmodium falciparum</i> und Parvovirus B19.....	16
1.5. Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Studiendesign.....	18
2.2. Erfassung des Krankheitsverlaufs.....	19
2.3. Studiengebiet und -population.....	21
2.4. Ethik.....	23
2.5. Datenerfassung.....	23
2.6. Messungen und Laboranalyse.....	23
2.6.1. Temperaturmessung.....	23
2.6.2. Blutentnahme.....	23
2.6.3. Diagnostik von Parvovirus B19.....	24
2.6.4. Diagnostik von <i>Plasmodium falciparum</i>	30
2.7. Symptom- und Diagnosedefinitionen.....	32
2.7.1. Symptomkomplexe.....	33
2.7.2. Diagnosen.....	34
2.7.3. Anämie.....	35
2.7.4. Parvovirus-B19-Infektion.....	36
2.7.5. Infektion mit <i>Plasmodium falciparum</i>	37
2.8. Statistische Methoden.....	38
3. Ergebnisse.....	40
3.1. Studienpopulation.....	40

3.2.	Infektion mit <i>Plasmodium falciparum</i>	48
3.3.	Parvovirus-B19-Infektion	48
3.3.1.	Labordiagnostik.....	48
3.3.2.	Häufigkeit, Seroprävalenz und Saisonalität	52
3.3.3.	Klinische Präsentation.....	54
3.3.4.	Risikofaktoren für eine Parvovirus-B19-Infektion	56
3.4.	Koinfektionen	59
3.4.1.	Häufigkeit und Verlauf der Koinfektion	59
3.4.2.	Klinische Symptomatik der Mono- und Koinfektionen.....	60
3.4.3.	Verlauf der Mono- und Koinfektionen	61
3.5.	Anämie	62
3.5.1.	Häufigkeit und Charakteristika	62
3.5.2.	Anämie bei Mono- und Koinfektionen.....	62
3.5.3.	Verlauf der Anämie über den Beobachtungszeitraum	64
3.5.4.	Risikofaktoren für eine Anämie	66
4.	Diskussion	70
4.1.	Parvovirus-B19-Diagnostik	70
4.1.1.	Sensitivität und Spezifität der serologischen Untersuchungen	71
4.1.2.	Validität und Interpretation des Nukleinsäure-Nachweises.....	74
4.1.3.	Definition der aktuellen Parvovirus-B19-Infektion.....	75
4.2.	Infektionshäufigkeit von <i>Plasmodium falciparum</i> und Parvovirus B19.....	77
4.2.1.	Häufigkeit von <i>Plasmodium-falciparum</i> -Infektionen	77
4.2.2.	Häufigkeit der Parvovirus-B19-Infektion und Seroprävalenz.....	78
4.2.3.	Häufigkeit der Koinfektion	80
4.3.	Symptomatik bei Parvovirus-B19-Mono- und Koinfektionen	80
4.3.1.	Symptomatik bei Infektion mit Parvovirus B19.....	80
4.3.2.	Risikofaktoren einer Parvovirus-B19-Infektion.....	81
4.4.	Anämie	82
4.4.1.	Häufigkeit der Anämie	82
4.4.2.	Risikofaktoren der Anämie	82
4.5.	Limitierungen der Studie.....	85
4.6.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	86
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Anhang.....	95
8.	Danksagung	120
9.	Lebenslauf.....	121

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen physikalischer Einheiten wurden nach dem *Systeme internationale* verwendet. Andere Abkürzungen wurden folgendermaßen eingesetzt:

95-%-KI	<u>95-%-iges Konfidenzintervall</u>
B19V	<u>Parvovirus B19</u>
EDTA	<u>Ethylendiamintetraacetat</u>
ELISA	<u>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</u> , Enzymimmuntest
FWS	<u>Fever-Without-Source</u> , Fieber unklarer Genese
G6PD	<u>Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase</u>
Hb	<u>Hämoglobin</u>
HIV	<u>Humanes Immundefizienzvirus</u>
Hkt	<u>Hämatokrit</u>
IgA, G, M	<u>Immunglobulin A, G, M</u>
IQR	<u>Interquartile Range</u> , Interquartilsabstand
IR	<u>Inpatient Review</u>
MCH	<u>Mean Corpuscular Hemoglobin</u> , Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	<u>Mean Cellular Hemoglobin Concentration</u> , Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	<u>Mean Corpuscular Volume</u> , Mittleres Erythrozyten-Einzelvolumen
OR	<u>Odds Ratio</u>
PCR	<u>Polymerase Chain Reaction</u> , Polymerase-Ketten-Reaktion
P.	<u>Plasmodium</u>
RDW	<u>Red Blood Cell Distribution Width</u> , Erythrozyten-Verteilungsbreite
SIRS	<u>Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom</u>
VP1/2	<u>Virus Protein 1/2</u>
WHO	<u>World Health Organization</u> , Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

Trotz vielfältiger Kontrollstrategien und insgesamt sinkender Prävalenz erkrankten im Jahr 2018 weltweit circa 228 Millionen Menschen an Malaria, wovon 405.000 Personen verstarben. Kinder unter fünf Jahren tragen hierbei die größte Last, unter ihnen fanden sich 67 % der Todesfälle. Geographisch war die Region Afrika der Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit 93 % aller Malaria-Erkrankungen am stärksten betroffen (WHO, 2019).

Parvovirus B19 (B19V) ist weltweit verbreitet und ein häufiger Krankheitserreger bei Kindern. Die Angaben der Seroprävalenz in pädiatrischen Studienpopulationen aus Ländern südlich der Sahara schwanken zwischen 14 % in Kenia (Wildig *et al.*, 2010) und über 90 % im Niger (Jones *et al.*, 1990). B19V ist nicht nur Auslöser der hierzulande bekannten Kinderkrankheit Ringelröteln (*Erythema infectiosum*), sondern kann gerade bei immundefizienten Personen schwere Anämien verursachen.

Fieberhafte Episoden sowie Anämien können im Rahmen beider Erkrankungen auftreten und sind auf unterschiedliche Pathomechanismen zurückzuführen. Aufgrund der starken Verbreitung beider Infektionen ist das Auftreten als Koinfektion im Kindesalter naheliegend und mehrfach beschrieben. Offen bleibt bisher, in wieweit die Anämie bei Koinfektionen schwerer verlaufen kann, ob sie gehäuft auftritt und wie der generelle klinische Verlauf einer Koinfektion sich von dem Verlauf der Monoinfektionen unterscheidet.

1.1. Anämie

1.1.1. Definition der Anämie und Epidemiologie

Die Anämie wird allgemein über das Unterschreiten von Grenzwerten der Hämoglobinkonzentration (Hb) oder des Hämatokrit-Werts (Hkt) im Blut definiert. Der ghanaischen Gesundheits- und Demografie-Umfrage aus dem Jahr 2008 zufolge hatten 78,4 % der Kinder unter fünf Jahren eine Anämie mit einem Hb von < 11 g/dl. Davon hatten 7,8 % eine schwere Anämie (Hb < 7 g/dl). In der Ashanti-Region, in der sich auch unser Studiengebiet befindet, lag die Häufigkeit der Anämie mit 79,8 % und 12,2 % schwerer Anämie leicht über dem nationalen Durchschnitt (Ewusie *et al.*, 2014). Aktuellere Untersuchungen aus der Brong-Ahafo-Region im westlichen Ghana zeigten bei 73,1 % der Kinder eine Anämie, allerdings nur bei 3,1 % eine schwere Anämie (VanBuskirk *et al.*, 2014).

1.1.2. Hämoglobin und Laborparameter

Das Protein Hb ist für den Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid im menschlichen Körper verantwortlich. Hb findet sich in den Erythrozyten und wird anhand der Hb-Konzentration gemessen. Bei einer verminderten Hb-Konzentration im Blut wird unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache von einer Anämie gesprochen. Die Grenzwerte sind hierbei von Alter und Geschlecht abhängig. Neben verschiedenen Erkrankungen können unter anderem auch Ernährungsweisen und der Aufenthalt in größeren Höhen die Hb-Konzentration im Blut beeinflussen.

Die Erythropoese erfolgt nach der Geburt über mehrere Vorstufen im Knochenmark und wird durch das Zytokin Erythropoietin stimuliert. Die letzte Vorstufe der Erythrozyten, die Retikulozyten, stellen ca. 1 % der roten Blutzellen im peripheren Blut dar und spiegeln die Aktivität der Erythrozyten-Produktion wider. Die Entwicklung eines reifen Erythrozyten dauert durchschnittlich 7 d, die Überlebenszeit beträgt 120 d. Bei Sauerstoffmangel in Organen und Geweben reagiert der Körper mit einer gesteigerten Erythropoese. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein, z. B. ein gesteigerter Verlust von Erythrozyten.

Neben dem Hb-Wert gibt es weitere Laborparameter, die für die Klassifikation der Anämie herangezogen werden. Das mittlere korpuskuläre Volumen (*mean corpuscular volume*, MCV) ist das Maß für die durchschnittliche Größe der peripheren Erythrozyten und wird durch den Hb-Gehalt und die Plasmaosmolalität beeinflusst. Wird die Standardabweichung des MCV errechnet, ergibt sich daraus die Größenverteilung der Erythrozyten (*red blood cell distribution width*, RDW). Typische Veränderungen liefern Hinweise auf zugrunde liegende Erkrankungen und ermöglichen eine Aussage darüber, ob die Erythrozyten isozytär (in gleicher Größe) oder anisozytär (in unterschiedlichen Größen) vorliegen. Der Hb-Gehalt der Erythrozyten lässt sich berechnen und wird als mittleres korpuskuläres Hb (*mean corpuscular hemoglobin*, MCH) angegeben. MCV und MCH stehen in direktem Zusammenhang zueinander. Aus diesen Parametern lässt sich der dritte Erythrozytenindex, die mittlere zelluläre Hb-Konzentration (*mean cellular hemoglobin concentration*, MCHC), berechnen. Der Hkt-Wert beschreibt den prozentualen Anteil zellulärer Blutbestandteile (größtenteils Erythrozyten) und kann in zentrifugiertem Blut gemessen oder durch Erythrozytenzahl und MCV berechnet werden. Einige Anämie-Definitionen verwenden auch Hkt-Grenzwerte.

1.1.3. Klassifikation, Pathophysiologie und Risikofaktoren

Unter Beachtung der zugrundeliegenden Ursache, der Erythrozytenindizes und weiterer Laborparameter ist eine Gliederung in verschiedene Anämieformen möglich. Je nach

Altersgruppe, Lebensumständen, dem genetischen Hintergrund und auch der geografischen Herkunft finden sich unterschiedliche Häufigkeiten der einzelnen Anämieformen. Die Genese ist hierbei zumeist multifaktoriell und die einzelnen Faktoren stehen im Wechselspiel miteinander.

Anhand des zeitlichen Verlaufs lassen sich akute und chronische Anämieformen unterscheiden. Bei chronischen Verläufen hat das Plasmavolumen zugenommen, sodass der Abfall der Erythrozytenzahl kompensiert wird und das Blutvolumen im Gegensatz zum akuten Blutverlust in der Regel normal ist. Auch kann in hypo- und hyperregenerative Anämien unterschieden werden, sowie nach den typischen morphologischen Veränderungen der Erythrozyten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevanten Formen und ihre möglichen Ursachen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1. Klassifikation und Ursachen von Anämien

Klasse der Anämien	Ursachen
normochrom, normozytär	- hyporegenerativ: chronisch entzündliche Erkrankungen, maligne Tumoren, systemische Infektionen - Blutungen - intravasale Hämolyse
hypochrom, mikrozytär	- Eisenmangel (bei Beginn oft nur vermindertes MCH, RDW > 15 %; später auch erhöht => Anisozytose) - Vitamin-B6-Mangel, Kupfer-Mangel - Thalassämie (RDW normal) - Hereditäre sideroblastische Anämie
normochrom, mikrozytär	- hereditäre Sphärozytose
hyperchrom, makrozytär	- Medikamenten-Nebenwirkung (z. B. Antikonvulsiva, Immunsuppressiva) - Folsäure-, Vitamin B12-Mangel - Aplastische Anämie

Grundsätzlich kann eine Anämie durch eine verminderte Produktion, einen Verlust oder eine vorzeitige gesteigerte Elimination (Hämolyse) von Erythrozyten bedingt sein. Diese Mechanismen können auch gleichzeitig auftreten. Eine verminderte Erythropoese kann beispielsweise durch virale Infektionen, maligne Infiltration des Knochenmarks, chronische systemische Entzündungszustände, Medikamenteneinnahmen oder auch einen Mangel an notwendigen Substraten wie z. B. Eisen, Folsäure, Vitamin B12 oder Kupfer verursacht werden. Ein gesteigerter Blutverlust findet sich häufig im traumatologischen Kontext, bei pathologischer Blutungsneigung oder im Rahmen chronischer Prozesse, beispielsweise bei malignen Veränderungen im Gastrointestinaltrakt. Verschiedene genetische Defekte, wie die Sichelzellerkrankung, Thalassämien, oder ein Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (G6PD), führen zu einem gesteigerten Abbau der veränderten Erythrozyten. Auch autoimmune Mechanismen können eine intravasale Hämolyse mit konsekutiven Anämien verursachen. Die

weltweit am häufigsten vorkommende Anämieform ist auf den Mangel an Eisen zurückzuführen und durch hypochrom-mikrozytäre Erythrozyten gekennzeichnet (Kassebaum *et al.*, 2014).

Wie bereits erwähnt, spielen Alter und geografischer Kontext bei der Ursachenbestimmung eine besondere Rolle, sodass im Folgenden auf Anämieursachen in der pädiatrischen Population in afrikanischen Ländern südlich der Sahara eingegangen wird. Abb. 1 zeigt eine Zusammenfassung der dort relevanten Aspekte, gegliedert in infektiologische, nutritive und genetische Ursachen der Anämie. Eine Studie unter Kindern mit schwerer Anämie (Hb < 5 g/dl) in Malawi zeigte bei 50 % eine verminderte Erythropoese als ursächlich. Ein Fünftel der Kinder hatte eine hämolytische Anämie und in rund 7 % waren Blutverluste die Ursache der Anämie (Boele van Hensbroek *et al.*, 2010).

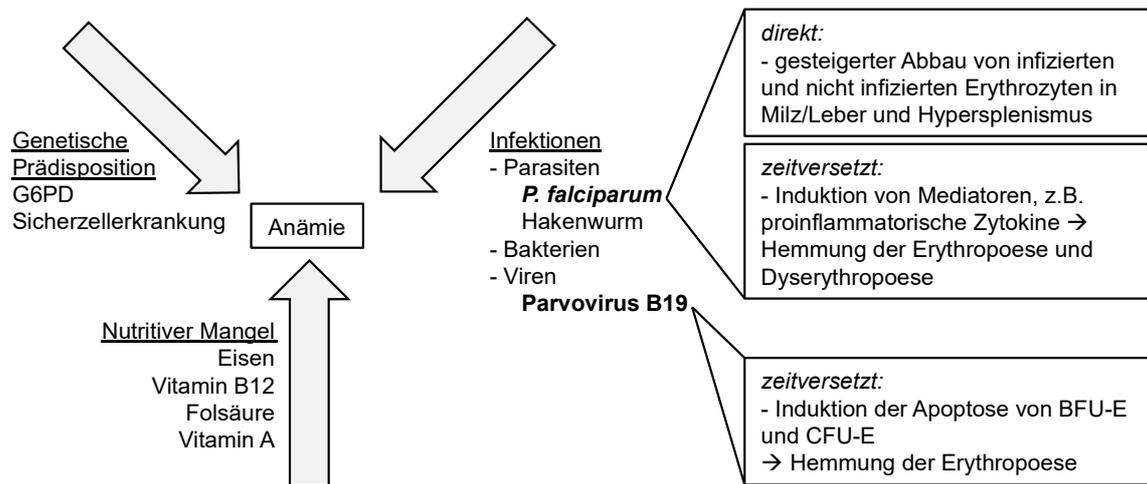


Abb. 1. Überblick über Ursachen der Anämie - Neben genetischer Prädisposition und Mangel an Vitaminen und Spurenelementen können auch Infektionen eine Anämie verursachen oder verstärken. Die Abb. fasst zudem die Hauptmechanismen der Infektionserreger *P. falciparum* und B19V zusammen. BFU-E: erythroid burst forming units; CFU-E: erythroid colony forming units.

Eine der wichtigsten infektiologischen Ursachen für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Anämie durch Hämolyse und verminderte Erythropoese ist die Erkrankung an Malaria (Kapitel 1.3.4.). Menon und Yoon konnten bei 52,6 % der anämischen Kinder in Uganda Parasiten nachweisen (Menon & Yoon, 2015). In einer Studie in Malawi stellte sich die saisonale Transmission gegenüber der ganzjährigen Übertragung von *P. falciparum* als Risikofaktor für eine Anämie heraus (Calis *et al.*, 2008). Als Hauptrisikofaktoren für eine schwere Anämie beschrieben Calis *et al.* jedoch das Vorkommen einer Bakteriämie und einer Hakenwurm-Infestation mit chronischen Blutverlusten. Auch die Schistosomiasis und virale Infektionen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV), Epstein-Barr-Virus,

Cytomegalovirus oder B19V (Kapitel 1.2.4.) können Anämien verursachen (Jonker *et al.*, 2017). Detailliertere Angaben zum Pathomechanismus der Anämie-Entstehung bei *P.-falciparum*- und B19V-Infektion finden sich in den jeweiligen Kapiteln (1.2.4. und 1.3.5.).

Daneben spielen auch nutritive Aspekte eine Rolle, wobei vor allem Eisen-, Vitamin-B12-, Vitamin-A- und Folsäuremangel Anämien verursachen beziehungsweise verstärken können (Jonker *et al.*, 2017). In der Elfenbeinküste fand sich bei 25 % der Kinder im Vorschulalter und bei 39 % der Schulkinder eine Eisenmangelanämie (Asobayire *et al.*, 2001).

Eine in Afrika relativ häufige Ursache hämolytischer Anämien ist die autosomal vererbte Sichelzellkrankheit. Verschiedene Hb-Punktmutationen führen zu einem Austausch der sechsten Aminosäure Valin durch Glutamin (HbS) beziehungsweise Lysin (HbC) und verursachen bei homozygotem (HbSS, HbCC) oder compound-heterozygotem (HbSC) Auftreten eine pathologische Vernetzung der Erythrozyten im desoxygenierten Zustand. Diese Polymerisationsneigung ist zusammen mit anderen Dysfunktionen der Erythrozytenmembran für die klinische Symptomatik verantwortlich. Bei homozygoten Trägern kommt es durch die Erythrozyteninstabilität und Hämolyse zu einer chronischen Anämie, sowie intermittierenden akuten vasookklusiven Krisen. Diese können sich mit entsprechender Symptomatik an unterschiedlichen Organen manifestieren, zugleich entsteht frühzeitig eine funktionelle Asplenie mit Neigung zur Sepsis-Entwicklung. Compound-heterozygote Träger der HbS- und HbC-Mutation präsentieren in der Regel eine mildere klinische Symptomatik als homozygote Anlageträger. Weitere Hb-Mutationen werden bei compound-heterozygotem Auftreten mit HbS zur Gruppe der Sichelzellkrankheiten gezählt (Bender, 2017). In Ghana findet sich die Sichelzellkrankheit (HbSS, HbSC, HbCC) bei 2,0-2,7 % der pädiatrischen Studienpopulationen (Kreuels *et al.*, 2010; VanBuskirk *et al.*, 2014). Ursächlich für die Persistenz der Mutation in Malariagebieten ist der relative Schutz gegenüber Malaria-Erkrankungen, von dem heterozygote Anlageträger (HbAS) profitieren (Piel *et al.*, 2010). Auch sie können sich mit *P. falciparum* infizieren, allerdings finden sich bei heterozygoten Anlageträgern in bis zu 22 % seltener Fälle unkomplizierter und in bis zu 90 % seltener schwere Verläufe der Malaria-Erkrankung (May *et al.*, 2007; Kreuels *et al.*, 2010). Häufigkeiten des heterozygoten Genotyps HbAS liegen in Ghana zwischen 9,1-10,9 % (Kreuels *et al.*, 2010; Amoako *et al.*, 2014).

Auch der X-chromosomal vererbte G6PD-Mangel führt zu chronischer Anämie und kann mit akuten hämolytischen Krisen einhergehen (Mehta *et al.*, 2000). Da auch diese Erkrankung einen protektiven Effekt vor schweren Verlaufsformen einer *P.-falciparum*-Infektion bietet, ist die epidemiologische Verteilung entsprechend (Luzzatto, 1979). In Ghana sind vor allem drei

der über 400 bekannten Mutationen vertreten. Die Prävalenz des G6PD-Mangels liegt in Ghana bei 10,6 % (Amoah *et al.*, 2016).

1.1.4. Klinische Symptomatik der Anämie, Prävention und Therapie

Ungeachtet der Ursache präsentiert sich die Anämie mit charakteristischen Symptomen. Typischerweise sind die Patienten blass, müde und vermindert belastbar. An Anämien, die sich langsam entwickeln, können sich gerade Kinder gut adaptieren. Akute Hb-Abfälle oder sehr schwere Formen werden in der Regel weniger gut toleriert und führen zu Tachykardie, Dyspnoe, Verwirrung und starker Unruhe. Hämolytische Anämien können zusätzlich eine Dunkelfärbung des Urins und einen Skleren- und Hautikterus verursachen. Bei Blutungsanämien können gastrointestinale Blutverluste oder auch Nasenbluten hinzukommen. Begünstigt durch die komplexen Ursachen können Anämien langfristig die körperliche und kognitive Entwicklung der Kinder negativ beeinflussen (Kassebaum *et al.*, 2014).

Die meist multifaktorielle Genese ermöglicht zahlreiche präventive Ansätze zur Verhinderung sowohl akuter als auch chronischer Anämien. Neben ausgeglichener Ernährung ist die spezielle Substitution von Nährstoffen und Vitaminen wie Eisen, Folsäure, Vitamin A, etc. möglich. Schon 1997 beschrieben Mendez *et al.* die positiven Effekte einer Eisensubstitution auf die Anämie, jedoch wird dies aufgrund von gleichzeitiger Begünstigung von Infektionen mit Bakterien und Parasiten kontrovers diskutiert (Menendez *et al.*, 1997; Jonker *et al.*, 2017).

Auch die Maßnahmen der Malaria-Prävention wie imprägnierte Moskitonetze, Chemoprophylaxe und der Einsatz von Insektiziden haben einen Einfluss auf die Prävalenz der Anämie. Des Weiteren spielt eine konsequente Infektionsbehandlung eine wichtige Rolle. In Gebieten mit hoher Prävalenz gastrointestinaler Helminthen-Infestationen ist die Therapie dieser von Bedeutung (Crawley, 2004).

Die Therapie richtet sich grundsätzlich nach der Ursache. Im akuten Stadium besteht die Möglichkeit, den Hb-Gehalt des Blutes über Bluttransfusionen zu erhöhen und damit die Letalität stark zu reduzieren, wobei gerade in Ländern südlich der Sahara und ländlichen Gebieten die Verfügbarkeit begrenzt ist (Kiguli *et al.*, 2015). Außerdem besteht im Rahmen einer Transfusion ein Risiko der Übertragung von HIV oder Hepatitis-Viren B und C (Dicko *et al.*, 2004). Im chronischen Stadium sind die Möglichkeiten identisch mit den präventiven Maßnahmen.

1.2. Parvovirus B19

1.2.1. Charakteristika und Epidemiologie des Parvovirus B19

Erstmals wurde B19V im Jahr 1975 von Cossart *et al.* beschrieben. B19V ist ein nicht umhülltes, ikosaedrisches Virus mit einem einzelsträngigen DNA-Genom und zählt zu den Erythroviren aus der Familie der Parvoviridae (Cossart *et al.*, 1975; Qiu *et al.*, 2017). Drei Genotypen sind bekannt, von denen vor allem der Genotyp 3 (V9) in Afrika südlich der Sahara und damit in Ghana relevant zu sein scheint (Candotti *et al.*, 2004). Die Übertragung erfolgt über den Speichel hauptsächlich als Tröpfchen- und Schmierinfektion, die höchsten berichteten Transmissionsraten lagen bei bis zu 50 % (Chorba *et al.*, 1986; Sengl *et al.*, 1994). Außerdem ist eine hämatogene Virusübertragung möglich, sowohl über Blutprodukte als auch von der Mutter auf das ungeborene Kind (Jordan, 1996; Jordan *et al.*, 1998).

Das Virus ist weltweit verbreitet und kann sowohl in Ausbrüchen als auch sporadisch zu Infektionen führen (Serjeant *et al.*, 1981). Bei Untersuchungen in England und Wales konnten bei über 60 % der jungen Erwachsenen und bei über 85 % der 70-Jährigen spezifische Immunglobulin-Antikörper vom Typ IgG nachgewiesen werden (Cohen & Buckley, 1988). Der Erstkontakt mit B19V erfolgt typischerweise zwischen dem fünften und 15. Lebensjahr (Qiu *et al.*, 2017). Einige Daten aus Ländern südlich der Sahara lassen auf einen früheren Viruskontakt bei den dortigen Kindern schließen, wobei flächendeckende Erkenntnisse nicht vorliegen. Eine Studie aus dem Niger fand bereits bis zum Ende des zweiten Lebensjahres bei 90 % der Kinder spezifische IgG-Antikörper (Jones *et al.*, 1990). Im Gegensatz hierzu wurden in Kenia nur bei 14 % der Studienpopulation unter sechs Jahren spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen (Wildig *et al.*, 2010). Auch bei Kindern unter sieben Jahren in Ghana fanden sich bei 8 % IgG-Antikörper (Parsyan *et al.*, 2006).

1.2.2. Immunreaktion und Labordiagnostik

Nach einer Inkubationszeit von 7-10 d steigt die Viruslast und proportional dazu die Infektiosität der infizierten Individuen. Die Anzahl der Viruskopien scheint dabei nicht mit der Schwere des Krankheitsbildes zu korrelieren (Anderson *et al.*, 1985; Qiu *et al.*, 2017). Im Rahmen der Immunreaktion werden 10-12 d nach Infektion IgM-Antikörper gegen die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 gebildet. Wenige Tage später steigt auch der IgG-Antikörpertiter, sodass häufig beide Antikörper nachweisbar sind. Während die IgM-Antikörper für gewöhnlich 3-4 Monate persistieren und somit Zeichen einer frischen Infektion sind, vermitteln die IgG-Antikörper in der Regel eine lebenslange Immunität gegenüber Reinfektionen. Bei immundefizienten Personen kann eine effektive Antikörperbildung ausbleiben, sodass sich

eine entsprechend hohe Viruslast findet (Young & Brown, 2004). Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) detektierbare niedrige Virustiter können auch bei immunkompetenten Personen Monate bis Jahre persistieren (Candotti *et al.*, 2004). Der Nachweis von DNA muss damit nicht für eine frische Infektion sprechen, sodass eine Kombination diagnostischer Marker sinnvoll scheint (Gallinella *et al.*, 2003). Der zeitliche Verlauf der Immunreaktion ist in Abb. 2 dargestellt.

Weitere Untersuchungen wie Epitop-spezifische Enzymimmunoassays und Aviditätstestungen können zur zeitlichen Einordnung der Infektion herangezogen werden. So steigt beispielsweise die Avidität der IgG-Antikörper, je länger die Infektion zurück liegt. Der IgG-Subtyp 3 findet sich nur während der akuten Phase, der Subtyp 4 hingegen 5-6 Monate nach der Infektion (Qiu *et al.*, 2017).

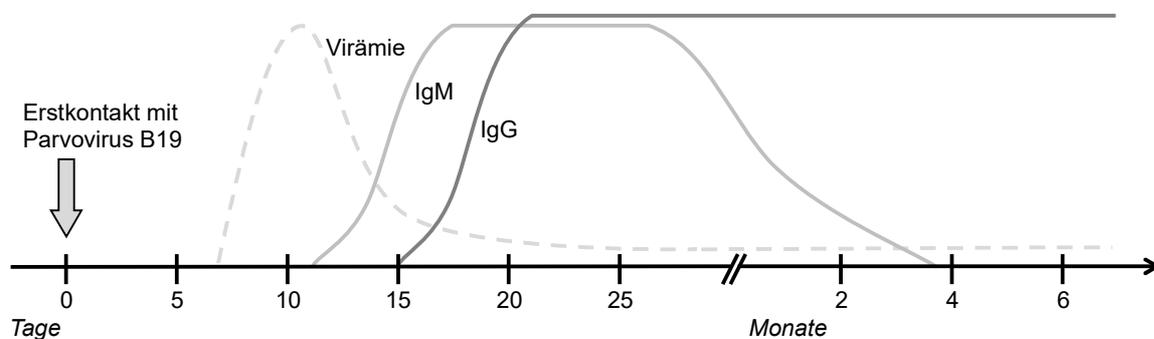


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Laborparameter bei Parvovirus-B19-Infektion - Nach Erstkontakt mit dem Virus steigt nach 7-10 d die Viruslast. Wenige Tage später lassen sich neutralisierende IgM-Antikörper nachweisen, die Viruslast sinkt. Ab d 15 ist ein Anstieg des Plasmaspiegels spezifischer IgG-Antikörper zu verzeichnen. Das Virus kann mit PCR über Monate bis Jahre nachweisbar bleiben, auch IgM-Antikörper können persistieren. IgG-Antikörper bleiben in der Regel lebenslang nachweisbar und vermitteln eine Immunität gegenüber erneuten Infektionen. Grafik nach Anderson *et al.*, 1985; Young & Brown, 2004.

1.2.3. Klinische Symptomatik und Therapieoptionen

Das Virus wurde 1981 bei einem Patienten mit Sichelzellerkrankheit in Großbritannien erstmals in Verbindung mit einer hypoplastischen Krise gebracht (Pattison *et al.*, 1981). Anderson *et al.* gelang 1983 der Nachweis des Zusammenhangs zwischen der Virusinfektion und der seit 1799 bekannten Kinderkrankheit Erythema infectiosum (Anderson *et al.*, 1983). Inzwischen ist das Virus außerdem als Verursacher eines Hydrops fetalis bei Infektion während der Schwangerschaft, aplastischen Krisen bei Patienten mit gesteigerter Erythropoese und chronischen Anämien bei immundefizienten Individuen bekannt. Auch seine Bedeutung bei Arthritiden und Myokarditiden wird diskutiert. Die Mehrheit der Infektionen verlaufen jedoch asymptomatisch (Young & Brown, 2004).

Die typische Symptomatik der Erkrankung wurde 1985 von Anderson *et al.* beschrieben. Hierbei wurden gesunde Freiwillige mit dem Virus infiziert und ein zweiphasiger Verlauf der Infektion beobachtet. In den ersten Tagen der Virämie fand sich keine oder eine unspezifische Grippe-symptomatik. Die typischen Symptome wie ein Ausschlag oder Gelenksbeschwerden entwickelten sich erst nach Absinken der Viruslast in der zweiten Phase der Erkrankung und werden wahrscheinlich durch Immunkomplexe vermittelt (Anderson *et al.*, 1985).

Trotz der weiten Verbreitung der B19V-Infektion und zahlreicher beschriebener schwerer Krankheitsverläufe gibt es bisher noch keine zielgerichtete Therapie. Nachdem zunächst *in vitro*-Studien eine Suppression der Virusreplikation durch das Virustatikum Cidofovir zeigen konnten (Bonvicini *et al.*, 2015), wurde dies auch für den verwandten Wirkstoff Brincidofovir *in vitro* bestätigt (Bua *et al.*, 2019). Weitere Studien bleiben nun abzuwarten. Chronische Anämien können mit intravenös applizierten, Antigen-unspezifischen IgG-Antikörpern behandelt werden, wohingegen bei akuter aplastischer Krise Bluttransfusionen im Vordergrund stehen. Weitere Substanzen wie Hydroxyharnstoff und Cumarin-Derivate werden aktuell als Therapieoption evaluiert (Manaresi & Gallinella, 2019).

Bisherige Impfstoffentwicklungen zeigten zwar eine vielversprechende Antikörperinduktion *in vivo*, leider aber auch Nebenwirkungen, sodass bisher noch kein verträglicher und wirksamer Impfstoff zur Verfügung steht (Ballou *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2011). Neuere Arbeiten berichten von erfolgreichen Impfstoffen in Mausmodellen, deren weitere Entwicklung abzuwarten bleibt (Chandramouli *et al.*, 2013; Penkert *et al.*, 2017). Gerade immunsupprimierte Kinder würden weltweit von einer Impfung profitieren. Auch Schwangerschaftskomplikationen wie ein Hydrops fetalis oder Virus-assoziierte Erkrankungen wie Arthritiden oder Myokarditiden könnten darüber verhindert werden (Qiu *et al.*, 2017).

1.2.4. Anämie bei Parvovirus-B19-Infektionen

Das Virus befällt die erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark, besonders die „*erythroid burst forming units*“ (BFU-E) und die „*erythroid colony forming units*“ (CFU-E) und induziert nach seiner Replikation die Apoptose der betroffenen Zellen (Morinet *et al.*, 2011). Die hieraus resultierende Hemmung der Erythropoese wurde bereits 1983 *in vitro* nachgewiesen und besteht für bis zu 10 d (Mortimer *et al.*, 1983; Wildig *et al.*, 2006). Über diese Mechanismen lassen sich auch die weiteren hämatologischen Auffälligkeiten erklären, die Anderson *et al.* 1985 beobachtete. Zwischen d 8-10 und d 17-26 waren im peripheren Blut keine Retikulozyten nachweisbar. Zur gleichen Zeit ließ sich ein Hb-Abfall begleitet von einer Neutro- und Lymphopenie beobachten. Die Thrombozytenzahl blieb im Normbereich, zeigte aber auch einen deutlichen Abfall (Anderson *et al.*, 1985). Bei gesunden Personen spielen diese

Veränderungen und auch ein Hb-Abfall von > 2 g/dl meist eine untergeordnete Rolle, da dies durch die lange Lebenszeit der Erythrozyten kompensiert werden kann (Pasvol, 2006). Zur transienten aplastischen Krise kommt es meist auf dem Boden anderer chronischer Erkrankungen, wie einer hämolytischen Anämie, einer Sichelzellerkrankung, Sphärozytosen oder einer durch Eisenmangel bedingten gesteigerten Erythrozytenproduktion (Pattison *et al.*, 1981; Frickhofen & Young, 1989; Serjeant *et al.*, 1993). Die chronische Anämie ist durch eine dauerhafte Virusvermehrung im Knochenmark bedingt und betrifft hauptsächlich Personen mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten. Dennoch werden diese Verläufe gelegentlich auch bei gesunden Personen beobachtet (Heegaard & Brown, 2002).

Erste Daten zum Vorkommen einer B19V-Infektion bei anämischen Kindern in Ländern südlich der Sahara wurden 1990 von Jones *et al.* aus dem Niger veröffentlicht. In der Malaria-Saison zur Regenzeit fand sich unter 24 anämischen Kindern (Hkt 10-20 %) bei 13 Kindern (54,2 %) eine B19V-Infektion (IgM- oder DNA-Nachweis durch in-situ-Hybridisierung), sieben Kinder hatten zugleich eine Plasmodien-Infektion und zwei eine Sichelzellerkrankung. Während der Trockenzeit fanden sich unter 19 schwer anämischen Kindern nur zwei akute B19V-Infektionen (10,5 %). Auf Grundlage dieser Ergebnisse führte die Arbeitsgruppe eine zweite Untersuchung mit nicht-anämischer Kontrollgruppe im gleichen Studiengebiet durch. Dabei fand sich eine niedrige Prävalenz der Virusinfektion in beiden Gruppen (Anämie: 10,5 % und Kontrollgruppe: 2,5 %). Nachfolgend wurde die Bedeutung der B19V-Infektion für die Entstehung von Anämien hinterfragt und ein erhöhtes Risiko im Rahmen von Virusausbrüchen diskutiert (Jones *et al.*, 1990). Eine geringe Relevanz der Infektion bei anämischen Kindern zeigte auch eine Fall-Kontroll-Studie aus Malawi, wo sich die B19V-Infektion lediglich bei zwei Kindern in der Kontrollgruppe ohne Anämie fand (Yeats *et al.*, 1999).

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse einer Untersuchung aus Papua-Neuguinea, in der Blutproben aus den Jahren 1996-2002 von Kindern im Alter zwischen sechs Monaten und sechs Jahren mit klinischem Verdacht auf Malaria retrospektiv untersucht wurden. In der Fallgruppe mit 169 Kindern, definiert über eine schwere Anämie (Hb < 5 g/dl), fanden sich bei 30,2 % spezifische IgM-Antikörper als Hinweis auf eine akute B19V-Infektion, gegenüber 13,6 % in der zugehörigen Kontrollgruppe. Nach einer multivariaten Analyse stellte sich die B19V-Infektion als unabhängiger Risikofaktor mit ähnlicher Relevanz wie eine Plasmodien-Infektion für die Entwicklung einer schweren Anämie heraus (Wildig *et al.*, 2006). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte etwas später in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie auch in Kenia eine signifikante Assoziation zwischen der B19V-Infektion und einer schweren Anämie. Über fünf Jahre (1999-2004) konnte aber auch eine temporäre Häufung der B19V-Infektion im Jahr 2003 beobachtet werden, was die vorab diskutierte Bedeutung von B19V-Infektionen als

temporärer Risikofaktor für schwere Anämien unterstreicht (Wildig *et al.*, 2010). Auch in zwei weiteren Studien aus den Jahren 2012 und 2013 stellte sich in Papua-Neuguinea und Ghana die B19V-Infektion als Risikofaktor (OR: 75,8; 95%-KI: 15,4-526; $p < 0,01$ und OR: 4,07; 95%-KI: 0,8-20,3) für die Entwicklung einer schweren Anämie heraus (Manning *et al.*, 2012; Duedu *et al.*, 2013). Die aktuellste Studie aus Tansania zeigte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen B19V-Infektion und schwerer Anämie (Tizeba *et al.*, 2018).

In unserer Studienpopulation ist aufgrund der Prävalenz von G6PD-Mangel, Sichelzellerkrankung, Eisen- und andere Mangelanämien, HIV- und *P. falciparum*-Infektionen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber schweren Verläufen der B19V-Infektion denkbar und wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.3. *Plasmodium falciparum*

1.3.1. Epidemiologie

Infektionen mit Plasmodien und die dadurch verursachte Malaria-Erkrankung sind die bedeutendste parasitäre Erkrankung des Menschen. In der WHO-Region Afrika finden sich 93 % aller Erkrankungsfälle, in 99,7 % ist *P. falciparum* der verantwortliche Erreger (WHO, 2019). Die Malaria-Erkrankung wird von verschiedenen Arten der Protozoen der Gattung Plasmodium verursacht. Bisher sind fünf humanpathogene *Plasmodium spp.* bekannt, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesii* und *P. falciparum*, die sich in ihrer geografischen Verteilung, ihrer Virulenz und den typischen Krankheitsverläufen unterscheiden. In afrikanischen Ländern südlich der Sahara sowie in Papua-Neuguinea, Haiti und der Dominikanischen Republik findet sich vor allem *P. falciparum*. Die verursachte Malaria tropica ist durch unregelmäßige Fieberschübe und schwere Verlaufsformen mit zerebraler Malaria gekennzeichnet. In Amerika und Gebieten des westlichen Pazifiks dominiert *P. vivax*, der Erreger der Malaria tertiana mit einer Drei-Tages-Fieberrhythmik. Im Nahen Osten, Ozeanien und Indien finden sich beide Erreger. *P. malariae* sowie *P. ovale* sind generell seltener und finden sich vor allem in Afrika südlich der Sahara. Hingegen ist *P. knowlesii* vor allem im asiatischen Raum (Myanmar, Thailand, Malaysia, Philippinen) anzutreffen (White, 2008; Breman, 2009).

Eine Studie in der Ashanti-Region in Ghana bestätigte *P. falciparum* als häufigsten Malaria-Erreger (Abonuusum *et al.*, 2011). Im Jahr 2016 war die Infektion mit *P. falciparum* bei Kindern unter fünf Jahren in Ghana für 46,7 % der stationären Krankenhausaufenthalte verantwortlich und stellte in dieser Altersgruppe die häufigste Todesursache dar (WHO, 2015; Ghana Health Service, 2017).

1.3.2. Lebenszyklus und Übertragung von *Plasmodium falciparum*

Die Übertragung der Parasiten erfolgt über den Stich verschiedener Arten der Anopheles-Mücke, in der Ashanti-Region in Ghana sind dies *Anopheles gambiae* und *Anopheles funestus*. Die Anzahl infektiöser Stiche pro Jahr lag in der Ashanti-Region zwischen 490 und 866, die Mehrzahl der Stiche erfolgte zwischen 21 Uhr abends und 6 Uhr morgens (Abonuusum *et al.*, 2011).

Nach dem Stich der weiblichen Anopheles-Mücke gelangen die Sporozoiten über die Blutbahn in die Hepatozyten. Hier findet die asexuelle Vermehrung statt, die bei *P. falciparum* 2-10 d dauert (Cowman *et al.*, 2016). Eine Persistenz in den Hepatozyten und damit die Möglichkeit einer erneuten oder erstmaligen Erkrankung an Malaria Jahre nach der Erstinfektion besteht vor allem bei *P. vivax* und *P. ovale*, bei semiimmunen Patienten auch bei *P. falciparum* (White *et al.*, 2014). Nachdem aus einem Sporozoiten bis zu 40.000 Merozoiten entstanden sind, wird die Apoptose der Hepatozyten induziert. Sogenannte Merosomen werden abgeschnürt, welche die Merozoiten vor der körpereigenen Abwehr schützen und die nachfolgende Invasion der peripheren Erythrozyten ermöglichen (Sturm *et al.*, 2006). Innerhalb der Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten unter Verbrauch der vorhandenen Nährstoffe weiter, sodass die zur speziesspezifischen Diagnostik herangezogenen Trophozoiten sichtbar werden. Erst die erythrozytäre Phase wird klinisch symptomatisch, sodass die Inkubationszeit von *P.-falciparum*-Infektionen 12-14 d beträgt. Am Ende der intraerythrozytären Phase werden erneut Merozoiten frei und neue Erythrozyten können befallen werden. Ein Teil der Parasiten entwickelt sich im Blut zur geschlechtlichen Form (Makro- und Mikrogametozyten), die wiederum von Moskitos aufgenommen werden können und den Vermehrungszyklus vervollständigen (White *et al.*, 2014).

1.3.3. Immunreaktion und Labordiagnostik

In Regionen mit ganzjähriger Transmission sind vor allem junge Kinder von schweren Erkrankungsverläufen betroffen (Dondorp *et al.*, 2008). Während der ersten sechs Lebensmonate werden Kinder durch Leihantikörper der Mutter und einen noch relativ hohen Anteil an fetalem HbF, welches das intraerythrozytäre Parasitenwachstum mindert, partiell vor Infektionen geschützt (Pasvol *et al.*, 1976; Dobbs & Dent, 2016). Anders als bei anderen Infektionserkrankungen entsteht nach einer Erkrankung keine lebenslange Immunität. Ältere Kinder und Erwachsene bilden in Endemiegebieten häufig eine Semiimmunität aus, die vor schweren Verläufen der Erkrankung schützt. Nach der Infektion erfolgt die rasche Bildung von Antikörpern, die vor allem gegen die asexuellen Formen der Parasiten im peripheren Blut gerichtet sind. Aus den kurzlebigen Plasmazellen entstehen Gedächtniszellen, die

wahrscheinlich aufgrund von hoher Antigenvarianz bei erneutem Kontakt mit dem Parasiten eine unzureichende Immunantwort vermitteln. Auch die Immunreaktion der T-Zellen scheint eingeschränkt. Gerade die Heterogenität der Parasiten und die relative Spezifität der zugehörigen Immunantwort könnten erklären, warum ein ständiger Kontakt mit dem Erreger für die Immunität nötig ist und keine einzelne Antwort, sondern nur die additive und synergistische Wirkung mehrerer Immunantworten einen anhaltenden relativen Schutz bieten. Die einzelnen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Wie viel Kontakt mit den Parasiten (z. B. wie viele Infektionen pro Jahr) zur Aufrechterhaltung der Semiimmunität notwendig ist, bleibt ebenfalls unklar. Dies erschwert die Messung der Immunität sowie die Entwicklung eines Impfstoffs. Auch wenn die Bestimmung von Antikörperspiegeln möglich ist, so werden für die Definition der Immunität vor allem die Parasitämie im Blut, die Häufigkeit und der Schweregrad der einzelnen Malaria-Episoden herangezogen (Marsh & Kinyanjui, 2006; Fowkes *et al.*, 2016).

Diagnostischer Goldstandard bei Verdacht auf eine Malaria-Erkrankung ist der Nachweis der Parasiten in einem Giemsa-gefärbten Blutaussstrich unter dem Lichtmikroskop. Hierbei können auch Parasitendichte und Plasmodien-Spezies bestimmt werden. Zudem stehen Schnelltests zur Verfügung, die auf Plasmodien-Antigene reagieren. Die Bestimmung von Antikörpern spielt in der Routinediagnostik keine Rolle. Im Rahmen von Studien und zur Resistenzuntersuchungen erfolgt eine zusätzliche PCR-Diagnostik (Bailey *et al.*, 2013).

1.3.4. Pathophysiologie und klinische Symptomatik

Die Symptomatik entsteht vor allem durch den Befall und die Zerstörung der Erythrozyten und die Immunantwort des Körpers. Ein bis zwei Wochen, meist 12-14 d, nach dem Mückenstich und der Übertragung von *P. falciparum* treten unspezifische Symptome wie Fieber, Glieder-, Bauch- und Kopfschmerzen sowie allgemeines Unwohlsein auf (White *et al.*, 2014).

Die infizierten Erythrozyten verlieren an Verformbarkeit und werden zum einen in der Milz vermehrt abgebaut, zum anderen können sie aber auch an der Gefäßwand adhären oder untereinander agglutinieren und zu Mikrozirkulationsstörungen führen. Auch nicht infizierte Erythrozyten unterliegen diesen Veränderungen und verstärken die hämodynamischen Veränderungen (Dondorp *et al.*, 2000). Je nach betroffenem Organ, z. B. Gehirn, Niere, Leber oder Lunge entstehen verschiedene Symptome und Verlaufsformen. Schwere Komplikationen sind hierbei die zerebrale Malaria, die Aktivierung einer disseminierten intravasalen Gerinnung, die Entwicklung eines Lungenödems sowie eines Nierenversagens (White *et al.*, 2014).

Das auftretende Fieber ist als Immunreaktion gegen die Parasiten gerichtet und wird hauptsächlich durch die Ruptur der Erythrozyten ausgelöst. Temperaturen von $> 40^{\circ}\text{C}$ schädigen die reifen Parasiten direkt. Die Fieberverläufe sind zum Teil charakteristisch für die Plasmodien-Art, bei der durch *P. falciparum* bedingten Malaria tropica findet sich jedoch ein unregelmäßiger Fieberverlauf (WHO, 2014).

Die von Plasmodien bedingte Immunsuppression kann das Auftreten von Konfektionen z. B. mit Enteritis-Salmonellen oder B19V begünstigen (Menendez *et al.*, 2000). Aufgrund der Häufigkeit solcher Koinfektionen ist es denkbar, dass die Zahl indirekter Malaria-bedingter Todesfälle höher ist als die der direkten (Cowman *et al.*, 2016).

Zur Behandlung der verschiedenen Malariaformen stehen mehrere wirksame Medikamente zur Verfügung, wobei Resistenzbildungen weltweit ein zunehmendes Problem darstellen. Trotz Forschung und Erprobung von Wirkstoffen in Studien ist derzeit noch keine Impfung verfügbar. Mechanismen zur Vektorkontrolle beinhalten unter anderem die Verwendung von Mückenschutzmitteln, die Nutzung imprägnierter Moskitonetze sowie den Einsatz von Chemoprophylaxe (Cowman *et al.*, 2016).

1.3.5. Anämie bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum*

Durch schwere Malaria bedingte Anämie mit Hypoxie und Herzversagen ist ein wichtiger Faktor der Morbidität und Letalität. Sie wird für mehr als die Hälfte der Todesfälle bei Malaria-Erkrankungen verantwortlich gemacht, mit einer Todesfallrate (Case-Fatality-Rate) von 8-18 % im hospitalisierten Bereich (Crawley, 2004).

Innerhalb von 48 h nach Fieberbeginn rupturieren Erythrozyten durch die intraerythrozytäre Vermehrung der Parasiten (Menendez *et al.*, 2000). Hierbei wurde ein direkter negativer Zusammenhang zwischen der Höhe der Parasitämie und der Stärke des Hb-Abfalls beobachtet (Jakeman *et al.*, 1999). Außerdem verlieren infizierte Erythrozyten an Verformbarkeit und werden vermehrt durch das retikuloendotheliale System abgebaut. Dies lässt sich auch bei nicht infizierten Zellen beobachten und hat wahrscheinlich den größten Einfluss auf die Entwicklung der Anämie (Lamikanra *et al.*, 2007). Sowohl klinische Beobachtung als auch mathematische Modelle legen nahe, dass für jeden infizierten und rupturierten Erythrozyten im Schnitt 8,5 weitere Erythrozyten abgebaut werden (Jakeman *et al.*, 1999). Im Zuge der Erkrankung entwickelt sich ein Hypersplenismus, der wiederum gerade bei wiederholter Infektion für einen verstärkten Erythrozytenabbau sorgt. Zudem können autoimmune Hämolysefaktoren einen Beitrag leisten (Menendez *et al.*, 2000). Als dritter Mechanismus kommt es während der akuten Erkrankung zu einer gestörten Produktion von

Erythrozyten. Dabei finden sich stark reduzierte Retikulozytenzahlen sowie eine Dyserythropoese. Dies wird unter anderem auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interferon- γ und Tumor-Nekrose-Faktor- α zurückgeführt, welche die Erythropoese und Ausdifferenzierung auf allen Stufen hemmen. Die resultierende Anämie ist klassischerweise normochrom-normozytär (Lamikanra *et al.*, 2007). Von Malaria-bedingter Anämie sind in Endemiegebieten vor allem jüngere Kinder betroffen, da sie an höheren Parasitendichten leiden und noch keine Semiimmunität aufgebaut haben (Menendez *et al.*, 2000).

Die Erholung des Hb-Wertes auf ein normales Niveau dauert regulär bis zu sechs Wochen, bei Patienten mit wiederholten Infektionen oder ausgeprägter Anämie auch länger (Price *et al.*, 2001). Über einen längeren Zeitraum hinweg tragen wiederholte Krankheitsepisoden zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Anämie bei (White *et al.*, 2014).

Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass eine Anämie vor Infektionen mit *P. falciparum* schützen könnte. Erythrozyten eisendefizienter Individuen zeigten sich weniger anfällig für eine Infektion mit *Plasmodien*, das präferierte Ziel der Parasiten scheinen junge Erythrozyten zu sein (Clark *et al.*, 2014). Basierend auf Studiendaten aus Gambia wurde ein durch Anämie bedingter Wachstumsrückgang der Plasmodien von 15,9 % berechnet. Diese Beobachtung verleitete Goheen *et al.* zu der Überlegung, ob dauerhaft niedrige MCV- und Hb-Werte durch ihren protektiven Effekt eventuell auf genetische Veranlagung zurückzuführen sind und aufgrund des evolutionsbiologischen Selektionsvorteils heutzutage in diesen Regionen besonders häufig vorkommen (Goheen *et al.*, 2016). Die Daten dieser Studie legten auch eine Wachstumsinduktion der Parasiten durch Eisensupplementierung nahe, da es zu gesteigerter Produktion junger Erythrozyten kommt. Ein Eisenmangel führt nicht nur zu mikrozytären Erythrozyten, sondern verkürzt durch Verminderung der Verformbarkeit und durch gesteigerten oxidativen Stress die mittlere Zirkulationsdauer der Erythrozyten von 120 auf 90 d, sodass die Erythrozyten ähnlich wie ältere Erythrozyten für die Plasmodien weniger attraktiv scheinen (Brandão *et al.*, 2009; Goheen *et al.*, 2016). Goheen *et al.* zeigten, dass Erythrozyten anämischer Kinder sowohl gegenüber Wildtyp-Plasmodien als auch gegenüber Laborstämmen partiell resistent waren (Goheen *et al.*, 2016). Sie forderten, Eisensupplementierungen in Endemiegebieten zukünftig mit einer Malaria-Prophylaxe zu begleiten, obwohl unklar ist, ob das gesteigerte *in-vitro*-Wachstum der *Plasmodien* mit einem erhöhtem Malaria-Erkrankungsrisiko verbunden ist.

1.4. Koinfektion mit *Plasmodium falciparum* und Parvovirus B19

Die bereits erwähnten hohen Prävalenzen beider Erkrankungen in afrikanischen Ländern südlich der Sahara machen ihr Vorkommen als Koinfektion sowie eine eventuell synergistische Wirkung auf die Entwicklung einer Anämie gerade im längeren zeitlichen Verlauf über die unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen der beiden Erkrankungen denkbar.

Die erste Studie zu Koinfektionen von B19V und *P. falciparum* und der Häufigkeit von Anämie stammt aus dem Jahr 1990 und beschrieb eine pädiatrische Population im Niger. In der Malaria-Saison (Regenzeit) fand sich unter 24 anämischen Kindern (Hkt 10-20 %) bei sieben Kindern (29,2 %) eine Koinfektion mit B19V, während der Trockenzeit hingegen zeigten sich unter den 19 Kindern mit Anämie nur zwei B19V-Monoinfektionen. In einer Folgestudie ergab sich eine niedrige Prävalenz der Virusinfektion, sodass die Relevanz von Koinfektionen vor allem im Rahmen von Ausbrüchen diskutiert wurde (Jones *et al.*, 1990).

In einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie aus Kenia, in der Blutproben schwer anämischer Kinder (Hb < 5 g/dl) unter sechs Jahren aus den Jahren 1999-2004 analysiert wurden, fand sich keine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen der Koinfektion und einer schweren Anämie. Die Koinfektion fand sich bei 2,3 % der anämischen Kinder und 1,2 % der zugehörigen Kontrollgruppe ohne Anämie (Wildig *et al.*, 2010).

Unter anämischen Kindern in Accra, Ghana, fand sich die Koinfektion mit einer Häufigkeit von 2,6 % (41,9 % Malaria, 4,7 % B19V) und stellte sich in der Analyse als wichtiger Risikofaktor auf das Vorliegen einer Anämie heraus (Duedu *et al.*, 2013). Auch in Gabun zeigten sich in der Gruppe mit milder *P.-falciparum*-Infektion und B19V-Infektion deutlich niedrigere Hkt-Werte als bei *P.-falciparum*-Monoinfektionen (Toan *et al.*, 2013). Tizeba *et al.* postulierten, dass Kinder mit *P.-falciparum*-Infektion eine höhere Wahrscheinlichkeit einer zeitgleichen B19V-Infektion hätten als Kinder ohne *P.-falciparum*-Infektion (OR: 6,0; 95%-KI: 2,2-16,8; p < 0,01). Ob eine Koinfektion die vorliegende Anämie verstärkte, blieb jedoch unklar (Tizeba *et al.*, 2018). Die Anämien im Rahmen von Koinfektionen wurden bisher als vorwiegend mikrozytär beschrieben (Duedu *et al.*, 2013).

Detaillierte Informationen zum klinischen Verlauf von Koinfektionen finden sich nur in wenigen Fallberichten. So wurde ein siebenjähriger Junge aus Indien mit Fieberanamnese, herabgesetztem Allgemeinzustand, Blässe und Hepatosplenomegalie nach positiver Malaria-Diagnostik und Anbehandlung mit Chloroquin zunächst wieder entlassen. Bei Wiedervorstellung 4 d später zeigten sich eine verstärkte Blässe und erneut Fieber, ein von vormals 9,1 g/dl auf 6,3 g/dl gefallener Hb-Wert, ein verminderter Retikulozyten-Anteil von 0,3 % und ein negativer Blutausschlag. Im Verlauf benötigte der Junge zwei Bluttransfusionen und

erholte sich wieder. Die serologischen Untersuchungen wiesen B19V-spezifische IgM-Antikörper nach. Zwei Wochen nach Entlassung fanden sich eine Serokonversion mit Nachweis spezifischer IgG-Antikörper (Gupta, 2005). Ein ähnlicher Verlauf wurde im Jahr 2003 von Urganci *et al.* ebenfalls aus Indien berichtet (Urganci *et al.*, 2003).

1.5. Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, können beide Infektionen über verschiedene Pathomechanismen zu einer Anämie führen. Damit ist die Fragestellung naheliegend, ob Patienten mit beiden Infektionen schwerer betroffen sind als Patienten mit nur einer der beiden Infektionen. Die aktuelle Studienlage findet auf diese Frage noch keine einheitliche Antwort.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde den folgenden vier Kernfragen in einer pädiatrischen Studienpopulation in Ghana nachgegangen:

- I. Wie häufig ist die Infektion mit B19V unter hospitalisierten Kindern mit fieberhafter Erkrankung?
- II. Besteht bei einer Koinfektion mit B19V und *P. falciparum* ein höheres Risiko, an einer schweren Anämie zu erkranken im Vergleich zu einer Monoinfektion mit B19V oder *P. falciparum*? Falls ja, besteht ein additiver oder multiplikativer Effekt?
- III. Führen Koinfektionen zu niedrigeren Hb-Werten, also einer schwereren Anämie, im Vergleich zu Monoinfektionen?
- IV. Wie unterscheidet sich der Krankheitsverlauf, insbesondere die Dauer der Erkrankung, bei einer Koinfektion zu den jeweiligen Monoinfektionen?

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Die zugrunde liegenden Daten wurden als Teilstudie im Rahmen der „Fever-Without-Source“-Studie (FWS-Studie) am Agogo Presbyterian Hospital in Ghana erhoben. Im Zeitraum vom 5. November 2013 bis zum 30. April 2015 wurden Kinder unter 15 Jahren, die mit mindestens 38,0°C Fieber (tympanale Messung) auf die Kinderstation aufgenommen wurden, nach Aufklärung und Einverständnis der Eltern eingeschlossen. Insgesamt wurden 1.238 Patientenfälle in die Studie aufgenommen.

Einschlusskriterien:

- Alter < 15 Jahre
- Temperatur mindestens auf einer Seite $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ (tympanale Messung)
- Aufnahme auf die Kinderstation
- Zustimmung der Eltern oder der Begleitperson

Ausschlusskriterien:

- Teilnahme an einer anderen Studie
- Widerrufung der Einwilligung

Ziel der FWS-Studie war es, durch umfangreiche Labordiagnostik die Ursache der zur Aufnahme führenden Fiebererkrankung zu ermitteln und die Häufigkeit und Bedeutung von Koinfektionen in dem Malaria-Endemiegebiet zu erörtern. Koinfektionen in Gebieten mit endemisch vorkommender Malaria sind häufig und können die Symptomatik, den Erkrankungsverlauf und die Therapieoptionen beeinflussen. Herauszufinden, welche Erreger hier eine besondere Rolle spielen, war ein Teilziel der Studie. Zusätzlich ging es im Rahmen der FWS-Studie um die Etablierung eines diagnostischen Algorithmus für medizinisches Personal zur evidenzbasierten klinischen Diagnostik bei Fiebererkrankungen im stationären Bereich. Der Dokumentationsbogen „*Case Report Form*“ (siehe Anhang) wurde nach diesem System aufgebaut, sodass das ärztliche Personal die Befunde der klinischen Untersuchung direkt eintragen konnte. Bei bestimmten Symptom- und Befundkonstellationen wurde eine erweiterte Diagnostik eingeleitet. So wurden beispielsweise bei Fieber über 39,0°C mit begleitender Leukozytose oder auch schwerer respiratorischer Symptomatik (interkostale Einziehungen, Nasenflügeln, paradoxe Atmung) eine Röntgenaufnahme des Thorax und ein Legionellen-Schnelltest durchgeführt. Diese wurden ebenfalls zur Auswertung der Daten herangezogen. Zur erweiterten Diagnostik zählten zudem Ultraschall-Untersuchung und Labor-Untersuchungen von Stuhl- und Liquorproben.

Neben der körperlichen Untersuchung wurden von jedem Kind Serum- und Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Blutproben, Blutkulturen, eine Urinprobe und ein Nasen-/Rachenabstrich gewonnen. Aus der Blutprobe wurde ein Blutaussstrich zur Malaria-Diagnostik und ein Blutbild angefertigt. Aus allen Proben wurde anschließend RNA/DNA extrahiert und in die weitere molekulare Diagnostik eingeschleust. Auf diese Weise war die Bestimmung der Häufigkeit und Verteilung verschiedener Krankheitserreger möglich. Gerade bei selteneren Erregern ist die Frequenz und damit klinische Relevanz in der Studienpopulation unbekannt. Kinder ab einem Alter von zwei Jahren wurden bei zusätzlicher Einwilligung der Eltern auf eine Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) untersucht. (Hogan *et al.*, 2018).

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde ein Teil der Daten der FWS-Studie unter den oben genannten Fragestellungen (Kapitel 1.5.) erhoben und ausgewertet. Dabei wurden alle Datensätze ausgeschlossen, für die keine vollständige B19V-Diagnostik vorlag. Bei wiederholtem Einschluss eines Kindes in die Studie und wiederholt positiver B19V-Diagnostik wurde lediglich die erste Rekrutierung mit positiver B19V-Diagnostik in die weitere Analyse eingeschlossen.

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Arbeitsgruppe für Infektionsepidemiologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg und in Agogo, Ghana durchgeführt. Die direkte Betreuung erfolgte durch Dr. Benno Kreuels aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen May. Die Bearbeitung des Projekts erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Helmut Fickenscher vom Institut für Infektionsmedizin in Kiel und schloss gemeinsame Laboruntersuchungen und Projektbesprechungen ein.

2.2. Erfassung des Krankheitsverlaufs

Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs wurden die Kinder während des Aufenthaltes bis zur Entlassung begleitet (*Inpatient Review*, IR) und im Anschluss an ihren Aufenthalt in ein einmonatiges Follow-up-System (Follow-up-Untersuchungen 1 und 2, F1/2) eingeschleust. Jeder „Patientenfall“ wurde mit dem zweiten Follow-up-Besuch abgeschlossen, unabhängig von der Wahrnehmung des Termins. Damit wurde eine erneute Rekrutierung des Kindes bei späterer Krankenhausaufnahme mit Erfüllung der Einschlusskriterien möglich. Abb. 3 zeigt eine schematische Übersicht der Erfassung des Krankheitsverlaufes über den Beobachtungszeitraum von einem Monat. Jedes Studienkind bekam zu Anfang eine persönliche Studiennummer, die auch für alle Datenerhebungen nach d 0 genutzt wurde, jeweils mit dem Zusatz IR1/2/3/5/7 für die *Inpatient Reviews* oder F1/2 für die Follow-Up-Untersuchungen. Die genaue Durchführung aller Untersuchungen/Datenerfassungen wurde in *Standard Study Procedures* festgelegt.

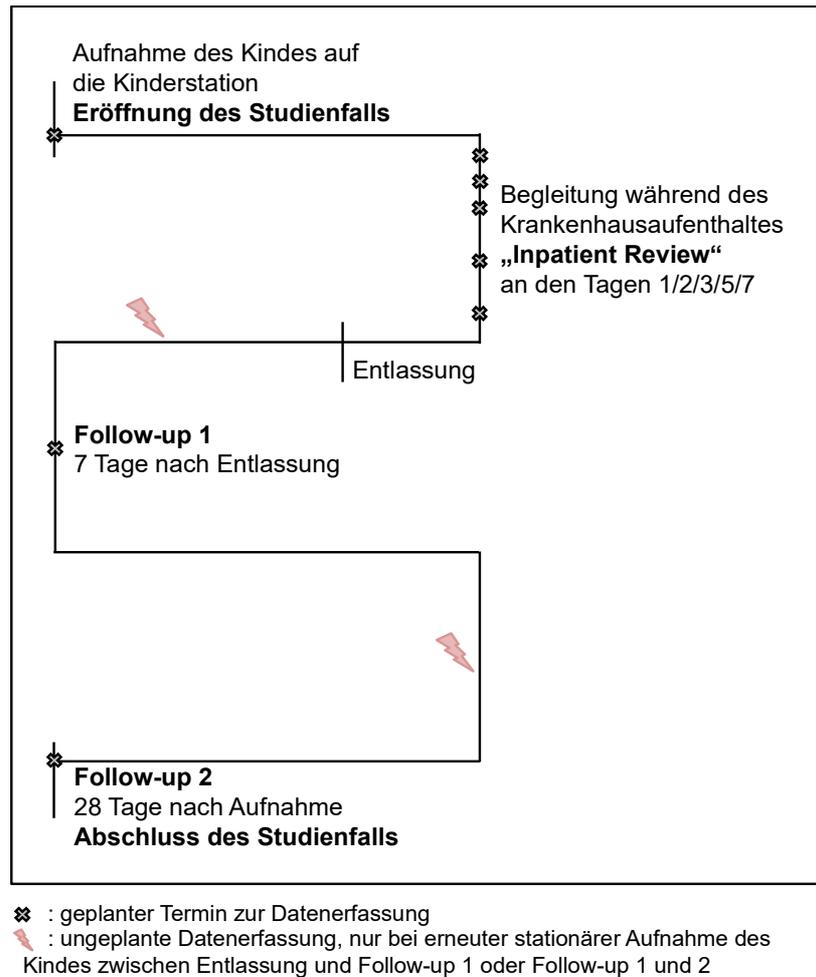


Abb. 3. Studiendesign zur Erfassung des Krankheitsverlaufes - Mit der Rekrutierung des Kindes am Aufnahmetag wurde der Studienfall eröffnet. Je nach Länge des Krankenhausaufenthaltes wurde das Kind an den d 1, 2, 3, 5 und 7 im *Inpatient-Review* begleitet. Sieben Tage nach der Entlassung erfolgte das Follow-up 1. Mit dem Follow-up 2 zum Zeitpunkt 28 d nach Aufnahme wurde der Studienfall abgeschlossen. Neben diesen geplanten Terminen der Datenerfassung wurden auch bei ungeplanter erneuter Aufnahme die klinischen Eckdaten dokumentiert.

Inpatient Review: Je nach Länge des Krankenhausaufenthaltes wurden die Kinder und ihre Begleitpersonen an den d 1, 2, 3, 5 und 7 nach der Aufnahme anhand eines Fragebogens zu den Krankheitssymptomen befragt. Hierbei wurden Informationen zum Allgemeinzustand sowie zu respiratorischer, gastrointestinaler und neurologischer Symptomatik abgefragt. Außerdem wurden von einer geschulten Mitarbeiterin die Atemfrequenz, die Sauerstoffsättigung (Finger-Pulsoximeter Nonin® Onyx® Vande 9590, Tilburg, Niederlande), der Puls und die Temperatur gemessen. Im Anschluss wurde durch Laborpersonal eine kapilläre Blutentnahme durchgeführt. Mit dem HemoCue® wurde der Hb-Wert direkt ermittelt und der Rest der Blutprobe anschließend für die Anfertigung eines Blutausriches zur Malariadiagnostik verwendet. Anhand der Krankenakte wurden weitere Untersuchungen, die aktuelle Medikation sowie durchgeführte Bluttransfusionen dokumentiert.

Follow-up 1 und 2: Vor der Entlassung bekamen die Patienten zwei Termine für Folgebesuche. Das Follow-up 1 wurde 7 d nach der Entlassung aus dem Krankenhaus terminiert, das Follow-up 2 28 d nach dem Aufnahmetag. Für die Wahrnehmung dieser Termine erhielten die Familien eine Aufwandsentschädigung zur Deckung der Transportkosten. Die Termine wurden auf der persönlichen Studien-ID-Card eingetragen und diese bei Entlassung mitgegeben. Zudem wurden alle Patienten, die bei der Aufnahme eine Mobiltelefonnummer angaben, über ein automatisches Anrufsystem an den Termin für das Follow-up 2 erinnert. Aufgrund der schlechten Netzwerk-Abdeckung war die telefonische Erreichbarkeit eingeschränkt. Familien in Agogo und den Nachbarorten Hwidiem und Ananekrom wurden daher persönlich an den Termin erinnert.

Für den Besuch des Follow-up 1 gab es eine Toleranzspanne von plus/minus zwei Tagen. Neben einem Fragebogen zum Krankheitsverlauf nach der Entlassung wurde eine kapilläre Blutentnahme zur Messung des Hb-Wertes und Anfertigung eines Blutausriches durchgeführt. Der Termin für das Follow-up 2 wurde unabhängig von der Dauer des Krankenhausaufenthaltes für d 28 nach der Aufnahme vereinbart. Hierbei wurde eine Abweichung von plus/minus 3 d toleriert. Der aktuelle Gesundheitszustand wurde anhand eines Fragebogens erfasst. Außerdem wurden venöse Blutproben (EDTA und Serum) entnommen, welche die Ermittlung des Blutbildes, die Anfertigung eines Blutausriches sowie spätere RNA-/DNA-Analysen und serologische Untersuchungen ermöglichte. Mit Ablauf des Termins zum Follow-up 2 wurde der Studienfall unabhängig von der Teilnahme des Kindes abgeschlossen. Wurden die Kinder innerhalb des Follow-up-Zeitraums erneut auf die Kinderstation aufgenommen, wurde dies als ungeplante Aufnahme erfasst, damit mögliche Erkrankungskomplikationen dokumentiert werden konnten. Dabei wurden ein Blutbild und ein Blutausrich angefertigt.

2.3. Studiengebiet und -population

Das Agogo Presbyterian Krankenhaus, in dem die Studie durchgeführt wurde, liegt in der Stadt Agogo im Distrikt Asante Akim North der Ashanti-Region in Ghana. Das Gebiet umfasst circa 1.160 km² und ist von immergrünem Regenwald bewachsen, der jedoch in weiten Teilen abgeholzt ist. Das Klima ist durch zwei Regenzeiten von Mai bis Juli und September bis November gekennzeichnet. Die Trockenzeit von Dezember bis April wird durch den Passatwind Harmattan bestimmt. Die jährliche Durchschnittstemperatur liegt bei 26°C. Zahlen des Ghana Statistical Service zufolge lebten im Jahr 2010 im Distrikt Asante Akim North 140.694 Menschen, wovon 40 % unter 15 Jahre, 55 % 15-64 Jahre und nur 5 % über 65 Jahre alt waren. Agogo hatte im Jahr 2012 rund 31.800 Einwohner. Die Hälfte der Bevölkerung lebt

vom Ackerbau, gefolgt von Handel und einer Beschäftigung im Bildungssystem (Asante Akim Central Municipal Assembly, 2012; Statistical Service Ghana, 2012).

Das Agogo Presbyterian Krankenhaus hatte während des Studienzeitraums 223 Betten und 385 Beschäftigte, davon 19 Ärzte und Ärztinnen. Es verfügt über die Fachrichtungen Innere Medizin, Allgemeinchirurgie, Intensivmedizin, Pädiatrie und Neonatologie, Gynäkologie und Geburtshilfe, Augenheilkunde sowie über einen Zahnarzt. Ein Labor, ein Röntgengerät und ein Ultraschallgerät standen zur Verfügung. Außerdem befanden sich ein Zentrum für Physiotherapie und eine Apotheke auf dem Krankenhausgelände. Die Kinderstation war mit 50 Betten die größte Station und hatte neben vier großen Zimmern mit 10-14 Betten zwei kleinere Isolationsräume mit maximal zwei Betten. Blutentnahmen und ein engmaschigeres Monitoring (Sauerstoffgabe, Bluttransfusionen, Elektrokardiogramm) erfolgten im Behandlungsraum der Station.

Im Studiengebiet ist die durch *P. falciparum* hervorgerufene Malaria tropica endemisch (Abonuusum *et al.*, 2011). Trotz sinkender Prävalenz besteht in Ghana eine verbreitete HIV-Epidemie. Im Jahr 2015 lag die Prävalenz bei 1,8 %, in der Ashanti-Region bei 2,7 % (Ghana Health Service, 2016).

Verschiedene Grunderkrankungen und Infektionen können für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Anämien verantwortlich sein (Kapitel 1.1.3.). Die Prävalenz des G6PD-Mangels bei Kindern der Ashanti-Region lag im Jahr 1998 bei 12,2 % (Burchard *et al.*, 2001). Aktuellere Daten aus dem Süden des Landes zeigen eine Prävalenz von 10,6 % (Amoah *et al.*, 2016). Burchard *et al.* veröffentlichten zudem im Jahr 2001 Daten, die eine Prävalenz heterozygoter Sichelzellträger (HbAS) bei Kindern im Distrikt Asante Akim North von 10,4 % zeigten (Burchard *et al.*, 2001). Im Nachbarbezirk unseres Studiengebiets fanden sich 2,0 % homozygote Träger der Sichelzellkrankheit (HbSS, HbSC, HbCC) und 10,9 % heterozygote Anlageträger (HbAS) (Kreuels *et al.*, 2010).

Nach Krumkamp *et al.* lag die Prävalenz von Hakenwürmer-Infestation bei Kindern in unserem Studiengebiet in den Jahren 2007/2008 bei 0,4-0,7 %, sodass dies in der Region auf das Vorkommen und Aufrechterhalten von Anämien keinen wesentlichen Einfluss zu haben scheint (Krumkamp *et al.*, 2015). Auf Grundlage dieser Daten wurde in der vorliegenden Studie keine Hakenwurm-Diagnostik durchgeführt.

2.4. Ethik

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Der Antrag zur Durchführung der Studie wurde bei der zuständigen Ethikkommission „*Committee on Human Research, Publications and Ethics, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, School of Medical Sciences & Komfo Anokye Teaching Hospital*“ gestellt, die im November 2013 ihre Erlaubnis zur Durchführung der Studie erteilte. Auch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigte die Studiendurchführung (Dokumente im Anhang).

2.5. Datenerfassung

Die Dokumentation der Daten erfolgte auf Englisch. Die Gespräche mit Patienten und Begleitpersonen wurde je nach Sprachkenntnissen durch Studienpersonal auf Englisch, Twi oder anderen lokalen Sprachen durchgeführt. Die genaue Durchführung der Datenerhebung wurde in einer *Standard Study Procedure* festgelegt. Die Identifizierung der Kinder und ihrer zugehörigen Fragebögen und Proben erfolgte anhand einer individuellen Studiennummer und eines Barcodes, sodass die anschließende Datenauswertung anonymisiert erfolgen konnte. Als zusätzliche Zuordnungskriterien wurden auch die durch das Krankenhaus verwendete Identifikationsnummer und das Datum auf den Formularen vermerkt. Nach Dokumentation der Ergebnisse in Papierform wurden die Daten zweifach in eine auf OMNIS Studio v.6 (TigerLogic, Kalifornien, USA) basierte Datenbank eingegeben.

2.6. Messungen und Laboranalyse

2.6.1. Temperaturmessung

Am Tag der Aufnahme wurde die Messung der Temperatur von Krankenhauspersonal, alle weiteren Male durch geschultes Studienpersonal durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Infrarot-Ohr-Thermometer (Thermoscan IRT 4020; Braun, Melsungen) in beiden Ohren, wobei jeweils die höhere der gemessenen Temperaturen als Einschlusskriterium für die Studie gewertet wurde.

2.6.2. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte unter aseptischen Bedingungen durch examinierte Krankenpfleger/innen. Nach zweifacher Desinfektion wurde eine periphere Vene punktiert und zunächst wurden 1-3 ml Blut für die Blutkultur entnommen, im Anschluss wurden zwei weitere

Röhrchen (EDTA und Serum) gefüllt. Alle Proben wurden unverzüglich am Entnahmeort mit der zugehörigen Studiennummer, dem Barcode, sowie Datum und Uhrzeit versehen.

Das Blutbild sowie der Blutausschrieb wurden direkt nach der Blutentnahme im Studienlabor angefertigt. Für das Blutbild wurde das Gerät KX-21N™ (Automated Hematology Analyzer; Sysmex Europe, Norderstedt) benutzt, deren Funktionalität regelmäßig kontrolliert wurde. Für die *Inpatient Reviews* und den ersten Follow-up Besuch wurde der Hb-Wert in einer kapillären Blutprobe mit dem Gerät HemoCue® Hb 201+ System bestimmt (HemoCue, Ängelholm, Schweden). Die photometrische Messung beruht auf einer modifizierten Cyanmethämoglobin-Reaktion. Zur Anfertigung des Blutausschriebs wurden einige Tropfen in einem EDTA-Mikrotube aufgefangen.

2.6.3. Diagnostik von Parvovirus B19

DNA-Extraktion: Die für die B19V-Diagnostik benötigte DNA-Extraktion aus dem Serum der Patienten wurde am *Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine (Kumasi, Ghana)* durchgeführt. Die DNA-Extraktion erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers mit dem RTP® Pathogen Kit (Strattec Molecular, Birkenfeld) und anhand eines internen Studienprotokolls.

PCR: Der qualitative Nachweis der B19V-DNA durch Light-Cycler®-PCR wurde am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin nach einem etablierten Protokoll des Instituts für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel, durchgeführt (Akkreditierung nach EN DIN ISO 15189). Die validierte Nachweisgrenze des Verfahrens betrug bei einem 95%-Konfidenzintervall 300 Viruskopien pro ml Patientenextrakt. Der LightCycler® 480 untersuchte während einer PCR 384 Proben. Bei Anwesenheit von DNA wird diese mit Sonden mit Farbstoff markiert, die ausgehende Fluoreszenzstrahlung photometrisch erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Eine Übersicht der verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien findet sich in Tab. 2.

Insgesamt wurden 1.236 Patientenproben getestet. Aufgrund der erwarteten, relativ niedrigen Prävalenz von maximal 10 % wurden die Proben vorab in Fünfer-Pools zusammengefasst. Die Pools hatten ein Volumen von 25 µl und enthielten damit je 5 µl einer Patientenprobe. Aus den 1.236 Patientenproben entstanden so 247 Pools, wobei der letzte Pool sechs Patientenproben enthielt (30 µl). Alle Pools mit positivem PCR-Ergebnis wurden im Anschluss wieder aufgelöst und jede Patientenprobe separat erneut nach demselben PCR-Schema getestet. Ein Pool wurde als positiv betrachtet, sobald die Fluoreszenzintensität über einen Hintergrund von 1,275 RFU (*relative fluorescence units*) stieg und die Inhibitionskontrolle positiv war.

Tab. 2. Parvovirus B19, PCR: Reagenzien/Verbrauchsmaterial

Reagenzien und Verbrauchsmaterial	Hersteller
B19V, Plasmid, DNA Kontrolle, Amplirun [®] MBC080	Vircell, Granada, Spanien
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Filtertips, Rainin: 0,5-10, 10-100, 50-200, 200-1000 µl	Mettler-Toledo, Gießen
λ DNA, SD0011	Thermo Scientific, Waltham, Mass., USA
LightCycler [®] R 480	Roche, Mannheim
LightCycler [®] R 480 Probes Master, 04707 494 001	Roche, Mannheim
LightCycler [®] -Platten: 384-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
LightCycler [®] qPCR Klebefolie	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroliterpipetten, Rainin: 0,5-10, 10-100, 50-200, 200-1000 µl	Mettler-Toledo, Gießen
Oligonukleotide: Primers PVB19P1, PVB19P2 (100 µM), Sonde B19vp2_TM	Tib Molbiol, Berlin
Oligonukleotide: Primer für Interne Kontrolle (λ) Lambda-F; Lambda-R, Sonde für Interne Kontrolle (λ) LAM TM2	Tib Molbiol, Berlin
Vortex VF2 Schüttler	IKA [®] -Labortechnik, Staufen im Breisgau

Je LightCycler[®]-Ansatz wurden drei positive Kontrollen in unterschiedlichen Konzentrationen und eine negative Kontrolle in der PCR mitgeführt. Die Positivkontrollen hatten eine Ausgangskonzentration von 25 pmol/µl und wurden in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 als Kontrolle der PCR verwendet. Als negative Kontrolle dienten 10 µl des Mastermixes vermischt mit 5 µl Wasser. Zur Vorbereitung einer PCR wurde eine Probenübersicht für die 384-Well-Platte erstellt und die zugehörigen Proben sowie Reagenzien wurden aufgetaut. Der Mastermix wurde vor jeder PCR nach festem Pipettierschema hergestellt (Tab. 3).

Der Mastermix für die Einzel-PCRs wurde ohne die Zugabe von Lambda-F, Lambda-R, LAM-TM2 und λ-DNA (6 pg/µl) hergestellt, da eine Inhibition der Polymerase in der Testung der Pools bereits ausgeschlossen wurde. Das fehlende Volumen wurde durch 1,75 µl Wasser ersetzt. Zunächst wurde jede Vertiefung der 384-Well-Platte mit 10 µl des Mastermixes gefüllt. Im Anschluss wurden je 5 µl der aufgetauten und gevortexten Patienten-DNA-Extrakte hinzugefügt. Auch die Positiv- und Negativkontrollen wurden auf die Platte aufgetragen. Im Anschluss wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und bei 1.200 Umdrehungen/min zentrifugiert (Centrifuge 5804 R). Nach Einsetzen der Platte in den LightCycler[®] R 480 wurde das vorab eingegebene Programm gestartet (Tab. 4).

Tab. 3. Pipettierschema für den Mastermix in der Parvovirus-B19-PCR

Reagenz	Menge [µl]
LightCycler [®] 480 Probes Master, enthält Polymerase	7,5
B19vp2_TM (10 pmol), Fluoreszenz-Sonde	0,25

2. Material und Methoden

B19vp2_F (10 pmol), Vorwärts-Primer	0,25
B19vp2_R (10 pmol), Reverse-Primer	0,25
Lambda-F (10 pmol), Vorwärts-Primer	0,25
Lambda-R (10 pmol), Reverse-Primer	0,25
LAM TM2 (10 pmol), Fluoreszenz-Sonde	0,25
λ -DNA (6 pg/ μ l), interne Kontrolle	1,0

Tab. 4. Parvovirus-B19-PCR-Schema

Temperatur	Zeit	Aktivität	Anzahl der Zyklen
40°C	10 min	Aktivität der Uracylglykosylase	1
95°C	10 min	Inaktivierung	1
95°C	10 s	Denaturierung der DNA,	45
60°C	30 s	Anlagerung der Primer und Amplifikation	
40°C	30 s	Abkühlung	1

Die Dauer der PCR betrug 65 min. Die digital erhobenen Ergebnisse wurden ausgedruckt, ausgewertet und in die Datenbank eingepflegt. Die PCR-Primer und Probensequenzen umfassten Sequenzen aller drei Genotypen. Die B19V-spezifischen Primer und Sonden zielten auf die VP2-Region des Virus: B19vp2F (TGG-CCC-ATT-TTC-AAG-GAA-GT), B19vp2r (CTG-AAG-TCA-TGC-TTG-GGT-ATT-TTT-C) und B19vp2TM (6FAM-CCG-GAA-GTT-CCC-GCT-TAC-AAC-BBQ). Die interne λ -Phagen-DNA-Kontrolle wurde über folgende Primer und Sonden detektiert: Lambda-F (ATG-CCA-CGT-AAG-CGA-AAC-A), Lambda-R (GCA-TAA-ACG-AAG-CAG-TCG-AGT) und LAM-TM2 (YAK-ACC-TTA-CCG-AAA-TCG-GTA-CGG-ATA-CCG-BBQ).

IgM-/IgG-Serologie: Die Patientenproben wurden zunächst mit dem Biotrin-Testkit auf das Vorhandensein von IgM- und IgG-Antikörpern untersucht (Liaison Biotrin, Parvovirus B19 IgG, IgM ELISA, DiaSorin, Italien). Ein Teil wurde im Anschluss zusätzlich mit den *recomWell*- und *recomLine*-Testkits der Firma Mikrogen (*recomWell/recomLine* Parvovirus B19 IgM/IgG, Mikrogen, Neuried) getestet. Eine Übersicht zeigt Abb. 4.

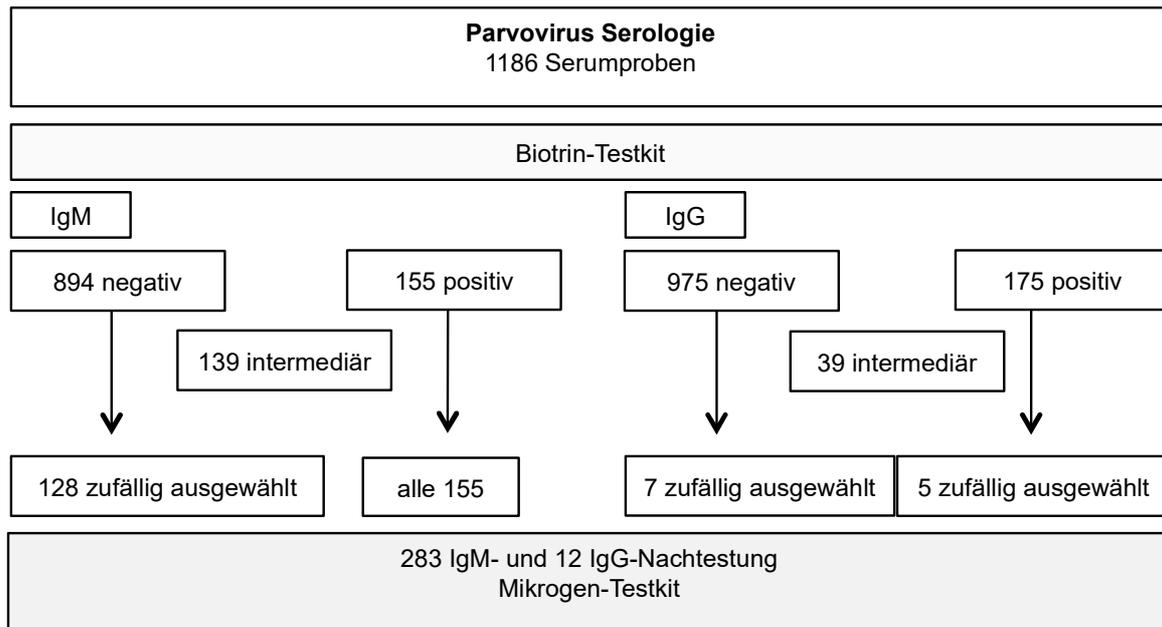


Abb. 4. Schema der serologischen Diagnostik - Zunächst wurden 1.186 Serumproben mit dem Biotrin-Testkit untersucht. Im Anschluss erfolgte die Nachtestung mit dem Mikrogen-Testkit aller 155 zuvor IgM-Antikörper positiven Proben, sowie 128 zufällig ausgewählter, zuvor IgM-Antikörper negativer Proben. Zudem wurden zwölf Proben (7 vormals IgG-negative und 5 vormals IgG-positive) erneut auf das Vorhandensein von spezifischen IgG-Antikörpern untersucht.

Primäre Enzymimmuntest-Diagnostik: Grundlage der Durchführung bildete die Standard-Arbeitsanweisung des Instituts für Infektionsmedizin im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein „SAA-IS-IV-0526; 005/07.2013; 4862“. Zum primären Nachweis der Antikörper gegen die B19V-Antigene „Virus Protein 1 und 2 (VP 1/2)“ wurden Testkits der Firma Biotrin verwendet, die als diagnostischer Goldstandard der Serologie gelten (Butchko & Jordan, 2004). Als Untersuchungsmaterial dienten die Serumproben der Studienpatienten. Die Untersuchungen wurden am Institut für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel durchgeführt.

Im Sandwich-Enzymimmuntest werden gebundene IgM-/IgG-Antikörper über eine Farbreaktion nachgewiesen. Das Serum wurde auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen, die mit dem B19V-Antigen VP2 beschichtet war, sodass vorhandene spezifische Antikörper des Patienten binden konnten. Das verwendete VP2 wird in einem eukaryontischen Baculovirus-Expressionssystem gewonnen. Im nächsten Schritt wurde ein zweiter, an eine Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen die IgM-/IgG-Antikörper hinzugefügt. Aus dem im Folgenden hinzugefügten Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurde durch die an den Sekundärintikörper gebundene Peroxidase eine Farbreaktion erzeugt. Anhand der photometrisch gemessenen Intensität dieser Reaktion wurde die Antikörpermenge im Patientenserum bestimmt. Als Cut-Off-Wert diente die mittlere optische Dichte des Kalibrators. Der Index der Probe ergab sich aus der Probenextinktion im Verhältnis zum Cut-Off-Wert. Ein

Index < 0,9 ergab eine eindeutig negative Probe, ein Index-Wert > 1,1 eine eindeutig positive Probe. Index-Werte $\geq 0,9$ und $\leq 1,1$ waren grenzwertig. Im klinischen Alltag wird die Kontrolle grenzwertiger Proben innerhalb von 14 d durch eine erneute Probenentnahme empfohlen. Da dies aufgrund der zeitlich versetzt erfolgten serologischen Analyse nicht möglich war, wurden grenzwertige Proben als negativ gewertet. Die Sensitivität und Spezifität der IgM- und IgG-Bestimmung liegen laut Herstellerangaben bei jeweils 100 %. Eine Zusammenstellung mit verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien findet sich in Tab. 5.

Tab. 5. Parvovirus-B19-Serologie (Biotrin): Reagenzien/Verbrauchsmaterial

Reagenzien und Verbrauchsmaterial (Biotrin)
Biotrin Parvovirus B19 IgG ELISA, 4 th Generation; Bestellnr: V519IG
Biotrin Parvovirus B19 IgM ELISA, 4 th Generation; Bestellnr: V619IM
Biotin-VP2-Konzentrat: 10-fach konzentrierte biotinylierte VP2-Lösung
Biotin VP2-Verdünnungspuffer
Enzymkonjugat-Verdünnungspuffer
Kalibrator, Cut-Off-Kontrolle
Konjugat IgG: Kaninchen-IgG-Horseraddish-Peroxidase-Konjugat
Konjugat IgM: Streptavidin-Horseraddish-Peroxidase-Konjugat
Mikrotiterplatten, beschichtet mit rekombinantem VP2
Negativkontrolle
Positivkontrolle
Probenverdünnungspuffer: Phosphat-gepufferte Salzlösung
Stopplösung: 0,5 mol/l Schwefelsäure
Substrat: Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB)
Waschpuffer: TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20

Bestätigung durch einen zweiten Enzymimmuntest und einen Immunblot: Die primäre Testung mit dem Biotrin-Testkit ergab einen unerwartet hohen Anteil IgM-positiver Proben (155/1.186, 13,1 %), sodass eine zweite Testung zur Überprüfung dieser Ergebnisse durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Testkits der Firma Mikrogen (Mikrogen Diagnostik; *recomWell* Parvovirus B19 IgM und IgG; *recomLine* Parvovirus IgG [Avidität] und IgM) verwendet (Enders *et al.*, 2007) Diese Untersuchung wurde durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Eis-Hübinger am Institut für Virologie an der Universitätsklinik Bonn nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Alle 155 mittels Biotrin-Testkit IgM-positiven Serumproben sowie 128 zufällig ausgewählte vormals IgM-negative Serumproben wurden zur Bestätigung mit dem Testkit der Firma Mikrogen auf B19V-IgM-Antikörper untersucht. Zudem wurden je fünf und sieben mit dem Biotrin-Testkit IgG-positiv und IgG-negativ getestete Proben zufällig ausgewählt und erneut

untersucht. Die erneute Testung aller Proben war aufgrund von begrenzten Mengen der Patientenserum nicht möglich.

Auch hierbei handelte es sich um einen indirekten Sandwich-Enzymimmuntest, wobei die rekombinanten Antigene VP1 und die in eukaryontischen Zellen produzierten VP2-Partikel an die Mikrotiterplatte gebunden vorlagen. Die Untersuchung wurde sowohl ohne als auch mit Absorption von Rheumafaktoren durch Rheumafaktor-Absorbens durchgeführt. Als Cut-Off-Referenz diente immer die mitreagierende Cut-Off-Kontrolle des Herstellers. Eine Übersicht der verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien findet sich in Tab. 6.

Tab. 6: Parvovirus-B19-Serologie (Mikrogen): Reagenzien/Verbrauchsmaterial

Reagenzien und Verbrauchsmaterial (Mikrogen):

Enzymimmuntest: recomWell IgM/IgG

recomWell Parvovirus B19 IgG, Artikel-Nr. 4404

recomWell Parvovirus B19 IgM, Artikel-Nr. 4405

Anti-human IgG Konjugat

Anti-human IgM Konjugat

Cut-off-Kontrolle

Mikrotiterplatten beschichtet mit rekombinanten B19V-Antigenen VP1 und VP2

Negative Kontrolle

Positive Kontrolle

Rheumafaktor-Absorbens (Siemens Art. Nr.: OUCG15)

Stopplösung: 25 % Phosphorsäure

Substrat: Tetramethylbenzidin

Verdünnungspuffer (gebrauchsfertig): Protein, Detergenz, blauer Farbstoff

Waschpuffer: 10-fach konzentriert; Phosphat-Puffer, NaCl, Detergenz

Immunblot: recomLine IgM/IgG

recomLine Parvovirus B19 IgM, Artikel-Nr. 4473

recomLine Parvovirus B19 IgG Avidität, Artikel-Nr. 4472

Anti-human IgG Konjugat aus Kaninchen

Anti-human IgM Konjugat aus Kaninchen

Aviditätsreagenz, Artikel-Nr. 11010

Magermilchpulver

Substrat: Tetramethylbenzidin

Teststreifen mit rekombinanten B19V-Antigenen auf Nitrozellulose-Membran (Vp-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C, NS-1)

Waschpuffer A: 10-fach konzentriert; Phosphat-Puffer, NaCl, Detergenz

In der IgM-Immunblot-Testung wurden Banden für mindestens zwei Antigene (VP-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C) als positiver Nachweis gewertet. Für die IgG-Positivität war der alleinige Nachweis von VP-2p-Antigen oder zwei weiterer Antigene (VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C)

ausreichend. Die wesentlichen Antigene sind bei den beiden Testsystemen der Firma Mikrogen identisch. Die unterschiedlichen Reaktionsmuster können für die Zuordnung zu verschiedenen klinischen Stadien der B19V-Infektion im Sinn der frischen, persistierenden oder zurückliegenden Infektion herangezogen werden, sollten allerdings immer auch im klinischen Kontext interpretiert werden. Die Avidität (für Anti-VP-N und Anti-VP-1S-IgG) beschreibt die Stärke der Mehrfachbindungen zwischen Antigen und Antikörper und steigt, je länger eine Infektion besteht. Die ersten IgG-Antikörper haben demnach eine geringere Avidität als im Verlauf gebildete IgG-Antikörper. Sowohl die Ergebnisse des Immunblots als auch die Aviditätsbestimmung der IgG-Antikörper konnten aufgrund des epidemiologischen Kontextes und der kleinen Subgruppe in der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

2.6.4. Diagnostik von *Plasmodium falciparum*

Anfertigung des Blutausstrichs: Für die Malaria-Diagnostik wurde ein Blutausstrich mit einem dicken Tropfen und einem dünnen Ausstrich angefertigt (WHO, 2010). Die Auszählung und Identifizierung der Subspezies der Plasmodien erfolgte von speziell ausgebildeten Laboranten unter dem Lichtmikroskop. Jeder Ausstrich wurde von zwei unabhängigen Lesern ausgewertet, bei Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich des Vorhandenseins von Parasiten, der Speziesbestimmung oder bei Überschreitung definierter Grenzwerte wurde eine dritte unabhängige Lesung durchgeführt. Alle Lesungen erfolgten räumlich getrennt und ohne Kenntnis des vorab ermittelten Ergebnisses.

Zwischen der Entnahme der EDTA-Probe und der Anfertigung des Blutausstrichs lagen maximal 4 h. Jeder verwendete Objektträger wurde vorab gereinigt, luftgetrocknet und zum Schutz vor Staub in einer geschlossenen Box aufbewahrt. Die eindeutige Zuordnung zum Studienkind wurde durch Kennzeichnung mit Studiennummer und Datum gewährleistet.

Für den dünnen Ausstrich wurden 3 µl auf den Objektträger aufgetragen und unverzüglich ausgestrichen. Für den dicken Tropfen wurden 8 µl der Probe in einem Kreis mit circa 1 cm Durchmesser verteilt. Beide Objektträger wurden für mindestens eine Stunde luftgetrocknet. Zur Verhinderung der Lyse der Erythrozyten wurde der dünne Ausstrich im Anschluss mit reinem Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit 10-%-igem Giemsa-Farbstoff. Die Lösung wurde für jede Färbung aus vorrätigem Giemsa-Farbstoff und Sørensen's-Puffer (pH 7,2) hergestellt und zweifach filtriert. Der pH der Puffer-Lösung wurde regelmäßig nach einem internen Protokoll zur Qualitätskontrolle geprüft. Nach mindestens 40-minütiger Trockenzeit wurde die überschüssige Farbe unter laufendem Leitungswasser abgespült. Im Anschluss an eine erneute Trockenzeit wurde ein Tropfen Fixierlösung appliziert und ein Deckglas auf den Objektträger gelegt. Die Mikroskopie erfolgte frühestens am nächsten Tag.

Auswertung: Die Erythrozyten im dicken Tropfen lysierten aufgrund ausbleibender Fixierung, sodass auch niedrige Parasitämien vor dem Hintergrund des Zelldetritus zu erkennen waren. Im dünnen Blutausrich ist die Zelldichte zum auslaufenden Ende des Ausstriches hin kontinuierlich abnehmend. Die Auswertung erfolgte in dem Abschnitt, in dem die Erythrozyten nicht mehr übereinander, sondern nebeneinander lagen. Hierbei wurde auf eine blasse Färbung der roten Blutzellen, auf eine dunkelviolette Färbung der Leukozytenkerne sowie eine kräftige rot-dunkelviolette Färbung des Chromatins der Parasiten geachtet. Die für *P. falciparum* charakteristische Maurer'sche Fleckung sollte in rot oder pink klar abgrenzbar sein, ebenso wie die Schüffner'sche Tüpfelung der Spezies *P. malariae* oder *P. ovale*. Die Plasmodienspezies wurden anhand der jeweiligen morphologischen Charakteristika unterschieden.

Dicker Tropfen: Für negative Befunde sowie niedrige und mittlere Parasitendichten wurde der dicke Tropfen unter 110-facher Vergrößerung mit Öl-Immersion unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Generell wurde bei weniger als 200 Parasiten in einem Sichtfeld des dicken Tropfens die Zählung in einem Sichtfeld mit ca. zwölf Leukozyten begonnen und dann weitere Felder ausgewertet, bis die Parasitenzahl gegen 200 Leukozyten gezählt war. Für die Parasitämie-Bestimmung wurden nur die asexuellen Parasiten betrachtet. Während immer alle Leukozyten eines Feldes gezählt wurden, konnte bei augenscheinlich gleichmäßiger Verteilung der Parasiten das Feld geviertelt und der gezählte Wert mit vier multipliziert werden.

Wenn nach dem Auszählen von mindestens 100 Feldern im dicken Tropfen keine Parasiten zu sehen waren, wurde der Ausstrich als negativ gewertet. Wurden im dicken Ausstrich weniger als 100 Parasiten auf 200 Leukozyten gezählt, so wurde der Ausstrich bis zum Erreichen der 500 Leukozyten ausgezählt. Im letzten Feld wurden alle vorhandenen Parasiten und Leukozyten gezählt, auch wenn die Zahl von 500 Leukozyten damit überschritten wurde. Die Parasitenmenge wurde dann als niedrige Parasitämie eingestuft. Eine mittlere Parasitämie wurde als eine Parasitendichte zwischen 100 und 200 Parasiten pro 200 Leukozyten definiert.

Dünnere Ausstrich: Bei mehr als 200 Parasiten pro 200 Leukozyten wurde die Parasitendichte im dünnen Ausstrich bestimmt und als hohe Parasitämie eingestuft. Hierbei wurde die Parasitenanzahl in Bezug auf 5.000 Erythrozyten gezählt. Bei augenscheinlich gleichmäßiger Verteilung wurde das Feld geviertelt, ein Viertel ausgezählt und sowohl die Parasiten- als auch Erythrozytenzahl im Anschluss mit vier multipliziert. Für Koinfektionen mit *P. falciparum* wurde lediglich die Anzahl der Plasmodienart *P. falciparum* dokumentiert, nicht die Anzahl der weiteren Spezies.

Die grobe Unterteilung in niedrige, mittlere und hohe Parasitämien ist für den klinischen Alltag häufig ausreichend, im Rahmen der Studie diente sie lediglich der exakteren Quantifizierung. Die ermittelten Parasitenanzahlen wurden in den als Parasiten/ μl definierten Dichteindex umgerechnet und ermöglichte den exakten direkten Vergleich der Proben untereinander. Für die Lesung auf 200 oder 500 Leukozyten (= L) war der Dichteindex folgendermaßen definiert:

$$\text{Parasitenanzahl} \times \left(\frac{8000 \text{ Leukozyten}}{L} \right) = \text{Parasitenanzahl} / \mu\text{l}$$

Für die Lesung auf 1000 oder 5000 Erythrozyten (= E) galt entsprechend:

$$\text{Parasitenanzahl} \times \left(\frac{4000000 \text{ Erythrozyten}}{E} \right) = \text{Parasitenanzahl} / \mu\text{l}$$

Die Qualität der Ausstriche und Lesungen wurde durch regelmäßige interne und externe Kontrollen sichergestellt (Malariamicro.V5_14.08.29.pdf; *Preparation of Blood Films, Staining of Blood Films and Malaria Microscopy*).

2.7. Symptom- und Diagnosedefinitionen

Neben einem ausführlichen körperlichen Untersuchungsbefund wurden Laboruntersuchungen (Blutbild, Blutkultur, Urinteststreifen, Urinkultur, Stuhlkultur) und apparative Zusatzdiagnostik durchgeführt. In Zusammenschau mit den nachträglichen Laboruntersuchungen (Serologie, PCR) ergaben sich für die Datenanalyse nachfolgende Definitionen der Symptomkomplexe und Diagnosen. Dabei galten folgende altersadaptierte Grenzwerte für Herzfrequenz (Tab. 7), Atemfrequenz (Fleming *et al.*, 2011) und Leukozytenzahl (Tab. 8) (Goldstein *et al.*, 2005):

Tab. 7. Altersabhängige Grenzwerte der Tachykardie

Alter [Jahre]	Grenzwert der Herzfrequenz [Herzschläge/min]
< 1	> 180
1-5	> 140
6-12	> 130
13-15	> 110

Tab. 8. Altersabhängige Grenzwerte von Tachypnoe und Leukozytenzahl

Alter	Grenzwert für Tachypnoe [Atemzüge/min]	Leukopenie [$\times 10^9/l$]	Leukozytose [$\times 10^9/l$]
< 1 Monat	> 60	< 5.000	> 19.500
1 Monat - 1 Jahr	> 50	< 5.000	> 17.500
2-5 Jahre	> 30	< 6.000	> 15.500
6-12 Jahre	> 24	< 4.500	> 13.500
13-18 Jahre	> 20	< 4.500	> 11.000

2.7.1. Symptomkomplexe

Bauchschmerzen: Bauchschmerzen wurden definiert als Schmerzen, die sich während der körperlichen Untersuchung reproduzieren ließen. Allein anamnestische Angaben der Begleitperson wurden nicht gewertet.

Diarrhoe: Durchfall wurde über das anamnestische Bestehen von mindestens drei dünnflüssigen Stuhlgänge in den letzten 24 h definiert. Zudem musste auch die abgegebene Stuhlprobe eine wässrige, schleimige oder blutige Konsistenz aufweisen. Die Stuhlprobe wurde auf folgende Viren, Bakterien und Protozoen getestet (Schnelltest oder PCR): Adenoviren, Noroviren, Rotaviren; *Campylobacter*, *Clostridioides difficile*, enteroinvasiver *Escherichia coli* (EIEC), Verotoxin-produzierende *Escherichia coli* (VTEC), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*; *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hominis* und *Giardia lamblia*.

Erbrechen: Sowohl das Vorhandensein von Erbrechen bei der Aufnahmeuntersuchung als auch das anamnestische Bestehen von Erbrechen wurden zur Definition herangezogen.

Dyspnoe: Atemnot wurde bei Vorhandensein von paradoxer Atmung, interkostalen Einziehungen, Nasenflügeln oder Schwierigkeiten bei der Atmung in Kombination mit einer altersadaptierten Tachypnoe definiert.

Neurologische Symptomatik: Eine neurologische Symptomatik bestand bei einem klinischen Hinweis auf einen Meningismus durch ein positives Kernig-Zeichen

(Nervendehnungszeichen: Patient in Rückenlage, passive Flexion im Hüftgelenk bei gestrecktem Kniegelenk, bei Schmerzen reflektorische Beugung des Kniegelenks), eine pulsierende Fontanelle bei Kindern ≤ 3 Monaten oder eine Nackensteifigkeit. Zudem zählte eine klinische Indikation für eine Liquorpunktion, Bewusstlosigkeit bzw. eine Blantyre-Koma-Skala < 3 oder eine hochgradige Erschöpfung (Prostration) zu den Kriterien. Hierbei war jeweils das Vorhandensein eines Kriteriums ausreichend.

Der Bewusstseinszustand wurde mit dem "Blantyre-Koma-Skala" ermittelt. Molyneux *et al.* veröffentlichten im Jahr 1989 diese modifizierte Version der Glasgow-Koma-Skala, die auch für Kinder geeignet ist, die noch nicht sprechen können. Sie berücksichtigt ebenfalls die drei Kategorien motorische Reaktion, sprachliche Reaktion und Augenbewegung, für die Punkte vergeben werden (Gesamtpunktzahl 0-5) (Molyneux *et al.*, 1989).

2.7.2. Diagnosen

Obere Atemwegsinfektion: Als Symptome einer oberen Atemwegsinfektion wurden häufiges Niesen, Halsschmerzen, eine verstopfte oder laufende Nase und ein Stridor gewertet. Zudem wurde bei der klinischen Untersuchung auf eitrige Tonsillen und geröteten Rachenraum geachtet und otoskopisch eine Otitis media abgeklärt. Bei Vorliegen eines der genannten Symptome bestand die Diagnose einer oberen Atemwegsinfektion.

Untere Atemwegsinfektion und Pneumonie: Zu den Symptomen einer unteren Atemwegsinfektion zählten paradoxe Atembewegungen und interkostale Einziehungen, Nasenflügeln oder Husten während der klinischen Untersuchung. Ein auffälliger Auskultationsbefund mit Giemen oder Keuchen, verminderten oder fehlenden Atemgeräuschen, Rasselgeräuschen oder ein bronchiales Atemgeräusch wurden ebenfalls als Symptome einer unteren Atemwegsinfektion gewertet. Hierbei war jeweils das Vorhandensein eines Kriteriums für die Diagnose der unteren Atemwegsinfektion ausreichend. Bei zusätzlichem Vorliegen Pneumonie-typischer Veränderungen im Röntgenbild wurde der Symptomkomplex als Pneumonie gewertet.

Das Material des oropharyngealen Abstrichs wurde durch PCR auf Adenoviren, Chlamydien, Coronaviren (NL63, 229E, OC43, HUK1), Enteroviren, Influenza-A- und B-Viren, Metapneumovirus, Mykoplasmen, Parainfluenzaviren der Serotypen 1-4, Paraechoviren, Respiratorisches Syncytial-Virus und Rhinoviren untersucht. Zudem wurde ein Urinest auf Legionellen-Antigen durchgeführt.

Harnwegsinfektion: Zu den Symptomen einer Harnwegsinfektion zählten Schwierigkeiten, Beschwerden oder Schmerzen beim Wasserlassen, gehäuftes Wasserlassen sowie eine

auffällige Farbe oder ein ungewöhnlicher Geruch des Urins. Zudem wurde bei den Patienten ein Klopfschmerz über den Nierenlagern geprüft. Ein positives Indikatorfeld des Urinteststreifens für Leukozyten oder Nitrit wurde ebenfalls als Hinweis für einen Harnwegsinfekt gewertet. Bei klinischem Hinweis und/oder einem positiven Urinstreifentest wurde ein Harnwegsinfekt diagnostiziert und eine Urinkultur auf pathogene Erreger angelegt.

Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom und Sepsis: In Anlehnung an die Definition der internationalen Konferenz zur pädiatrischen Sepsis-Definition wurden diese Diagnosen folgendermaßen definiert (Goldstein *et al.*, 2005): Ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) lag vor, wenn mindestens zwei der folgenden vier Kriterien erfüllt waren:

- Altersadaptierte Tachypnoe
- Altersadaptierte Tachykardie
- Altersadaptierte Leukopenie/-zytose
- Körpertemperatur > 38,5°C

Bei Vorliegen eines SIRS und einer positiven Blutkultur für mindestens einen pathogenen Erreger wurde die Diagnose Sepsis gestellt. Zum Zeitpunkt des Studiendesigns und der Festlegung der Falldefinitionen in den Jahren 2013/2014 waren die Sepsis-3-Kriterien von 2016 noch nicht veröffentlicht.

HIV-Infektion: Alle Kinder ab einem Alter von 18 Monaten wurden nach Zustimmung durch einen Elternteil durch einen HIV-Antikörper-Suchtest auf das Vorliegen einer HIV-Infektion untersucht (OraQuick ADVANCERapid HIV-1/2 Antibody Test; OraSure Technologies, Pennsylvania, USA). Bei positivem Suchtest wurde ein Bestätigungstest durchgeführt (RightSign HIV 1.2.0; Biotest, Hangzhou, China). Eine vorbekannte HIV-Infektion wurde ebenfalls erfasst.

Tuberkulose, Sichelzellerkrankheit und G6PD-Mangel: Die Diagnostik dieser drei Grunderkrankungen wurde nicht im Rahmen der Studie durchgeführt. Bei bereits bekannter Grunderkrankung oder positiver Diagnostik während des Krankenhausaufenthaltes wurden diese Informationen in unsere Datenerfassung übernommen.

2.7.3. Anämie

Nach Empfehlungen der WHO wird die Anämie in Abhängigkeit des Alters der Kinder und des Hb-Wertes in milde, moderate und schwere Anämien unterteilt (Tab. 9) (WHO, 2011). Die Genese einer milden Anämie ist meist multifaktoriell und ihre klinische Relevanz begrenzt. In

unserer Studienpopulation fand sich zudem nur ein geringer Anteil an Kindern mit schwerer Anämie. Für die weitere Datenauswertung wurden daher die Kinder mit moderater und schwerer Anämie in einer Gruppe zusammengefasst, ebenso wie die Kinder mit milder und keiner Anämie. Der Übersicht und Lesbarkeit halber wird im Folgenden von Kindern mit Anämie (moderate bis schwere Anämie) und Kindern ohne Anämie (milde bis keine Anämie) gesprochen.

Tab. 9. Altersabhängige Grenzwerte der Anämie

Alter	Keine Anämie Hb [g/dl]	Anämie Hb [g/dl]		
		mild	moderat	schwer
1-59 Monate	≥ 11	10,0-10,9	7,0-9,9	< 7
5-11 Jahre	≥ 11,5	11,0-11,4	8,0-10,9	< 8
12-14 Jahre	≥ 12,0	11,0-11,9	8,0-10,9	< 8

Die Einteilung in die verschiedenen Unterformen der Anämie erfolgte anhand der Erythrozytenindizes ebenfalls nach altersadaptierten Grenzwerten (Tab. 10) (Bald *et al.*, 2012).

Tab. 10. Altersabhängige Grenzwerte der Erythrozytenindizes

Alter	MCV [fl]	MCH [pg]	MCHC [g/dl]
< 6 Monate	94-106	31,5-35,5	32,7-35,7
6-11 Monate	70-84	23,5-28,5	31,5-35,5
12-23 Monate	65-80	19,8-27,2	30,1-34,9
2-6 Jahre	68-84	23-29	30,1-34,9
7-12 Jahre	71-87	24-30	30,1-34,9
13-17 Jahre	70-86	25-31	30,1-34,9

2.7.4. Parvovirus-B19-Infektion

Neben der PCR-Untersuchung auf B19V-DNA wurden alle Proben auch auf das Vorliegen B19V-spezifischer Antikörper hin untersucht. Auch alle Proben des Follow-up 2 zum Zeitpunkt 28 d nach Aufnahme wurden auf spezifische Antikörper getestet. Ziel der serologischen Testung war ein zusätzlicher Informationsgewinn, da bei akuter Infektion die Virämie schnell absinken und nur noch IgM-Antikörper nachweisbar sein können (Abb. 2, Kapitel 1.2.2.). Eine Serokonversion innerhalb des Follow-up-Zeitraumes von einem Monat würde zudem für eine aktuelle Infektion zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme sprechen.

Die primäre Testung mit den als Goldstandard geltenden Reagenzien der Firma Biotrin ergab eine unerwartet hohe Anzahl IgM-positiver Proben (155/1.186; 13,1 %). Daher erfolgte eine Überprüfung der Ergebnisse mit einer zweiten Testung durch Enzymimmuntests der Firma Mikrogen. Hierbei zeigte sich eine nur geringe Übereinstimmungsrate bei den positiven IgM-Ergebnissen (30,1 %), sodass die Verlässlichkeit der Ergebnisse des Biotrin-IgM-Testkits in Frage gestellt werden musste. Die genaue Vorgehensweise der Nachtestung ist in Kapitel 2.6.3. dargestellt. Letztlich wurden nur die Proben, in denen beide Testkits IgM-Antikörper nachweisen konnten, als IgM-positiv gewertet. Die Serokonversion konnte aufgrund niedriger Einschussraten am Follow-up 2 nicht im Rahmen der Definition verwendet werden. Die aktuelle B19V-Infektion wurde damit über den direkten Virusnachweis durch PCR und/ oder einen positiven IgM-Antikörperstatus definiert.

Neben dem IgM-Antikörperstatus wurde auch der IgG-Antikörperstatus nach der Testung mit dem Biotrin-Testkit mit dem Mikrogen-Testkit stichprobenartig überprüft, wobei beide Tests eine hohe Übereinstimmung aufwiesen. Der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper wurde als durchgemachte Infektion interpretiert und zur Bestimmung der IgG-Seroprävalenz verwendet.

2.7.5. Infektion mit *Plasmodium falciparum*

Unkomplizierte *P.-falciparum*-Infektion: Die alleinige Präsenz von Parasiten im Blut in endemischen Gebieten wie unserem Studiengebiet ist häufig und kann als Diagnosekriterium zu einer Überdiagnose und einem verfrühten Ausschluss anderer Erkrankungsursachen führen (Schellenberg *et al.*, 1994). Somit wurde eine unkomplizierte Infektion mit *P. falciparum* über das Vorhandensein von Fieber und eine Parasitendichte von mehr als 12.000/µl definiert. Eine Parasitendichte unterhalb des Grenzwertes wurde demnach nicht als ursächlich für die Fiebererkrankungen gewertet.

Komplizierte *P.-falciparum*-Infektion: Unkomplizierte *P.-falciparum*-Infektionen, die zusätzlich mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllten, wurden als komplizierte *P.-falciparum*-Infektion gewertet:

- Bewusstlosigkeit oder ein Punktwert in der Blantyre-Koma-Skala von < 3
- Hb < 5 g/dl und eine Parasitämie > 100.000/µl
- Parasitämie > 10 % (Parasiten/µl im Verhältnis zu Erythrozyten/µl)
- Ikterus und eine Parasitämie > 100.000/µl
- Dyspnoe
- Ausschluss von Kindern jünger als ein Monat

Als Grundlage der Definitionen dienten die Publikationen von Bejon *et al.* und Dondorp *et al.* (Bejon *et al.*, 2007; Dondorp *et al.*, 2010).

2.8. Statistische Methoden

Die Datenanalyse wurde mit STATA/SE Version 14 (StataCorp LLC, Texas, USA) durchgeführt. Die grundlegende Beschreibung der Population erfolgte durch Angabe absoluter und prozentualer Anteile einzelner Merkmalsausprägungen. Häufigkeiten wurden in Balkendiagrammen dargestellt. Als Lageparameter für nicht-normalverteilte metrische Variablen (z. B. "Alter in Jahren", „Hb-Wert“) wurde aufgrund seiner Robustheit gegenüber Ausreißern der Median als Äquivalent für den Mittelwert bestimmt. Zur Beschreibung der Streuung der Messwerte um den Median diente der Interquartilsabstand (IQR), die Spannweite der mittleren 50 % der Messwerte. Außerdem wurde die Spannweite zwischen minimaler und maximaler Ausprägung des jeweiligen Merkmals zur Einschätzung der Streuung bei einzelnen Merkmalen betrachtet. Die grafische Darstellung der nicht normalverteilten metrischen Daten erfolgte im Box-Whisker-Diagramm.

Nominalskalierte Messwerte wurden mit nicht-parametrischen Verfahren betrachtet. Dichotome Merkmale wurden in Vierfeldertafeln gegenübergestellt; bei Merkmalen mit mehreren Ausprägungen bzw. mehr als zwei zu vergleichenden Subgruppen wurden Mehrfeldertafeln verwendet. Unterschiedshypothesen, welche die Verteilung eines nominalen Merkmals in zwei oder mehr Gruppen betrafen, wurden mit einem zweidimensionalen χ^2 -Test getestet. Bei Zellenhäufigkeiten < 5 wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Für den Vergleich der Mediane nicht-parametrischer Daten zwischen unterschiedlichen Subgruppen der Studienpopulation, wurde der Mediantest verwendet.

Zur Erfassung des sozioökonomischen Status wurde ein sozioökonomischer Index unter Einschluss von neun Indikatorvariablen in eine tetrachorische Korrelation und Hauptkomponentenanalyse konstruiert. Im Anschluss wurde die Gesamtmenge in zwei gleich große Gruppen unterteilt, sodass dieser als potenzieller Risikofaktor in der weiteren Analyse untersucht werden konnte (Vyas & Kumaranayake, 2006). Die eingeschlossenen Indikatorvariablen waren: 1) Mitgliedschaft in der nationalen Krankenversicherung, 2) subjektive Einschätzung der finanziellen Situation, 3) Lokalisation der Kochstelle (innerhalb oder außerhalb des Hauses), 4) Art des Trinkwassers, 5) Verfügbarkeit von Elektrizität, 6) Ausstattung mit Moskitogittern vor den Fenstern, Besitz von 7) Mobiltelefon, 8) Fernseher und 9) Kühlschrank.

Der Zusammenhang zwischen einer B19V-Infektion und dichotomen abhängigen Variablen wurde zunächst in einer univariaten Analyse untersucht. Alle Faktoren mit $p \leq 0,1$ im univariaten Modell wurden in ein multivariates Modell eingeschlossen. Die Variablen wurden mit schrittweiser Rückwärtselimination basierend auf einem Likelihood-Ratio-Test mit einem Cut-Off-Wert von $p = 0,05$ aus dem Modell entfernt, damit unabhängige Risikofaktoren für eine B19V-Infektion bestimmt werden konnten.

Zur Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer B19V-Infektion und einer Anämie wurden zunächst univariate Regressionsanalysen mit Unterscheidung zwischen der IgM-positiven und PCR-positiven Subgruppe durchgeführt. Des Weiteren wurden folgende mögliche Risikofaktoren untersucht: Geschlecht, Alter, Geschwisteranzahl, Ethnie, sozioökonomischer Status, G6PD-Mangel, Sichelzellkrankheit und Infektion mit *P. falciparum*. Zur Berücksichtigung möglicher Störfaktoren wurden alle Variablen in ein multivariates Regressionsmodell eingeschlossen. Ergänzend wurde eine lineare Regressionsanalyse mit dem Hb-Wert als kontinuierliche Variable durchgeführt. Eine mögliche Effekt-Modifikation in Bezug auf die Anämie zwischen einer B19V- und *P.-falciparum*-Infektion wurde durch das Hinzufügen eines Interaktionsterms geprüft. Ein Likelihood-Ratio-Test wurde zum Vergleich beider Modelle durchgeführt.

Zur Darstellung der Übereinstimmung beider IgM-Enzymimmuntests (Biotrin und Mikrogen) in Abhängigkeit von der Höhe der Index-Werte der Biotrin-IgM-Messung wurde ein gleitender proportionaler Anteil errechnet. Dafür wurden die Biotrin-Ergebnisse anhand der Indexwerte der Extinktion aufsteigend sortiert. Der Anteil bestätigter Ergebnisse wurde in einem Fenster von 50 Messwerten gerechnet, wobei das Fenster schrittweise von dem niedrigsten Indexwert zum höchsten bewegt wurde. Die Ergebnisse wurden in einer Grafik abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Studienpopulation

Von November 2013 bis April 2015 wurden 1.238 Fälle in die Studie eingeschlossen und durch molekulargenetische Untersuchung (PCR) und serologische Analysen (Enzymimmuntest) auf das Vorhandensein einer B19V-Infektion untersucht. Patientenfälle mit fehlender oder inhibierter PCR oder fehlendem serologischem Ergebnis wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Unter den 1.189 Fällen fanden sich drei Fälle mit wiederholt positiver B19V-Diagnostik, die ebenfalls ausgeschlossen wurden. Somit wurden 1.186 Patientenfälle als Gesamtmenge der Studie festgelegt. Die Zusammensetzung der Studienpopulation ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

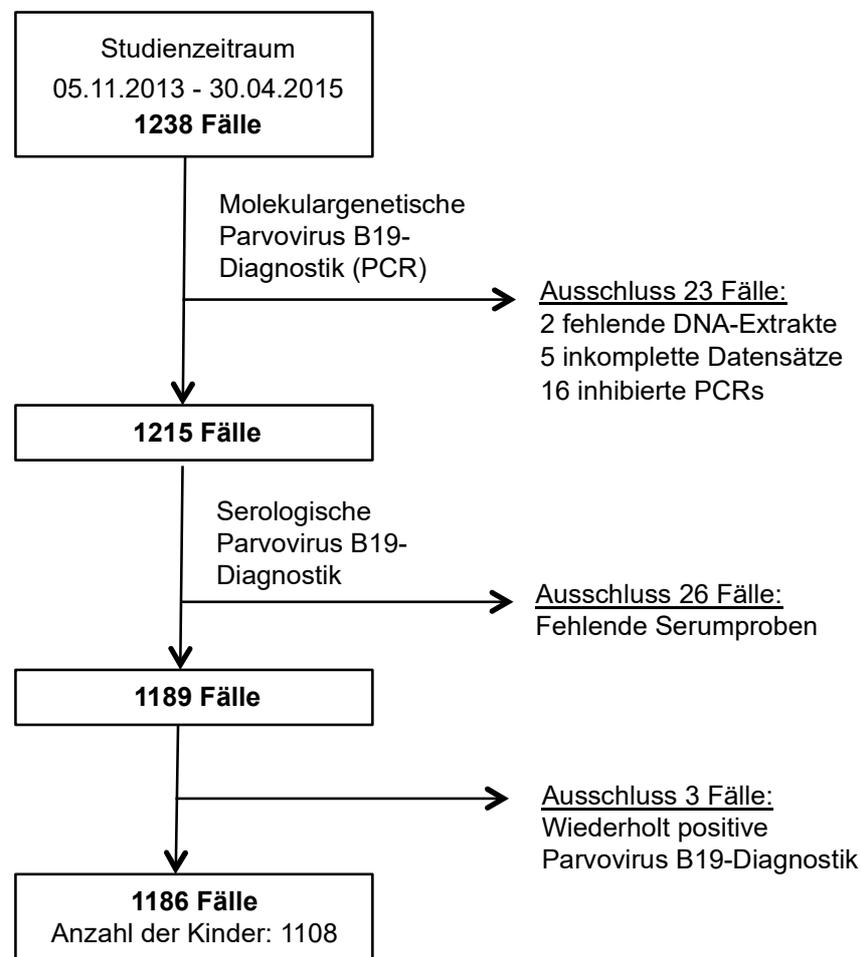


Abb. 5. Flussdiagramm - Zusammensetzung der Studienpopulation - Während des Studienzeitraums wurden 1.238 Fälle eingeschlossen. Fälle mit fehlender oder fehlerhafter molekulargenetischer/serologischer B19V-Diagnostik wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Drei weitere Fälle mit wiederholt positiver B19V-Diagnostik wurden ebenfalls ausgeschlossen, sodass die Studienpopulation 1.186 Fälle umfasste, die sich 1.108 Kindern zuordnen ließen.

Die Anzahl der monatlichen Rekrutierungen variierte in Abhängigkeit von der Gesamtzahl der stationären Aufnahmen und der Kinder, welche die Einschlusskriterien erfüllten und einem Studieneinschluss zustimmten. Im Juli und September 2014 wurden mit 30 Kindern die geringste Anzahl in die Studie eingeschlossen, im März 2015 mit 99 Kindern die größte Anzahl. Abb. 6 zeigt die Anzahl der rekrutierten Fälle über die 18 Studienmonate.

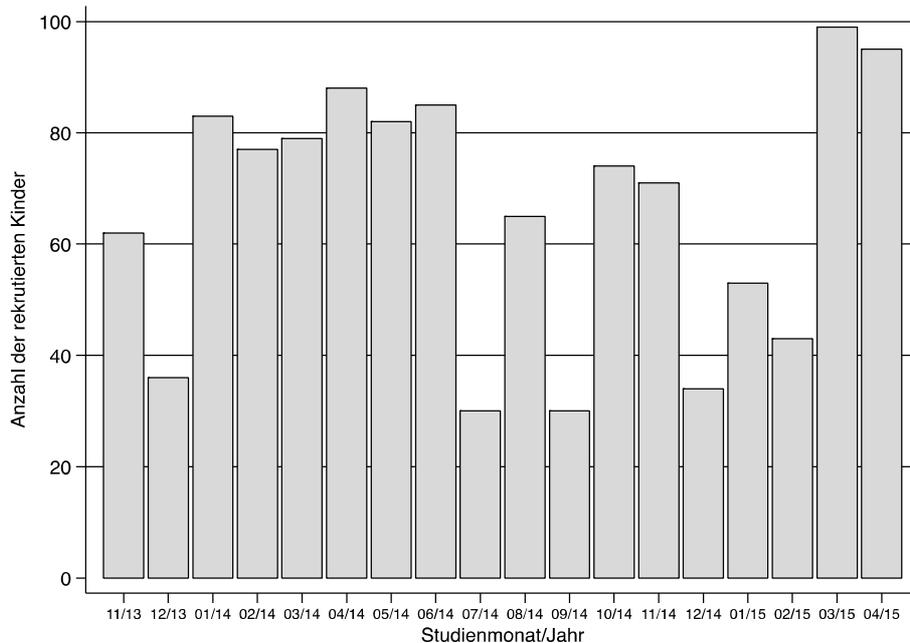


Abb. 6. Anzahl der Rekrutierungen pro Studienmonat - Die Grafik zeigt die zeitliche Verteilung der 1.186 Studienfälle über die 18 Studienmonate.

Die 1.186 Fälle ließen sich unter Beachtung der Mehrfachbesuche 1.108 Kindern zuordnen. Die nachfolgenden Häufigkeitsangaben der allgemeinen Informationen über die Studienpopulation beziehen sich daher auf 1.108 Kinder. Von den eingeschlossenen Kindern waren 54,3 % (n = 602) männlich. Die Mehrheit der Kinder waren ein bis vier Jahre alt (58,9 %, n = 653), 17,7 % (n = 196) waren jünger als ein Jahr, 23,4 % (n = 259) fünf Jahre und älter. Das jüngste in die Studie eingeschlossene Kind war 27 d, das älteste 14 Jahre alt. Der Altersmedian lag bei zwei Jahren. Eine Darstellung der Altersverteilung der Studienpopulation zeigt Abb. 7.

Die Mehrheit der Kinder kam aus Agogo (34,8 %, n = 385), gefolgt von der Distrikthauptstadt Konongo (6,8 %, n = 75) sowie den Nachbarorten Agogos, Ananekrom (4,1 %, n = 45) und Hwidiem (3,8 %, n = 42). Insgesamt kamen die Kinder aus 127 verschiedenen Dörfern und Städten, die überwiegend in der näheren Umgebung des Krankenhauses lagen.

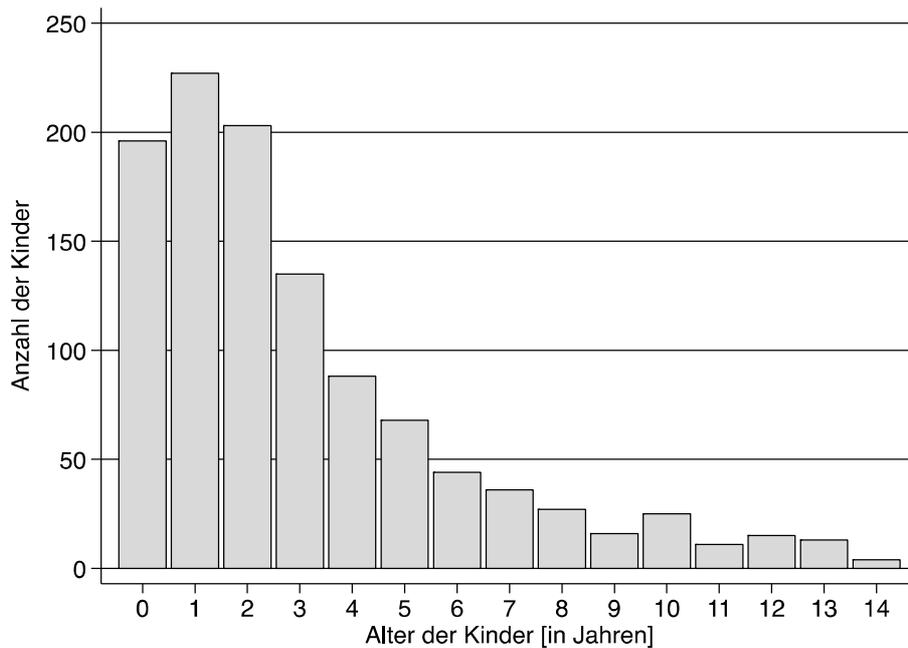


Abb. 7. Altersverteilung in der Studienpopulation - Die Grafik zeigt die absolute Anzahl der Kinder jeder Altersgruppe für die 1.108 Kinder der Studienpopulation.

Der ethnischen Gruppe der Akan gehörten 57,3 % (n = 635) der Familien an, 39,5 % (n = 438) fühlten sich Volksgruppen aus dem Norden des Landes (sog. Northeners) zugehörig. Die übrigen Familien waren den Ewe (2,4 %, n = 26), den Ga (0,3 %, n = 3) oder anderen ethnischen Gruppierungen (0,1 %, n = 1) angehörig. Neben 80,2 % (n = 889) mit christlichem Glauben, waren die Muslime mit 17,8 % (n = 197) und andere Religionen mit 1,5 % (n = 17) in unserer Studienpopulation vertreten.

Von den Studienkindern waren 83,2 % (n = 992) über die kostenlose nationale Krankenversicherung (NHIS) versichert. In Ghana besteht eine Schulpflicht ab sechs Jahren. Unter den schulpflichtigen Kindern (n = 191) besuchten 84,3 % die Grundschule oder eine weiterführende Schule, 15,7 % der schulpflichtigen Kinder gingen nicht zur Schule.

Der Z-Score „Gewicht bezogen auf Körpergröße“ wurde als Indikator einer akuten Unterernährung herangezogen und konnte für 811 Kinder berechnet werden. Demnach waren 80,8 % (n = 655) der Kinder in einem adäquaten Ernährungszustand, 10,5 % (n = 85) moderat mangelernährt und 5,3 % (n = 43) schwer mangelernährt. Als Indikator für chronische Unterernährung diente der Z-Score „Körpergröße bezogen auf das Alter“, der für 759 Kinder bestimmt werden konnte. Auch hiernach waren 81,3 % (n = 617) in einem guten Ernährungszustand, 7,8 % (n = 59) waren moderat und 5,3 % (n = 40) schwer unterernährt.

Bei 437 der 789 Kinder (55,4 %) im Alter von mindestens 18 Monaten lag eine Einverständniserklärung zur Testung auf eine HIV-Infektion vor. In dieser Subgruppe fanden

sich 13 Kinder mit einer HIV-Infektion (3,0 %). Bei 34 Kindern war eine Sichelzellerkrankung (3,1 %) und 3,3 % (n = 36) ein G6PD-Mangel bekannt. Zwei Kinder (0,2 %) waren an einer Tuberkulose erkrankt. In Tab. 11 sind die allgemeinen Informationen zur Studienpopulation aufgeführt.

Fast alle Kinder wurden von einem Verwandten ins Krankenhaus begleitet (99,5 %, n = 1.102), der auch im selben Haushalt wie das Studienkind lebte (98,8 %, n = 1.095). Sowohl als sozioökonomischen Parameter, als auch für die Übertragung von Erkrankungen spielt die Anzahl der Personen, die in einem Haushalt leben oder zusammen essen, eine Rolle. Gerade wenn ältere Geschwister schon in die Schule gehen, können die jüngeren Kinder verhältnismäßig früh mit Krankheitserregern wie beispielsweise B19V in Kontakt kommen. Die Studienkinder hatten keine bis zwölf Geschwister, der Median lag bei zwei Geschwistern. In 48,4 % (n = 536) der Haushalte lebten zwei bis fünf Personen, in 46,0 % (n = 510) waren es zwischen sechs und zehn Personen. In den weiteren Haushalten (4,4 %, n = 48) lebten elf bis 20 Personen zusammen. Über ein Mobiltelefon verfügten rund 65 % (n = 718) der Familien. Die finanzielle Situation beschrieben 70,6 % (n = 782) als schwierig und 17,0 % (n = 188) als sehr schwierig. Eine Unterstützung durch Verwandte im Ausland wurde von 8,0 % (n = 89) der Familien angegeben. Die Fenster der Wohnhäuser waren in 42,7 % (n = 473) mit Moskitogittern ausgestattet, die Mehrheit der Kinder (69,6 %, n = 771) hatte die vorherigen 7 d unter einem Moskitonetz geschlafen. Für die weitere Analyse wurde ein sozioökonomischer Index bestimmt, in dessen Konstruktion neun Indikatorvariablen einfließen (Kapitel 2.8.). Die Studienpopulation wurde in zwei gleich große Gruppen mit hohem und niedrigem sozioökonomischem Status eingeteilt (je 49,4 % und 49,2 %). Die sozioökonomischen Informationen sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 11. Allgemeine Informationen zur Studienpopulation

Parameter	Absolute Anzahl	Anteil [%]
Gesamtzahl der Fälle	1.189	
Gesamtzahl der Kinder = n	1.108	100
Geschlecht		
männlich	602	54,3
Alter		
< 1 Jahr	196	17,7
1-2 Jahre	430	38,8
3-4 Jahre	223	20,1
≥ 5 Jahre	259	23,4
Median (IQR) [Monate]	29 (15-55)	
Wohnort¹		
Agogo	385	34,8
Konongo	75	6,8
Ananekrom	45	4,1
Hwidiem	42	3,8
Bahankra	34	3,1
Patriensa	27	2,4
andere ²	498	44,9
Volkszugehörigkeit¹		
Akan	635	57,3
Northeners	438	39,5
Ewe	26	2,4
Ga	3	0,3
Religionszugehörigkeit¹		
Christentum	889	80,2
Islam	197	17,8
andere	17	1,5
Mitgliedschaft in der nationalen Krankenversicherung¹		
ja	922	83,2
Schulbesuch³		
ja	161/191	84,3
Grunderkrankung		
HIV-Infektion ⁴	13/437	3,0
Sichelzellkrankheit	34	3,1
G6PD-Mangel	36	3,3
Tuberkulose	2	0,2
Akute Unterernährung⁵ Z-Score „Gewicht für Körpergröße“	n = 811	
guter Ernährungszustand [-2 - +2]	655	80,8
moderate Unterernährung [-2 - -3]	85	10,5
schwere Unterernährung [< -3]	43	5,3
Chronische Unterernährung⁵ Z-Score „Körpergröße für Alter“	n = 759	
guter Ernährungszustand [-2 - +2]	617	81,3
moderate Unterernährung [-2 - -3]	59	7,8
schwere Unterernährung [< -3]	40	5,3

¹ Fehlende Angaben: Wohnort 2; Volkszugehörigkeit 6; Religion 5; Krankenversicherung 4.

² „andere“: 121 weitere Orte, aus denen jeweils weniger als 2 % der Studienkinder kamen.

³ Schulpflicht ab sechs Jahren. Anteil (%) der Kinder ≥ 6 Jahren (191 Kinder), 1 fehlende Angabe.

⁴ 437 Kinder waren mindestens 18 Monate alt. Ein beim ersten Besuch zu junges Kind wurden im weiteren Verlauf positiv getestet und ist hier nicht mit aufgeführt.

⁵ Notwendige Daten zur Berechnung des Z-Score nur für Untergruppe verfügbar (siehe jeweiliges n).

Tab. 12. Sozioökonomische Informationen zur Studienpopulation

Parameter	Absolute Anzahl	Anteil [%]
Gesamtzahl der Kinder = n	1.108	100
Begleitung lebt im gleichen Haushalt¹		
ja	1.095	98,8
Begleitung ist mit Kind verwandt¹		
ja	1.102	99,5
Geschwisteranzahl¹		
keine	244	22,0
1	245	22,1
2	215	19,4
3	155	14,0
4	110	9,9
5-12	124	11,2
Median (IQR)	2 (1-3)	
Personen im Haushalt¹		
2-5	536	48,4
6-10	510	46,0
11-20	48	4,3
Median (IQR)	6 (4-7)	
Verfügbarkeit eines Mobiltelefons¹		
ja	718	64,8
Moskitogitter vor den Fenstern¹		
ja	473	42,7
Anzahl der Nächte, die das Kind während der letzten Woche unter einem Moskitonetz geschlafen hat¹		
7	771	69,6
4-6	20	1,8
1-3	25	2,3
0	278	25,1
Einkommensmanagement¹		
nicht schwierig	132	11,9
schwierig	782	70,6
sehr schwierig	188	17,0
Unterstützung durch Verwandte im Ausland¹		
ja	89	8,0
Sozioökonomischer Status¹		
hoch	586	49,4
niedrig	584	49,2

¹ Fehlende Angaben: Begleitung lebt im gleichen Haushalt 5; Begleitung ist verwandt 6; Geschwisteranzahl 15; Personen im Haushalt 14; Verfügbarkeit Mobiltelefon 7; Verfügbarkeit Moskitonetz 14; Einkommensmanagement 6; Unterstützung durch Verwandte 8; Sozioökonomischer Status 16.

Zwischen dem Auftreten der ersten Beschwerden und dem Aufsuchen des Krankenhauses mit der anschließenden Aufnahme auf die Kinderstation lagen im Median 2 d (Minimum 0 d, Maximum 14 d). Die mittlere Aufenthaltsdauer lag ebenfalls bei 2 d, 130 Kinder (11,7 %) blieben länger als 7 d in der stationären Behandlung mit einem Maximum von 65 d. Vor der Aufnahme bekamen 71,9 % (n = 853) der Kinder bereits Antipyretika, 11,4 % (n = 135) Medikamente gegen Malaria und 4,9 % (n = 58) ein Antibiotikum. Ein Fünftel der Kinder

(n = 233) war in den sechs Monaten vor der Rekrutierung bereits mindestens einmal in stationärer Behandlung.

Während der 18-monatigen Rekrutierungsphase wurden 93,9 % (n = 1.040) der Kinder einmal in die Studie aufgenommen, 5,3 % (n = 59) erfüllten auch bei einem zweiten stationären Aufenthalt die Kriterien und wurden erneut eingeschlossen. Acht Kinder (0,7 %) wurden in dem Zeitraum während der stationären Aufnahme dreimal in die Studie eingeschlossen und ein einziges Kind (0,1 %) viermal.

Tab. 13. Informationen zu Krankenhausaufenthalt und Verlauf

Parameter	Absolute Anzahl	Anteil [%]
Anzahl der Krankenhausaufenthalte pro Kind (mit Einschluss in die Studie)¹ (n = 1.108)		
1	1.040	93,9
2	59	5,3
3	8	0,7
4	1	0,1
Vorherige Medikamenteneinnahme²		
Antibiotika	58	4,9
Antimalariamittel	135	11,4
Antipyretika	853	71,9
Tage zwischen Symptombeginn und Krankenhausaufnahme²		
Minimum	0	
Maximum	14	
Median (IQR)	2 (1-3)	
Dauer des Krankenhausaufenthaltes [d]²		
Minimum	0	
Maximum	65	
Median (IQR)	2 (2-4)	
Zustand bei Entlassung²		
vollständige Genesung	174	14,7
Entlassung mit anhaltender Medikation	964	81,3
Entlassen mit dauerhafter Medikation/Einschränkung	1	0,1
Verlegung in anderes Krankenhaus	3	0,3
verstorben	18	1,5
Follow-up		
eingeschlossen	629	
Follow-up 1	474/1037	45,7
Follow-up 2	417/1086	38,4
Follow-up 1 und 2	262/1037	25,3
Inpatient Review	837/927	90,3
Erneute Krankenhausaufnahme innerhalb eines Monats unscheduled admission	16	1,4

¹ Einen Monat nach Erstaufnahme konnten die Kinder bei Wiederaufnahme ins Krankenhaus und Erfüllung der Einschlusskriterien erneut in die Studie aufgenommen werden.

² Fehlende Angaben: Antibiotika 18; Antimalariamittel 20; Antipyretika 18; Symptombeginn 291; Aufenthaltsdauer 7; Zustand bei Entlassung 26.

Die Mehrheit der Kinder wurden unter fortlaufender medikamentöser Behandlung entlassen (81,3 %, n = 964), 14,6 % (n = 174) hatten sich bereits vor der Entlassung wieder vollständig erholt. Nur ein Kind (0,1 %) verließ das Krankenhaus mit einer bleibenden Beeinträchtigung, drei Kinder (0,3 %) wurden zur Weiterbehandlung an ein anderes Krankenhaus verlegt. In der gesamten Studienperiode verstarben 18 Kinder (1,5 %) während des Aufenthalts an ihrer Erkrankung. Tab. 13 fasst die allgemeinen Informationen zur Aufnahme, dem Krankenhausaufenthalt und Verlauf zusammen.

Das studieninterne Follow-up-System wurde im Januar/Februar 2014 eingeführt. Am d 7 nach der Entlassung kamen 45,7 % (474/1037) der Kinder (Follow-up 1) noch einmal ins Krankenhaus, 38,4 % (417/1086) nahmen am Follow-up 2 einen Monat nach der Aufnahme ins Krankenhaus teil. Die vollständige Erfassung des Krankheitsverlaufes vom Tag der Aufnahme bis zum Follow-up 2 gelang bei einem Viertel der Kinder (262 Kinder, 25,3 %). Wenn ein Kind innerhalb des Follow-up-Zeitraumes erneut aufgenommen wurde, wurden ungeachtet der Einschlusskriterien einige klinische Eckdaten zum Aufenthalt erfasst (ungeplante Aufnahme, *unscheduled admission*). Während der Studienperiode traf dies auf 16 Kinder zu (1,4 %). Ab März 2014 wurden die Kinder auch während ihres Aufenthaltes begleitet und der Verlauf im *Inpatient Review* erfasst. Von 927 Kindern konnten 90,3 % (n = 837) in das System eingeschlossen werden. Abb. 8 zeigt die Teilnehmerzahlen am *Inpatient Review*, Follow-up 1 und Follow-up 2.

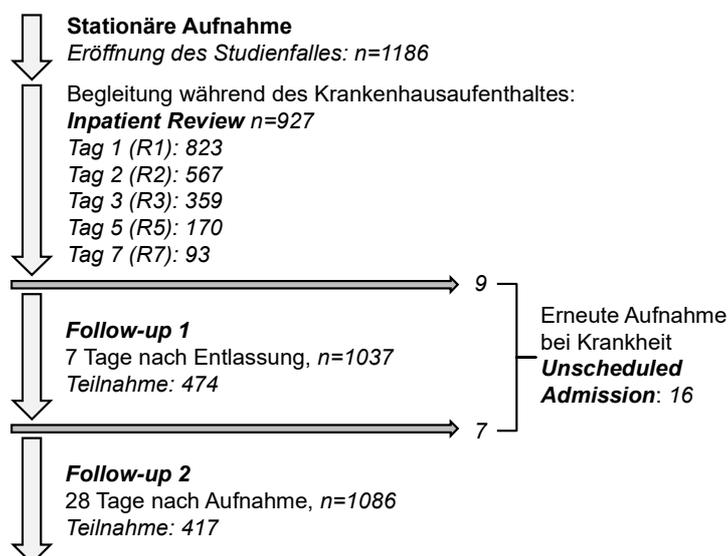


Abb. 8. Teilnehmerzahlen *Inpatient Review* und Follow-up – Insgesamt wurden 1186 Studienfälle eröffnet. Der *Inpatient Review* sowie die Follow-ups wurden zeitversetzt zum Studienbeginn eingeführt, sodass die Anzahl der möglichen Teilnehmenden geringer war. Im *Inpatient Review* konnten 927 Krankenhausaufenthalte begleitet werden. Am Follow-up 1 nahmen 1474 Kinder teil, am Follow-up 2 waren es 417 Kinder. Zwischen Entlassung und Abschluss des Studienfalls wurden 16 Kinder erneut aufgenommen.

3.2. Infektion mit *Plasmodium falciparum*

Alle 1.186 eingeschlossenen Fälle wurden durch Blutausschlag und Mikroskopie auf das Vorliegen einer *P.-falciparum*-Infektion untersucht. In 584 Proben (49,2 %) konnte *P. falciparum* mit einer Parasitendichte von $> 12.000/\mu\text{l}$ nachgewiesen werden. Dabei präsentierten 80,3 % ($n = 469$) dieser Kinder die Symptome einer unkomplizierten Infektion mit *P. falciparum*, wohingegen bei 115 Kindern (19,7 %) eine komplizierte *P.-falciparum*-Infektion vorlag. In 2,9 % ($n = 17$) der Proben mit *P.-falciparum* fanden sich zeitgleich *P. malariae* und in 0,5 % ($n = 3$) *P. ovale*. In weiteren 110 Proben (9,7 %) fand sich eine Parasitendichte von weniger als $12.000/\mu\text{l}$. Die Kinder mit einer *P.-falciparum*-Infektion waren im Median 36 Monate alt (IQR: 21-60 Monate).

3.3. Parvovirus-B19-Infektion

3.3.1. Labordiagnostik

Molekulargenetische Untersuchungen: Von den 96 getesteten Pools erwiesen sich 37 Pools als positiv, zwei zunächst grenzwertige Pools zeigten sich bei der erneuten Testung negativ. Alle Proben der positiven Pools wurden im Anschluss in einer Einzel-PCR mit Inhibitionskontrolle erneut getestet. In zwei weiteren Pools war die Inhibitionskontrolle negativ, sodass auch die Proben dieser Pools getestet wurden. Hierbei zeigte sich in einem Pool eine positive Probe, in dem anderen keine. Insgesamt war die qualitative B19V-PCR in 36 Fällen positiv, entsprechend 3,0 % der Studienpopulation.

Serologische Untersuchungen: Die primäre serologische Untersuchung mit dem Biotrin-Testkit wies in 155 Proben (13,1 %) IgM-Antikörper gegen B19V nach. Proben mit intermediärem Testergebnis wurden bei fehlender Nachtestungsmöglichkeit als negativ gewertet (139 Proben, 11,7 %). Spezifische IgG-Antikörper fanden sich in 172 Proben (14,5 %).

Die Bestätigungstestung der Seren mit dem Mikrogen-Testkit wies bei 47 Proben (16,6 %) der 283 getesteten Proben spezifische IgM-Antikörper nach, die 236 (83,4 %) übrigen Proben waren negativ. Von den zwölf zufällig ausgewählten und mit dem Mikrogen-Testkit auf IgG-Antikörper untersuchten Proben wiesen insgesamt sechs Proben (50,0 %) IgG-Antikörper auf. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Testsysteme zeigt Tab. 14.

In 46 Proben (29,7 %) wurde der IgM-Antikörper-Nachweis durch das Mikrogen-Testkit bestätigt. In den 109 weiteren Proben (70,3 %), in denen sich mit dem Biotrin-Testkit

IgM-Antikörper nachweisen ließen, fanden sich mit dem Mikrogen-Testkit aber keine Antikörper. Die Übereinstimmungsrate beider Testkits in Bezug auf den Nachweis spezifischer IgM-Antikörper war mit rund 30 % gering. Im Gegensatz hierzu war die Übereinstimmungsrate bei den negativen Ergebnissen deutlich höher (99,2 %). Nur eine zunächst negative Probe wies in der zweiten Testung IgM-Antikörper auf (0,8 %). Der p-Wert von $< 0,01$ (Exakter Test nach Fisher) unterstützt den Eindruck der unterschiedlichen Verteilung zwischen den beiden Testverfahren.

Tab. 14. Gegenüberstellung der serologischen Ergebnisse (Biotrin/Mikrogen)

	IgM (Mikrogen) (%)			p ¹
	negativ	positiv	gesamt	
IgM (Biotrin)				
negativ	127 (99,2)	1 (0,8)	128 (100)	
positiv	109 (70,3)	46 (29,7)	155 (100)	
gesamt	236 (83,4)	47 (16,6)	283 (100)	$< 0,01$
	IgG (Mikrogen) (%)			p ¹
	negativ	positiv	gesamt	
IgG (Biotrin)				
negativ	6 (85,7)	1 (14,3)	7 (100)	
positiv	0	5 (100)	5 (100)	
gesamt	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100)	0,02

¹ Exakter Test nach Fisher

In der Abb. 9 sind die als IgM-positiv gewerteten Messungen (Index-Werte der Extinktionsmessung $> 1,1$) der Biotrin-Testung dargestellt. Die in der zweiten Testung (Mikrogen-Testkit) ebenfalls positiven Proben sind mit einer Raute markiert. Mit steigenden Index-Werten in der Biotrin-Testung zeigte sich eine höhere Übereinstimmungsrate zwischen den beiden Testverfahren. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse der IgM-Testung, erfolgte ein Vergleich in Bezug auf die PCR-Resultate (Tab. 15). Die prozentuale Verteilung zeigte sich zwischen den beiden Untersuchungen annähernd gleich. Die Aussagekraft ist auch hier aufgrund der kleineren Stichprobe der zweiten Testung reduziert.

In Bezug auf die IgG-Testung zeigten beide Testkits unter Vorbehalt der sehr kleinen Stichprobe ähnliche Ergebnisse. Fünf der fünf vormals positiven Proben wurden auch mit dem Mikrogen-Testkit positiv getestet (100 %). Von den sieben negativen Proben wurden in sechs Proben ebenfalls keine Antikörper nachgewiesen und eine Probe war in der zweiten Testung positiv (Übereinstimmungsrate 85,7 %).

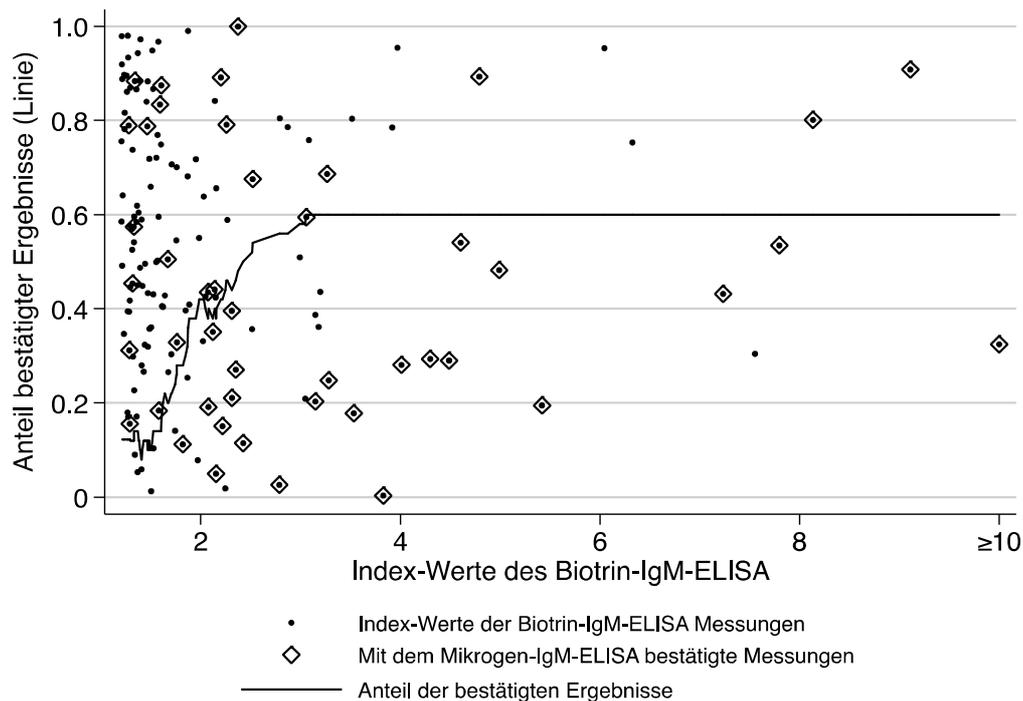


Abb. 9. Gegenüberstellung der positiven IgM-Ergebnisse der Biotrin- und Mikrogen-Testkits - In der Grafik sind die positiv gewerteten Messungen der IgM-Biotrin-Testung (Index-Wert >1,1) in Abhängigkeit ihrer Index-Werte (x-Achse) als Punkte dargestellt. Die Anordnung der Messwerte auf der y-Achse ist zufällig. Mit den Rauten markierte Punkte markieren die mit dem Mikrogen-Verfahren bestätigten Ergebnisse. Die Linie zeigt den proportionalen Anteil bestätigter Ergebnisse über ansteigende Index-Werte (gleitender proportionaler Anteil über je 50 Patienten).

Des Weiteren erfolgte eine Gegenüberstellung der Antikörper-Ergebnisse in Bezug auf eine Infektion mit *P. falciparum* (Tab. 16). Hierbei fiel eine Häufung der positiven IgM-Ergebnisse der Biotrin-Testung in der Gruppe der Kinder mit *P.-falciparum*-Infektion auf. Während 67,7 % der Kinder (n = 105) mit IgM-Antikörpern auch eine *P.-falciparum*-Infektion hatten, hatten nur 32,3 % mit IgM-Antikörpern keine *P.-falciparum*-Infektion (n = 50; χ^2 -Test $p < 0,01$). In der Mikrogen-Testung hingegen zeigte sich nur bei 59,6 % (n = 28) der Kinder mit B19V-IgM-Antikörpern eine Infektion mit *P. falciparum*, bei den weiteren 40,4 % nicht (n = 19; χ^2 -Test $p = 0,76$). Auch in der Gruppe der PCR-positiven Proben wiesen nur 55,6 % (n = 20) eine Infektion mit *P. falciparum* auf, 44,4 % hingegen nicht (n = 16; χ^2 -Test $p = 0,44$). Die Verteilung der IgG-positiven Proben in Bezug auf das Vorhandensein einer Infektion mit *P. falciparum* zeigte keine außerordentliche Häufung. Es fanden sich 95 (55,2 %) IgG-positive Proben bei gleichzeitiger *P.-falciparum*-Infektion gegenüber 77 (44,8 %) IgG-positiven Fällen in der Gruppe ohne *P.-falciparum*-Infektion (χ^2 -Test $p = 0,09$). Mögliche Ursachen der unterschiedlichen serologischen Ergebnisse werden ausführlich in Kapitel 4.1.1. diskutiert.

Tab. 15. Gegenüberstellung Biotrin- und Mikrogen IgM-Ergebnissen und B19V-PCR

	PCR (%)			p ¹
	negativ	positiv	gesamt	
IgM (Biotrin) (%)				
negativ	1.003 (87,2)	28 (77,8)	1.031 (86,9)	0,10
positiv	147 (12,8)	8 (22,2)	155 (13,1)	
gesamt	1.150 (100)	36 (100)	1.186 (100)	
IgM (Mikrogen) (%)				
negativ	206 (83,4)	30 (83,3)	236 (83,4)	0,99
positiv	41 (16,6)	6 (16,7)	47 (16,6)	
gesamt	247 (100)	36 (100)	283 (100)	
¹ χ ² -Test				

Tab. 16. Assoziation von Parvovirus B19 und *P. falciparum*

	keine <i>P.-falciparum</i> - Infektion (%)	<i>P.-falciparum</i> - Infektion (%)	gesamt (%)	p ¹
gesamt (%)	602 (50,7)	584 (49,2)	1.186 (100)	
B19V				
PCR				0,44
negativ	586 (51,0)	564 (49,0)	1.150 (97)	
positiv	16 (44,4)	20 (55,6)	36 (3,0)	
IgM (Biotrin)				< 0,01
negativ	552 (53,5)	479 (46,5)	1.031 (86,9)	
positiv	50 (32,3)	105 (67,7)	155 (13,1)	
IgM (Mikrogen)				0,76
negativ	101 (42,8)	135 (57,2)	236 (83,4)	
positiv	19 (40,4)	28 (59,6)	47 (16,6)	
¹ χ ² -Test				

Für die weitere Analyse wurden die Ergebnisse beider Testungen zusammengefasst. Aufgrund der hohen Übereinstimmungsrate bezüglich der IgM-negativen Proben wurden die negativen Ergebnisse des Biotrin-Testkits übernommen. Ein positiver IgM-Status wurde definiert, wenn beide Testkits ein positives Ergebnis zeigten. Damit waren in 46 Fällen (3,9 %) IgM-Antikörper nachweisbar. Die IgG-Antikörperuntersuchungen ergaben keine Hinweise auf große Diskrepanzen zwischen den zwei Testungen, sodass auf größere Nachtestungen verzichtet und im Weiteren die Ergebnisse der Biotrin-Testung verwendet wurden.

3.3.2. Häufigkeit, Seroprävalenz und Saisonalität

Die aktuelle B19V-Infektion wurde über das Vorliegen eines positiven PCR-Ergebnisses und/oder den Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern definiert.

Tab. 17. Übersicht der endgültigen PCR- und IgM-Ergebnisse

	PCR (%)		
	negativ	positiv	gesamt
IgM (%)			
negativ	1.110 (93,6)	30 (2,5)	1.140 (96,1)
positiv	40 (3,4)	6 (0,5)	46 (3,9)
gesamt	1.150 (97,0)	36 (3,0)	1.186 (100)

Insgesamt fand sich in 76 Fällen (6,4 %) eine aktuelle B19V-Infektion. Hiervon waren 30 Proben (39,5 %) nur PCR-positiv, 40 Proben (52,6 %) nur IgM-positiv und lediglich 6 Proben (8,6 %) in beiden Untersuchungen positiv (Tab. 17). Tab. 18 zeigt eine Übersicht der Antikörperkonstellationen bei aktueller B19V-Infektion. In der Gruppe mit positiver PCR zeigten sich in drei Fällen keine Antikörper (3,9 %), in sechs Fällen IgM- und IgG-Antikörper (7,9 %) und in 27 Proben nur IgG-Antikörper (35,5 %). Keine der Proben wies bei positiver PCR nur IgM-Antikörper auf. Bei negativer PCR und aktueller B19V-Infektion ließen sich in 32 Fällen (42,1 %) nur IgM-Antikörper und in acht Fällen (10,5 %) IgM- und IgG-Antikörper nachweisen. Acht Fälle aus der Gruppe des positiven IgM-Antikörper-Status ohne IgG-Seropositivität konnten nach einem Monat zum Follow-up 2 noch einmal untersucht werden. Bei keinem der Fälle ließ sich eine Serokonversion beobachten.

Tab. 18. Antikörperkonstellation und PCR bei B19V-Infektion

	IgM - / IgG -	IgM + / IgG -	IgM + / IgG +	IgM - / IgG +	gesamt (%)
B19V-PCR (%)					
negativ	-	32 (42,1)	8 (10,5)	-	40 (52,6)
positiv	3 (3,9)	0 ()	6 (7,9)	27 (35,5)	36 (47,4)
gesamt	3 (3,9)	32 (42,1)	14 (18,4)	27 (35,5)	76 (100)

Insgesamt waren 172 Serumproben IgG-positiv und ließen sich 163 unterschiedlichen Kindern zuordnen. Zum Ausschluss der Übertragung maternaler Antikörper wurden für die Berechnung der IgG-Seroprävalenz nur Kinder berücksichtigt, die älter als ein Jahr waren. Demnach lag die IgG-Seroprävalenz in unserer Population bei 17,0 % (n = 155/889). Abb. 10 zeigt die Anzahl der Patienten mit nachgewiesenen IgG-Antikörpern in den jeweiligen Altersgruppen. Kinder zwischen 11 und 14 Jahren wurden zu einer Gruppe zusammengefasst, da sie einen

prozentual geringen Anteil der Kinder ausmachten (43 Kinder; 3,9 %). In der Gruppe der achtjährigen Kinder fiel ein niedriger Prozentsatz mit IgG-Antikörpern auf (4/29, 13,8 %). Demgegenüber ließen sich unter den siebenjährigen Kindern bei 69,4 % (11/25) und unter den neunjährigen Kindern bei 52,9 % (9/17) IgG-Antikörper nachweisen.

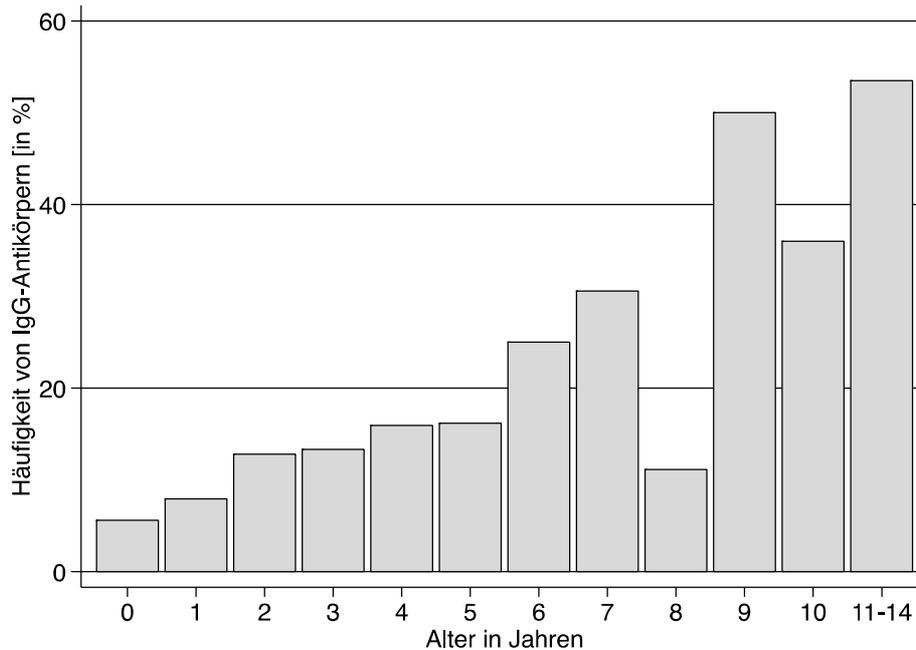


Abb. 10. IgG-Seroprävalenz Parvovirus B19 - Die Grafik zeigt die prozentuale Häufigkeit von spezifischen IgG-Antikörpern in den jeweiligen Altersgruppen. Aufgrund der geringen Anzahl von Kindern zwischen 11 und 14 Jahren ($n = 43$, 3,9 %), wurde diese Gruppe zusammengefasst. In der Gruppe der achtjährigen Kinder fiel ein niedriger Prozentsatz mit IgG-Antikörpern auf (4/29, 13,8 %).

In den 18 Studienmonaten fanden sich bei einem bis maximal acht Fällen eine aktuelle B19V-Infektion, entsprechend einem Anteil von 1,5-22,2 % der jeweils rekrutierten Fälle. Dabei zeigte sich eine temporäre Häufung, innerhalb der ersten neun Studienmonate fanden 71 % der Infektionen ($n = 54$) statt. Anhalt für ein saisonales Vorkommen bot sich nicht. Die beschriebene Häufung ist im Sinne eines zyklischen Auftretens der Viruserkrankung über mehrere Jahre denkbar. Abb. 11 zeigt die relativen Häufigkeiten der Infektion über den Studienzeitraum.

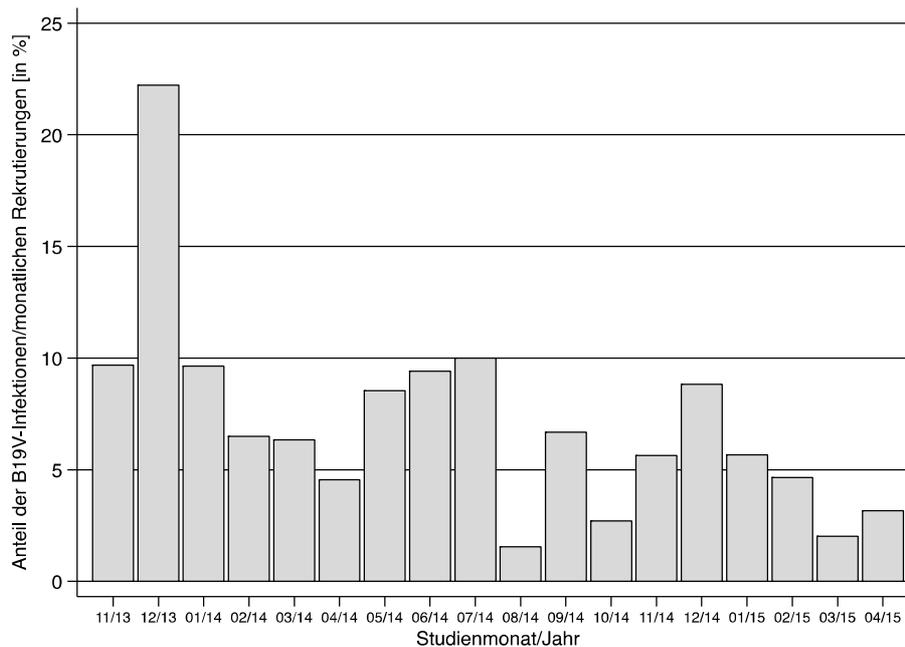


Abb. 11. Häufigkeit von B19V-Infektionen über den Studienzeitraum - Die Abb. zeigt den prozentualen Anteil der B19V-Infektionen bezogen auf die jeweilige monatliche Gesamtzahl der Rekrutierungen.

3.3.3. Klinische Präsentation

Die Kinder mit B19V-Infektion waren mit 37,5 Monaten im Median (IQR: 24-62 Monate) älter als die Kinder ohne Infektion (Median: 29, IQR: 15-52 Monate; Median-Test $p = 0,03$). Die Mehrheit der Kinder war männlichen Geschlechts ($n = 47$, 61,8 %), gegenüber 53,9 % in der Gruppe ohne Infektion ($n = 598$; χ^2 -Test $p = 0,17$). Die Temperatur lag im Median bei 39,3°C (IQR: 38,8-39,8°C) und unterschied sich nicht wesentlich von der Gruppe ohne B19V-Infektion (Median: 39,0°C IQR: 38,5-39,6°C; Median-Test $p = 0,12$). Im Median blieben beide Gruppen 2 d im Krankenhaus. Bei Betrachtung des IQR fiel dennoch eine etwas kürzere Aufenthaltsdauer der Kinder mit B19V-Infektion auf (IQR: 1-3 d, ohne Infektion 2-4 d; Median-Test $p = 0,01$). In Tab. 19 sind die Eckdaten der Fälle mit B19V-Infektion der Gruppe ohne B19V-Infektion gegenübergestellt.

Bei keinem der Kinder mit aktueller B19V-Infektion stellten die behandelnden Ärzte den klinischen Verdacht auf ein Erythema infectiosum. Je zwei Kinder (2,6 %) hatten einen Hautausschlag und eine generalisierte Lymphadenopathie. In der klinischen Untersuchung fand sich bei 13,2 % ($n = 10$) eine Splenomegalie. Unter den Kindern mit B19V-Infektion zeigten 44,7 % ($n = 34$) Erbrechen, 21,0 % ($n = 16$) Husten und 17,1 % ($n = 13$) Durchfall. Weitere 11,8 % ($n = 9$) hatten Dyspnoe und 5,3 % ($n = 4$) Bauchschmerzen. Keines der Kinder zeigte neurologische Auffälligkeiten. Eine Übersicht der Symptome bei B19V-Infektion findet sich in Tab. 20.

Tab. 19. Eckdaten Parvovirus-B19-Infektion

Parameter	keine B19V-Infektion (%)	B19V-Infektion (%)	p ¹
gesamt	1.110 (93,6)	76 (6,4)	
Alter [Monate]			
Median (IQR)	29 (15-52)	37,5 (24-62)	0,03
Geschlecht			0,17
männlich	598 (53,9)	47 (61,8)	
weiblich	512 (46,1)	11 (38,2)	
Temperatur [°C]			
Median (IQR)	39,0 (38,5-39,6)	39,3 (38,7-39,8)	0,12
Aufenthaltsdauer [d]			
Median (IQR)	2 (2-4)	2 (1-3)	0,01

¹ Median-Test und X²-Test

Tab. 20. Symptome bei Parvovirus-B19-Infektion

Parameter	keine B19V-Infektion (%)	B19V-Infektion (%)	p ¹
gesamt	1110 (93,6)	76 (6,4)	
Erbrechen	437 (39,4)	34 (44,7)	0,36
Husten	285 (25,7)	16 (21,0)	0,37
Durchfall	189 (17,0)	13 (17,1)	0,98
Splenomegalie ²	98 (8,8)	10 (13,2)	0,31
Dyspnoe ²	106 (9,6)	9 (11,8)	0,60
Bauchschmerzen	56 (5,0)	4 (5,3)	0,79
Hepatomegalie ²	76 (6,9)	7 (9,2)	0,51
Lymphadenopathie ²	3 (0,3)	2 (2,7)	0,02
Hautausschlag ²	24 (2,2)	2 (2,6)	0,20
Neurologische Symptomatik	32 (2,9)	0	0,26

¹ X²-Test; bei Zellenhäufigkeit < 5 Exakter Test nach Fisher
² Fehlende Angaben: Splenomegalie 12; Dyspnoe 9; Hepatomegalie 11; Lymphadenopathie 6; Hautausschlag 1.

Anhand der klinischen Symptomatik wurde apparative und laborchemische Zusatzdiagnostik durchgeführt und eine oder mehrere Behandlungsdiagnosen gestellt. In Tab. 21 sind die weiteren Diagnosen der Kinder mit B19V-Infektion aufgeführt. Bei 14,5 % (n = 11) ließ sich eine obere Atemwegsinfektion feststellen, bei 18,4 % (n = 14) eine untere Atemwegsinfektion und bei 10,5 % (n = 8) eine Pneumonie. Diese Häufigkeiten unterschieden sich nicht relevant von der Gruppe ohne B19V-Infektion. Auch die Häufigkeit einer Durchfallerkrankung war in beiden Gruppen gleich (17,0 vs. 17,1 %, X²-Test p = 0,98). Während sich bei 13,2 % (n = 10) der Kinder mit B19V-Infektion eine zeitgleiche Harnwegsinfektion fand, waren es in der Vergleichsgruppe 17,8 % (n = 198; X²-Test p = 0,30). Die SIRS-Symptomatik war unter

Kindern mit B19V-Symptomatik häufiger als in Abwesenheit der Infektion (68,4 %, n = 52 vs. 56,1 %, n = 620; χ^2 -Test p = 0,04). Eine Sepsis trat jedoch nicht gehäuft auf und war insgesamt selten (3,4 %, n = 37 ohne B19V; 2,6 %, n = 2 mit B19V; χ^2 -Test p = 1,00). Bei den zwei Kindern mit B19V-Infektion und Sepsis ließ sich eine Bakteriämie mit *Haemophilus influenzae* bzw. *Salmonella spp.* nachweisen. Eine zeitgleiche Infektion mit *P. falciparum* fand sich bei 46 Kindern (60,5 %), wobei acht Kinder die Symptomatik einer komplizierten *P.-falciparum*-Infektion präsentierten (10,5 %). Damit war ein komplizierter Verlauf in der Gruppe der Koinfektionen häufiger als in der Gruppe der *P.-falciparum*-Monoinfektion (n = 538, 48,5 %; p = 0,04). Die Koinfektionen werden in Kapitel 3.4. weiterführend dargestellt.

Tab. 21. Weitere Diagnosen bei B19V-Infektion

	keine B19V-Infektion (%)	B19V-Infektion (%)	p ¹
gesamt	1.110 (93,6)	76 (6,4)	
Oberer Atemwegsinfekt	162 (14,6)	11 (14,5)	1,00
Unterer Atemwegsinfekt	264 (23,8)	14 (18,4)	0,28
Pneumonie	109 (9,8)	8 (10,5)	0,84
Durchfall	189 (17,0)	13 (17,1)	0,98
Harnwegsinfekt	198 (17,8)	10 (13,2)	0,30
SIRS	620 (56,1)	52 (68,4)	0,04
Sepsis	37 (3,4)	2 (2,6)	1,00
<i>P.-falciparum</i> -Infektion	538 (48,5)	46 (60,5)	0,04
Komplizierte <i>P.-falciparum</i> -Infektion	107 (9,6)	8 (10,5)	0,80

¹ χ^2 -Test; bei Zellenhäufigkeit < 5 Exakter Test nach Fisher

3.3.4. Risikofaktoren für eine Parvovirus-B19-Infektion

Zunächst erfolgte die Betrachtung der prozentualen Häufigkeiten und die univariate Analyse der möglichen Risikofaktoren. Die Mehrheit der Kinder mit B19V-Infektion waren männlichen Geschlechts (n = 47, 61,8 %), in der Gruppe ohne B19V-Infektion zeigte sich dies weniger ausgeprägt (n = 598, 54,4 %). Das Risiko einer B19V-Infektion gegenüber dem weiblichen Geschlecht stellte sich mit einer OR von 1,4 (95%-KI: 0,9-2,2; p = 0,17) als nicht signifikant erhöht dar. Bei Betrachtung der prozentualen Häufigkeiten waren mehr Kinder mit B19V-Infektion fünf Jahre oder älter als ohne B19V-Infektion (n = 23, 30,0 % vs. n = 248, 22,3 %). Die zugehörige OR lag bei 1,5 (95%-KI: 0,9-2,5; p = 0,12).

Innerhalb der Gruppe der Kinder mit B19V-Infektion hatten 11,8 % (n = 9) keine Geschwister und jeweils 43,4 % (n = 33) 1-2 und 3-12 Geschwister. Im Vergleich dazu hatten in der weiteren Studienpopulation nur 34,6 % (n = 384) mehr als zwei und 22,6 % (n = 251) keine Geschwister. Das Risiko einer B19V-Infektion zeigte sich mit einer OR von 2,0 (95%-KI: 0,9-4,2, p = 0,07)

für Kinder mit 1-2 Geschwistern und mit einer OR von 2,4 (95%-KI: 1,1-5,1; $p = 0,02$) für Kinder mit mehr als zwei Geschwistern erhöht.

In der Vergleichsgruppe stammten 56,8 % ($n = 630$) aus der Volksgruppe der Akan und 40,0 % ($n = 444$) aus der Gruppe der Northeners. Innerhalb der Gruppe mit B19V-Infektion gehörten im Vergleich etwas mehr Kinder Familien der Northeners an (51,3 %, $n = 39$). Dabei ergab sich eine OR von 1,5 (95%-KI: 0,9-2,4; $p = 0,09$). Während der sozioökonomische Status innerhalb der Gruppe ohne B19V-Infektion nahezu ausgeglichen verteilt war, kamen mehr Kinder mit B19V-Infektion aus einer Familie mit niedrigem sozioökonomischem Status ($n = 50$, 65,8 %). Hieraus ergab sich ein erhöhtes Risiko einer B19V-Infektion bei niedrigem sozioökonomischem Status mit einer OR von 2,0 (95%-KI: 1,2-3,3; $p < 0,01$).

Kinder mit der Grunderkrankung eines G6PD-Mangels wiesen nicht gehäuft eine B19V-Infektion auf (1,3 %, $n = 1$ vs. 4,1 %, $n = 45$), dementsprechend ergab sich eine OR von 0,3 (95%-KI: 0,0-2,6; $p = 0,17$). Auch Kinder mit einer Sichelzellerkrankung waren in der Gruppe der B19V-Infektion nicht häufiger vertreten (3,9 %, $n = 3$ vs. 3,2 %, $n = 36$), die OR lag bei 1,2 (95%-KI: 0,4-4,1; $p = 0,75$).

Nach Einschluss der Faktoren mit möglicher Signifikanz ($p < 0,1$) in eine logistisches Regressionsmodell stellte sich der sozioökonomische Status als einziger unabhängiger Risikofaktor heraus (OR: 2,1; 95%-KI: 1,3-3,4; $p < 0,01$). Die Ergebnisse der Risikoanalyse sind in Tab. 22 zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Tab. 22. Risikofaktoren für eine B19V-Infektion (uni- und multivariate Analyse)

Parameter	B19V-Infektion ¹	keine B19V-Infektion	gesamt	Univariate Analyse OR (95%-KI)	p ²	Multivariate Analyse ³ OR (95%-KI)	p ²
Gesamt	76 (6,4)	1.110 (93,6)	1.186				
Geschlecht							
weiblich	29 (38,2)	512 (46,1)	541 (45,6)	1		-	
männlich	47 (61,8)	598 (53,9)	645 (54,4)	1,4 (0,9-2,2)	0,17	-	
Alter							
Median (IQR) [Monate]	37,5 (24-62,5)	29 (15-52)	29 (15-53)				
< 5 Jahre	53 (69,7)	862 (77,7)	915 (77,1)	1		-	
≥ 5 Jahre	23 (30,3)	248 (22,3)	271 (22,9)	1,5 (0,9-2,5)	0,12	-	
Geschwister⁴							
keine	9 (11,8)	251 (22,6)	260 (21,9)	1		-	
1-2	33 (43,4)	460 (41,4)	493 (41,6)	2,0 (0,9-4,2)	0,05	-	
3-12	33 (43,4)	384 (34,6)	417 (35,2)	2,4 (1,1-5,1)		-	
Volkszugehörigkeit⁴							
Akan	37 (48,7)	630 (56,8)	667 (56,2)	1		-	
Northeners	39 (51,3)	444 (40,0)	483 (40,7)	1,5 (0,9-2,4)	0,09	-	
Sozioökonomischer Status^{4,5}							
hoch	26 (34,2)	560 (50,4)	586 (49,4)	1		1	
niedrig	50 (65,8)	534 (48,1)	584 (49,2)	2,0 (1,2-3,3)	< 0,01	2,1 (1,3-3,4)	< 0,01
G6PD-Mangel							
nein	75 (98,7)	1.065 (95,9)	1.140 (96,1)	1		-	
ja	1 (1,3)	45 (4,1)	46 (3,9)	0,3 (0,0-2,6)	0,17	-	
Sichelzellkrankheit							
nein	73 (96,1)	1.074 (96,8)	1.147 (96,7)	1		-	
ja	3 (3,9)	36 (3,2)	39 (3,3)	1,2 (0,4-4,1)	0,75	-	

¹ Alle Proben mit übereinstimmenden serologischen Resultaten in beiden Verfahren (Biotrin und Mikrogen) wurden als IgM-positiv gewertet. Alle Proben, die in der qualitativen PCR positiv waren, sind hier ebenfalls als positive Fälle aufgeführt. Sechs Proben waren PCR- und IgM-positiv.

² Der Vergleich dichotomer und nominaler Daten wurde mit einer logistischen Regressionsanalyse erstellt.

³ Die Werte sind für alle anderen aufgeführten Variablen adjustiert.

⁴ Fehlende Angaben: Geschwister 16; Volkszugehörigkeit 5, 31 Kinder gehörten anderen Volksgruppen an; Sozioökonomischer Status 16.

⁵ Der sozioökonomische Index wurde aus neun Indikatorvariablen konstruiert. Diese wurden in eine tetrachorische Korrelation und Hauptkomponentenanalyse eingeschlossen. Im Anschluss wurde eine binäre Variable erstellt, hierbei wurde die Population in zwei gleich große Gruppen geteilt.

3.4. Koinfektionen

3.4.1. Häufigkeit und Verlauf der Koinfektion

Im Studienzeitraum hatten insgesamt 46 Kinder eine Koinfektion mit *P. falciparum* und B19V, entsprechend 60,5 % der Gesamtzahl der B19V-Infektionen und 3,9 % der gesamten Studienpopulation. Die Häufigkeit der Mono- und Koinfektionen über den Studienzeitraum ist in der Abb. 12 dargestellt. Während die *P.-falciparum*-Infektion ein saisonales Vorkommen zeigte, fand sich dies für B19V-Mono- und Koinfektionen nicht.

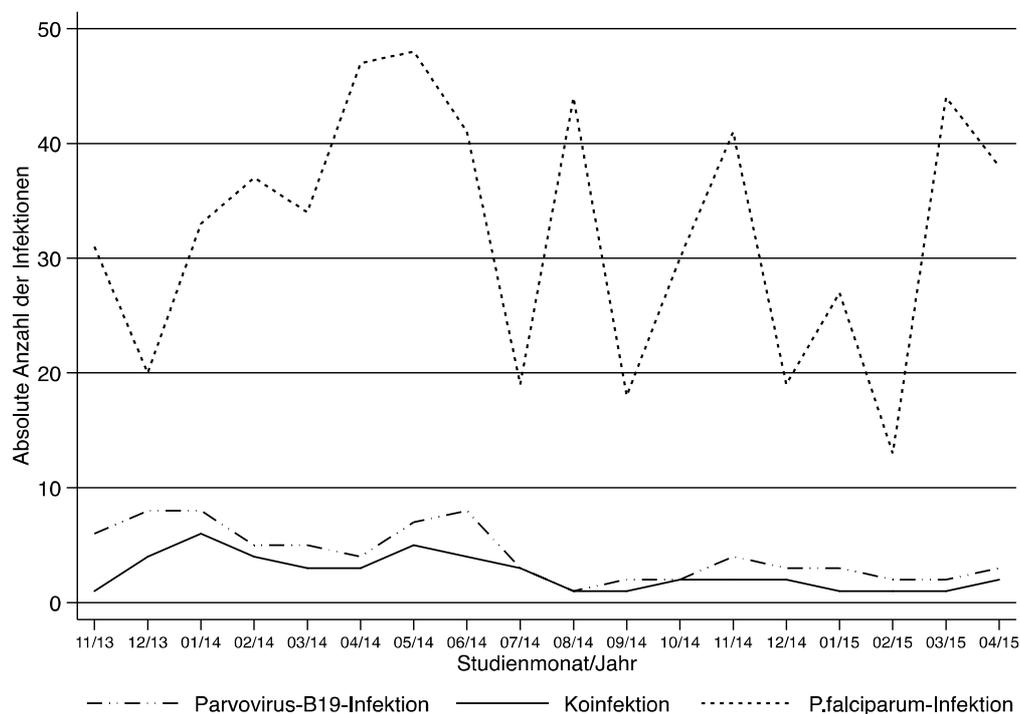


Abb. 12. Auftreten von Mono- und Koinfektionen über den Studienzeitraum - Die Grafik zeigt die absolute Anzahl der Infektionen mit *P. falciparum* und B19V über den Studienzeitraum von 18 Monaten. Zudem ist die Häufigkeit der Koinfektionen dargestellt.

Unter den Kindern mit B19V-Monoinfektion waren 70,0 % (n = 30) männlich, gegenüber 53,0 % (n = 285) der Kinder mit *P.-falciparum*-Monoinfektion und 56,5 % (n = 26) der Kinder mit einer Koinfektion (χ^2 -Test p = 0,18). Im Median waren die Kinder mit *P.-falciparum*-Monoinfektion mit 35 Monaten (IQR: 20-58 Monate) am jüngsten, gefolgt von Kindern mit Koinfektion (Median 37,5 Monate, IQR: 27-60 Monate) und Kindern mit einer B19V-Monoinfektion (Median 39,5 Monate, IQR: 20-65 Monate; Median-Test p = 0,26). In der Gruppe der B19V-Monoinfektion lag die mediane Temperatur bei 39,0°C (IQR: 38,7-39,6°C), in der Gruppe mit *P.-falciparum*-Monoinfektion bei 39,3°C (IQR: 38,8-39,8°C) und bei den Patienten mit

Koinfektion bei 39,4°C (IQR: 38,8-39,8; Median-Test p = 0,69). Die mediane Aufenthaltsdauer lag in allen Gruppen bei 2 d (Median-Test p = 0,39). Bei Betrachtung der IQR war die Gruppe der B19V-Monoinfektionen mit 2-3 d im Vergleich zu 1-3 d bei *P.-falciparum*-Monoinfektion sowie bei Koinfektionen etwas länger im Krankenhaus. Insgesamt fand sich bei Betrachtung dieser Parameter kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B19V-, und *P.-falciparum*-Mono- und Koinfektion (Tab. 23).

Tab. 23. Eckdaten zu Mono- und Koinfektionen

Parameter	B19V-Monoinfektion (%)	<i>P.-falciparum</i> -Monoinfektion (%)	Koinfektion (%)	p ¹
gesamt n = 614	30 (4,9)	538 (87,6)	46 (7,5)	
Geschlecht				
männlich	21 (70,0)	285 (53,0)	26 (56,5)	0,18
Alter [Monate]				
IQR	20-65	20-58	27-60	
Median	39,5	35	37,5	0,26
Temperatur [°C]				
IQR	38,7-39,6	38,8-39,8	38,8-39,8	
Median	39,0	39,3	39,4	0,69
Aufenthaltsdauer [d]				
IQR	2-3	1-3	1-3	
Median	2	2	2	0,39

¹ Median-Test und X²-Test

3.4.2. Klinische Symptomatik der Mono- und Koinfektionen

Respiratorische Symptome wie Dyspnoe, oberer Atemwegsinfekt und Pneumonie fanden sich in der Gruppe der B19V-Monoinfektionen (16,7 %, 30 % und 20 %) häufiger als in den Gruppen mit *P.-falciparum*-Monoinfektion und Koinfektion (5,2 %, 9,7 % und 2,0 % sowie 8,7 % und je 4,4 %; X²-Test/Exakter Test nach Fisher p = 0,02 und je p < 0,01). Bauchschmerzen hatten 3,3-6,5 % der Kinder, 13,3 %-19,6 % hatten Durchfall und Erbrechen lag bei 40-49,6 % vor. Relevante Unterschiede in der Häufigkeit zeigten sich zwischen den Gruppen nicht (X²-Test/Exakter Test nach Fisher p = 0,82, p = 0,43 und p = 0,60). Harnwegsinfektionen waren in der Gruppe mit B19V-Monoinfektion mit 6,7 % seltener als in der Gruppe mit *P.-falciparum*-Monoinfektion (18,6 %) sowie unter den Kindern mit Koinfektion (17,4 %; Exakter Test nach Fisher p = 0,27). Ein SIRS fand sich bei der Mehrheit der Kinder in allen drei Gruppen (62,4-69,6 %; X²-Test p = 0,59). Eine Sepsis hingegen trat selten auf, keines der Kinder mit Koinfektion war davon betroffen, unter den

Kindern mit *P.-falciparum*-Monoinfektion waren es drei Kinder (0,6 %) und in der Gruppe der B19V-Monoinfektion zwei Kinder (6,7 %; Exakter Test nach Fisher $p = 0,03$). Eine neurologische Symptomatik fand sich nur unter den Kindern mit *P.-falciparum*-Monoinfektionen ($n = 18$, 3,6 %). Eine Gegenüberstellung der klinischen Symptome und Diagnosen bei B19V- und *P.-falciparum*-Monoinfektionen sowie der Koinfektion findet sich in Tab. 24.

Tab. 24. Klinische Präsentation/Diagnosen bei Mono- und Koinfektionen

Parameter	B19V-Monoinfektion (%)	<i>P.-falciparum</i> -Monoinfektion (%)	Koinfektion (%)	p ¹
gesamt n = 614	30 (4,9)	538 (87,6)	46 (7,5)	
Dyspnoe	5 (16,7)	28 (5,2)	4 (8,7)	0,02
Oberer Atemwegsinfekt	9 (30,0)	52 (9,7)	2 (4,4)	< 0,01
Unterer Atemwegsinfekt	6 (20,0)	94 (17,5)	8 (17,4)	0,91
Pneumonie	6 (20,0)	11 (2,0)	2 (4,4)	< 0,01
Bauchschmerzen	1 (3,3)	26 (4,8)	3 (6,5)	0,82
Erbrechen	12 (40,0)	267 (49,6)	22 (47,8)	0,60
Durchfall	4 (13,3)	70 (13,0)	9 (19,6)	0,42
Harnwegsinfektion	2 (6,7)	100 (18,6)	8 (17,4)	0,27
SIRS	20 (66,7)	334 (62,4)	32 (69,6)	0,59
Sepsis	2 (6,7)	3 (0,6)	0	0,03
Neurologische Symptome	0	18 (3,6)	0	0,43

¹ X²-Test; bei Zellenhäufigkeit < 5 Exakter Test nach Fisher

Nicht in allen Fällen klinischer Diagnosen gelang im Nachhinein ein entsprechender Erregernachweis. Bei 76,1 % der Kinder mit Koinfektion ($n = 35$) ließen sich keine weiteren Krankheitserreger nachweisen; auch unter den Kindern mit *P.-falciparum*-Monoinfektion waren bei 80,0 % ($n = 428$) die Malaria-Erreger die einzige nachgewiesene Krankheitsursache. Unter den 30 Kindern mit B19V-Monoinfektion ließ sich hingegen bei der Hälfte (50,0 %) eine weitere Krankheitsursache nachweisen. Bei den zwei Kindern mit Sepsis fand sich eine Bakteriämie, bei drei Kindern ein Durchfallerreger und bei den übrigen zehn Kindern Erreger von Atemwegsinfektionen. Auch unter den Kindern mit Koinfektion und weiterem Erregernachweis fanden sich bei acht Kindern ein Erreger einer Atemwegsinfektion oder Pneumonie und bei drei Kindern ein Durchfallerreger.

3.4.3. Verlauf der Mono- und Koinfektionen

Aus den Daten des *Inpatient Review* und der Follow-ups ließen sich Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf einzelner Kinder schließen, für eine generelle Beschreibung der Verläufe

von Mono- und Koinfektionen war die Fallzahl zu gering. Anhalt für eine längere stationäre Aufnahme, schwerere Fieberverläufe oder eine akute oder verzögerte Entwicklung schwerer Anämie bei B19V-Mono- und Koinfektionen ergab sich nicht. Im Anhang findet sich eine Tab. mit detaillierten Informationen zu den Kindern mit B19V-Mono- und Koinfektion.

3.5. Anämie

3.5.1. Häufigkeit und Charakteristika

Der Hb-Wert in der Studienpopulation lag im Median bei 10,2 g/dl mit einem IQR von 8,6-11,5 g/dl. Unter den Kindern hatten 11,7 % (n = 139) eine schwere, 38,7 % (n = 459) eine moderate, 17,3 % (n = 205) eine milde und 32,1 % (n = 381) keine Anämie. Nach Zusammenfassung der Gruppen hatten 49,5 % (n = 586) keine Anämie gegenüber 50,5 % (n = 598) mit einer Anämie. In dieser Gruppe lag der Hb-Wert im Median bei 8,6 g/dl (IQR: 7,2-9,4 g/dl). Der Altersmedian der Kinder mit Anämie lag bei 30 Monaten (IQR: 16-55 Monate). In 54,8 % der Fälle handelte es sich um eine normochrom-normozytäre Anämie und in 23,2 % um eine hypochrom-mikrozytäre Form. Andere Unterformen waren selten, eine Übersicht ist in Tab. 25 aufgeführt. Auch in der Gruppe ohne Anämie waren die Erythrozytenindizes ähnlich verteilt. Neben 67,9 % mit normochrom-normozytären Erythrozyten hatten 23,7 % ebenfalls hypochrom-mikrozytäre Erythrozyten.

Tab. 25. Anämieformen

Parameter	Korpuskuläre Hb-Konzentration (MCH)			
	n = Anzahl der Fälle mit Anämie (%)			
Korpuskuläres Erythrozytenvolumen (MCV)	hypochrom	normochrom	hyperchrom	gesamt
mikrozytär	139 (23,2)	59 (9,9)	0	198 (33,1)
normozytär	33 (5,5)	328 (54,8)	15 (2,5)	376 (62,9)
makrozytär	0	10 (1,7)	14 (2,4)	24 (4,0)
gesamt	172 (28,8)	397 (66,4)	29 (4,8)	598 (100)

3.5.2. Anämie bei Mono- und Koinfektionen

In der Studienpopulation hatten 50,5 % der Kinder eine Anämie, verglichen hierzu waren Kinder mit einer B19V-Infektion mit einem Anteil von 64,0 % etwas häufiger betroffen (X^2 -Test $p = 0,02$). Unter den Kindern mit einer B19V-Monoinfektion hatten 55,2 % eine Anämie (n = 16), verglichen zu 42,0 % der Kinder (n = 240) ohne Nachweis der Virusinfektion (X^2 -Test $p = 0,16$). In der Gruppe mit Koinfektion von B19V und *P. falciparum* waren mit 69,9 % (n = 32) prozentual mehr Kinder von einer Anämie betroffen als bei Monoinfektion mit *P.*

falciparum-Monoinfektion (57,7 %, n = 310; χ^2 -Test p = 0,12). Der mediane Hb-Wert unterschied sich zwischen den Gruppe B19V- und *P.-falciparum*-Monoinfektion sowie Koinfektion beider Erreger nicht relevant (9,5 g/dl, 9,6 g/dl und 9,4 g/dl; Median-Test p = 0,95). Eine Übersicht der Anämie bei Mono- und Koinfektion findet sich in Tab. 26. Bei Betrachtung der Erythrozytenindizes in den einzelnen Subgruppen zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zur Gesamtpopulation, die Mehrheit der Fälle hatte eine normochrom-normozytäre Anämie.

Tab. 26. Anämie bei Mono- und Koinfektion (n = 1.184¹)

	gesamt (%)		keine <i>P.-falciparum</i> - Infektion (%)		<i>P.-falciparum</i> -Infektion (%)	
	keine Anämie	Anämie	keine Anämie	Anämie	keine Anämie	Anämie
gesamt	586 (49,5)	598 (50,5)	345 (57,4)	256 (42,6)	241 (41,3)	342 (58,7)
keine B19V-Infektion	559 (50,4)	550 (49,6)	332 (58,0)	240 (42,0)	227 (42,3)	310 (57,7)
B19V-Infektion	27 (36,0)	48 (64,0)	13 (44,8)	16 (55,2)	14 (30,4)	32 (69,6)
p ²	0,02		0,16		0,12	

¹ Blutbild nur für 1184 Fälle vorliegend (75/76 B19V-Infektionen)
² χ^2 -Test

Unter den Kindern mit positiver B19V-PCR hatten 57,1 % (20/35) eine Anämie, gegenüber 71,7 % (33/46) der Kinder mit positivem IgM-Antikörperstatus. Der mediane Hb-Wert der B19V-PCR-positiven Gruppe lag bei 10,1 g/dl (IQR: 8,4-11,6 g/dl) und war gegenüber der Gruppe mit positivem IgM-Antikörperstatus höher (Medianer Hb-Wert 9 g/dl; IQR: 7,6-10,5 g/dl; Median-Test p = 0,08).

Bei Betrachtung der Altersverteilung fiel auf, dass die Kinder mit einer *P.-falciparum*-Monoinfektion und einer Anämie jünger waren als die Kinder ihrer Gruppe ohne Anämie (29 Monate; IQR: 18-49 Monate vs. Median: 39 Monate; IQR: 24-64; Median-Test p < 0,01). Die Kinder mit einer B19V-Monoinfektion waren insgesamt älter, allerdings waren auch die Kinder mit Anämie im Median älter als die Kinder ohne Anämie (46 Monate; IQR: 19-72 vs. 35 Monate; IQR: 21-65; Median-Test p = 0,87). Das Alter der Kinder mit einer Koinfektion unterschied sich in Abhängigkeit von der Anämie nicht wesentlich (ohne Anämie: 38,5 Monate; IQR: 27-72 vs. mit Anämie 37,5 Monate; IQR: 26,5-60; Median-Test p = 0,75). Die Altersverteilung in Abhängigkeit vom Infektionsstatus und Anämie ist in Tab. 27 aufgeführt.

Tab. 27. Altersverteilung der Anämie bei Mono- und Koinfektion (n = 1184¹)

Parameter	Gesamt (%)		keine <i>P.-falciparum</i> -Infektion (%)		<i>P.-falciparum</i> -Infektion (%)	
	keine Anämie	Anämie	keine Anämie	Anämie	keine Anämie	Anämie
keine B19V-Infektion	559 (50,4)	550 (49,6)	332 (58,0)	240 (42,0)	227 (42,3)	310 (57,7)
Alter [in Monaten]						
Median	29	29	22	29,5	39	29
IQR	14-51	16-55	10-36,5	11,5-60	24-64	18-49
p ² (Altersmedian gegen Hb)	0,53		< 0,01		< 0,01	
B19V-Infektion	27 (36,0)	48 (64,0)	13 (44,8)	16 (55,2)	14 (30,4)	32 (69,6)
Alter [in Monaten]						
Median	36	38,5	35	46	38,5	37,5
IQR	24-72	22-60	21-65	19-72	27-72	26,5-60
p ² (Altersmedian gegen Hb)	0,93		0,87		0,75	

¹ Blutbild nur für 1184 Fälle definiert; (75/76 B19V-Infektionen)
² Median-Test

3.5.3. Verlauf der Anämie über den Beobachtungszeitraum

Von den 443 Fällen mit Anämie konnten 92,3 % in das *Inpatient-Review-System* eingeschlossen werden (Einführung des *IR* erst im Studienverlauf, daher n = 443). Innerhalb der ersten 24 h bekamen hiervon 44 Kinder eine und zwei Kinder zwei Bluttransfusionen. Die Ausgangs-Hb-Werte am Tag der Aufnahme lagen hierbei zwischen 2,4 und 10,9 g/dl, mit einem Median von 8,2 g/dl. Insgesamt bekamen 90 der 443 im *Inpatient Review* erfassten Kinder mit einer Anämie während ihres Krankenhausaufenthaltes in der Summe 114 Transfusionen. Aus der Gruppe mit Anämie konnten 170 Kinder (38,4 %) am Tag des Follow-up 2 noch einmal untersucht werden. Während des Krankenhausaufenthaltes oder nach Entlassung erhielten 25 (14,7 %) von ihnen eine oder mehrere Bluttransfusionen. Aus der Gruppe bekamen 62 Kinder (36,5 %) eine Eisensubstitutionsbehandlung, 17 (10,0 %) wurden mit Folsäurepräparaten behandelt. Acht dieser Kinder hatten nach rund einem Monat immer noch eine schwere Anämie (4,7 %), 36 Kinder eine moderate Anämie (21,2 %), 37 Kinder nur noch eine milde Anämie (21,8 %) und 89 Kinder keine Anämie mehr (52,3 %). Bei Betrachtung des medianen Hb-Wertes zeigte sich ein schrittweiser Anstieg um insgesamt 2,2 g/dl. Der mediane Hb-Wert der Subgruppe lag am Aufnahmetag bei 8,9 g/dl (IQR: 7,8-9,5 g/dl), zum Follow-up 1 bei 10,8 g/dl (IQR: 9,9-11,4 g/dl; n = 107) und am Tag des Follow-up 2 bei 11,1 g/dl (IQR: 10,3-11,9 g/dl). Abb. 13 vergleicht den Verlauf der Hb-Werte zwischen den Gruppen mit und ohne Anämie. In der Gruppe ohne Anämie sind 224 Verlaufswerte zusammengefasst; der Anteil der Kinder, die zusätzlich am Follow-up 1 teilgenommen haben war geringer (143/224).

3. Ergebnisse

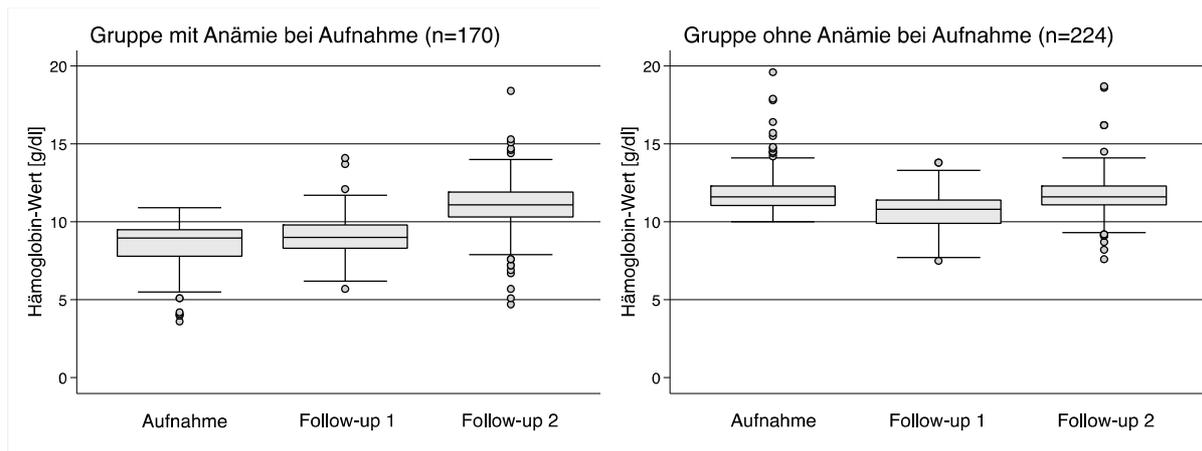


Abb. 13. Verlauf des Hb-Wertes bei Kindern mit und ohne Anämie - Die Grafik zeigt den Verlauf des Hb-Wertes von 170 Kindern mit Anämie an d 0 und am Follow-up 2; am Follow-up 1 nahmen nur 107 Kinder teil. Dem gegenüber ist der Verlauf in der Gruppe von Kindern ohne Anämie bei Aufnahme dargestellt. Von den 224 Kindern die zum Follow-up 2 erschienen, konnten 143 Kinder auch zum Follow-up 1 untersucht werden. Während sich bei den Kindern ohne Anämie ein relativ konstanter Hb-Wert über einen Monat zeigt, erholt sich der Hb-Wert der Kinder mit Anämie bei einem Großteil deutlich.

In der Vergleichsgruppe ohne Anämie (n = 224) lag der mediane Hb-Wert bei 11,6 g/dl (IQR: 11,1-12,3 g/dl). Im Verlauf fiel der mediane Hb-Wert am Tag des Follow-up 1 leicht auf 10,8 g/dl (IQR: 9,9-11,4 g/dl; n = 143), einen Monat nach Krankenhausaufnahme zeigte sich ein erneuter Anstieg auf 11,6 g/dl (IQR: 11,1-12,3 g/dl). Insgesamt fand sich in dieser Gruppe ein stabilerer Hb-Wert. Drei Kinder dieser Gruppe benötigten während ihres stationären Aufenthaltes eine Bluttransfusion. Zwei weitere gaben zum Follow-up 1 oder 2 an, in der Zwischenzeit eine Bluttransfusion erhalten zu haben. Innerhalb der Gruppe wurden 27 Kinder (18,9 %) mit Eisenpräparaten und acht Kinder (5,6 %) mit Folsäurepräparaten behandelt.

Bei 56 Kindern, die bei Aufnahme keine Anämie hatten, fand sich 7 d nach Entlassung eine Anämie. Davon hatten 39 Kinder eine *P.-falciparum*-Infektion, fünf darunter eine Koinfektion mit B19V. Im Follow-up 2 konnten 30 Kinder erneut untersucht werden, wobei ein Kind eine anhaltende moderate Anämie zeigte. Weitere zehn zeigten noch eine milde Anämie, bei den übrigen 19 hatte sich der Hb-Wert erholt. Am Tag des Follow-up 2 fielen 17 Kinder erstmals mit einer moderat-schweren Anämie auf, sechs von ihnen hatten bei Aufnahme eine *P.-falciparum*-Infektion, keines eine B19V-Infektion. Insgesamt gelang nur bei kleinen Subgruppen der Einschluss in die Nachbeobachtung, sodass auf Basis unserer Daten keine allgemeinen Aussagen bezüglich der Krankheits- und Anämieverläufe von B19V-Mono- und Koinfektionen möglich waren.

3.5.4. Risikofaktoren für eine Anämie

Die Tab. 28 zeigt eine Übersicht der betrachteten Risikofaktoren und ihrer Häufigkeit bei Kindern mit Anämie, sowie die in uni- und multivariater Analyse berechneten OR. Von allen eingeschlossenen männlichen Kindern hatten 52,9 % eine Anämie (n = 341) im Vergleich zu 47,6 % (n = 257) unter den Studienteilnehmerinnen. In der univariaten Analyse hatten Kinder männlichen Geschlechtes im Vergleich zu den weiblichen Kindern mit einer OR von 1,2 ein leicht erhöhtes Risiko für eine Anämie (95%-KI: 1,0-1,6; p = 0,07). In Bezug auf die Altersgruppen unter fünf Jahren und ab fünf Jahren zeigte sich keine unterschiedliche Häufigkeit der Anämie (50,2 %, n = 458 vs. 51,7 %, n = 140; OR: 1,1; 95%-KI: 0,8-1,4; p = 0,70). Unter den Kindern mit 1-2 Geschwistern war ein prozentual größerer Anteil von einer Anämie betroffen (n = 256, 43,2 %) als in der Gruppe ohne Geschwister (n = 119, 20,1 %) und mit 3-12 Geschwistern (n = 217, 36,7 %), statistisch ließ sich dies nicht in einer deutlichen Risikoerhöhung abbilden (OR von je 1,3; 1-2 Geschwister: 95%-KI: 0,9-1,7; 3-12 Geschwister: 95%-KI: 1,0-1,8; p = 0,20). Von den Kindern aus der Volksgruppe der Akan hatten 39,8 % (n = 265) eine Anämie, in der Volksgruppe der Northeners waren es 64,7 % (n = 312). Kinder aus Familien der Northeners hatten mit einer OR von 2,8 ein deutlich höheres Risiko für eine Anämie als Kinder der Akan (95%-KI: 2,2-3,5; p < 0,01). Unter Kindern aus Familien mit niedrigem sozioökonomischen Status waren 64,5 % anämisch, verglichen mit 36,9 % (n = 216) der Kinder mit hohem sozioökonomischem Status. Dies spiegelte sich in einer mit 3,1 deutlich erhöhten OR wider (95%-KI: 2,4-3,9; p < 0,01). Von den Kindern mit einem G6PD-Mangel hatten 78,3 % (n = 36) eine Anämie, unter den Kindern mit einer Sichelzellerkrankung waren es 82,1 % (n = 32). Beide Erkrankungen boten ein deutlich erhöhtes Risiko an einer Anämie zu erkranken. Kinder mit einem G6PD-Mangel hatten eine OR von 3,7 (95%-KI 1,8-7,5; p < 0,01), bei Kindern mit einer Sichelzellerkrankung lag die OR bei 4,7 (95%-KI 2,0-10,7; p < 0,01) jeweils verglichen mit der Gruppe ohne die Grunderkrankung.

Eine Infektion mit *P. falciparum* stellte ebenfalls einen Risikofaktor dar, 58,7 % der Kinder (n = 342) hatten eine Anämie. Die OR lag bei 1,9 (95%-KI: 1,5-2,4, p < 0,01). Bei Betrachtung der B19V-Infektion ohne Unterscheidung zwischen IgM und PCR positiven Fällen fand sich mit einer OR von 1,8 (95%-KI: 1,1-2,9; p = 0,02) ein erhöhtes Risiko für das Vorliegen einer Anämie. Unter den Kindern mit positivem IgM-Antikörperstatus waren 71,7 % (n = 33) von einer Anämie betroffen, in der Gruppe mit negativem Antikörperstatus 49,7 % (n = 565; OR 2,6; 95%-KI: 1,3-4,9; p < 0,01). Unter Kindern mit positivem PCR-Ergebnis zeigte sich prozentual eine leichte Häufung (57,1 %, n = 20 vs. 50,3 %, n = 578), jedoch ohne ein statistisch signifikante Risikoerhöhung (OR: 1,3, 95%-KI: 0,7-2,6; p = 0,43).

Im nächsten Schritt erfolgte eine multivariate Analyse der möglichen Risikofaktoren. Zur Differenzierung des Einflusses der B19V-Laborparameter wurden drei Modelle mit unterschiedlicher B19V-Definition erstellt (B19V-Definition nur über das serologische Ergebnis, nur über das PCR-Ergebnis sowie über einen der beiden Marker). Die kalkulierten OR, Konfidenzintervalle und p-Werte zeigten sich für die Mehrheit der Risikofaktoren in den drei Modellen nahezu gleich. Den stärksten Risikofaktor stellte die Sichelzellerkrankung mit einer OR von 6,8 (95%-KI: 2,9-16,3; $p < 0,01$) dar. Auch die Grunderkrankung des G6PD-Mangels erhöhte das Risiko für das Vorliegen einer Anämie mit einer OR von 2,4 (95%-KI: 1,1-5,0, $p = 0,03$). Des Weiteren waren Kinder aus einfachen sozioökonomischen Verhältnissen einem höheren Risiko ausgesetzt (OR 2,1; 95%-KI: 1,5-2,8; $p < 0,01$), ebenso wie Kinder aus der Volksgruppe der Northerners (OR 1,8; 95%-KI: 1,4-2,5; $p > 0,01$). Geschlecht, Alter und Anzahl der Geschwister verloren im multivariaten Modell an Bedeutung. Zusätzlich wurden lineare Regressionsanalysen mit dem Hb-Wert als kontinuierliche Variable durchgeführt, hier zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (tabellarische Übersicht im Anhang).

***P. falciparum* und Parvovirus-B19-Infektion als Risikofaktoren:** Die Infektion mit *P. falciparum* zeigte in den multivariaten Modellen eine OR von 1,9 (95%-KI: 1,4-2,4; $p < 0,01$). Die B19V-Infektion definiert über PCR- oder IgM-Ergebnis stellte sich nicht als signifikanter Risikofaktor heraus (OR: 1,5; 95%-KI: 0,9-2,5; $p = 0,14$). Kinder mit einem positiven IgM-Antikörperstatus für B19V zeigten jedoch auch im multivariaten Modell ein deutlich erhöhtes Risiko für das Vorliegen einer Anämie (OR: 2,6; 95%-KI: 1,3-5,3; $p < 0,01$). Dieses erhöhte Risiko ließ sich für Kinder mit positiver B19V-PCR nicht darstellen (OR: 0,9; 95%-KI: 0,4-1,8; $p = 0,70$).

Sowohl die Infektion mit *P. falciparum* als auch eine B19V-Infektion, definiert über eine IgM-Positivität, nicht jedoch über eine positive PCR, bestätigten sich als unabhängige Risikofaktoren für das Vorhandensein einer Anämie. Eine Adjustierung der Faktoren im multivariaten Regressionsmodell ergab keine Veränderungen der Ergebnisse, sodass kein Hinweis für eine gegenseitige Abhängigkeit bestand. Ein Likelihood-Ratio-Test der zwei Modelle mit und ohne Interaktionsterm zwischen *P. falciparum* und B19V-Infektion zeigte keine Effektmodifikation (IgM: $p = 0,91$; PCR: $p = 0,79$). Daher ergab sich kein Hinweis auf einen additiven oder multiplikativen Effekt beider Infektionen auf das Vorhandensein einer Anämie.

3. Ergebnisse

Tab. 28. Risikofaktoren für eine Anämie in uni- und multivariater Analyse

	Fälle mit Anämie (%)	Univariate Analyse OR (95%-KI)	p ¹	Modell mit B19V (PCR und/oder IgM) Adjustierte Analyse ² OR (95%-KI)	p ¹	Modell mit B19V-IgM Adjustierte Analyse ² OR (95%-KI)	p ¹	Modell mit B19V-PCR Adjustierte Analyse ² OR (95%-KI)	p ¹
gesamt	598 (50,5)								
Geschlecht									
weiblich	257 (47,6)	1		1		1		1	
männlich	341 (52,9)	1,2 (1,0-1,6)	0,07	1,3 (1,0-1,6)	0,07	1,3 (1,0-1,6)	0,07	1,3 (1,0-1,6)	0,06
Alter									
< 5 Jahre	458 (50,2)	1		1		1		1	
≥ 5 Jahre	140 (51,7)	1,1 (0,8-1,4)	0,70	1,1 (0,8-1,4)	0,73	1,1 (0,8-1,4)	0,71	1,1 (0,8-1,5)	0,70
Geschwister									
keine	119 (20,1)	1		1		1		1	
1-2	256 (43,2)	1,3 (0,9-1,7)	0,20	1,1 (0,8-1,5)	0,83	1,1 (0,8-1,5)	0,90	1,1 (0,8-1,5)	0,80
3-12	217 (36,7)	1,3 (1,0-1,8)		1,0 (0,7-1,5)		1,0 (0,7-1,4)		1,0 (0,7-1,5)	
Volkszugehörigkeit									
Akan	265 (39,8)	1		1		1		1	
Northeners	312 (64,7)	2,8 (2,2-3,5)	< 0,01	1,8 (1,4-2,5)	< 0,01	1,8 (1,4-2,5)	< 0,01	1,8 (1,4-2,5)	< 0,01
Sozioökonomischer Status³									
hoch	216 (36,9)	1		1		1		1	
niedrig	376 (64,5)	3,1 (2,4-3,9)	< 0,01	2,1 (1,5-2,8)	< 0,01	2,1 (1,5-2,8)	< 0,01	2,1 (1,6-2,8)	< 0,01
G6PD									
nein	562 (49,4)	1		1		1		1	
ja	36 (78,3)	3,7 (1,8-7,5)	< 0,01	2,4 (1,1-5,0)	0,03	2,3 (1,1-5,0)	0,03	2,3 (1,1-4,9)	0,03
Sichelzellkrankheit									
nein	566 (49,4)	1		1		1		1	
ja	32 (82,1)	4,7 (2,0-10,7)	< 0,01	6,8 (2,9-16,3)	< 0,01	7,1 (3,0-17,0)	< 0,01	6,9 (2,9-16,6)	< 0,01
<i>P.-falciparum</i>-Infektion⁴									
nein	256 (42,6)	1		1		1		1	
ja	342 (58,7)	1,9 (1,5-2,4)	< 0,01	1,9 (1,4-2,4)	< 0,01	1,9 (1,5-2,4)	< 0,01	1,9 (1,5-2,4)	< 0,01

3. Ergebnisse

	Fälle mit Anämie (%)	Univariate Analyse OR (95%-KI)	p ¹	Modell mit B19V (PCR und/oder IgM) Adjustierte Analyse ² OR (95%-KI)	p ¹	Modell mit B19V-IgM Adjustierte Analyse ² OR (95%-KI)	p ¹	Modell mit B19V-PCR Adjustierte Analyse ² OR (95%-KI)	p ¹
B19V-Infektion (PCR/IgM)									
nein	550 (49,6)	1		1		-		-	
ja	48 (64,0)	1,8 (1,1-2,9)	0,02	1,5 (0,9-2,5)	0,14	-	-	-	-
B19V-IgM⁵									
negativ	565 (49,7)	1		-		1		-	
positiv	33 (71,7)	2,6 (1,3-4,9)	< 0,01	-	-	2,6 (1,3-5,3)	< 0,01	-	-
B19V-PCR⁵									
negativ	578 (50,3)	1		-		-		1	
positiv	20 (57,1)	1,3 (0,7-2,6)	0,43	-	-	-	-	0,9 (0,4-1,8)	0,70

¹ Der Vergleich dichotomer und nominaler Daten wurde mit einer logistischen Regressionsanalyse erstellt.

² Die Werte sind für alle anderen aufgeführten Variablen adjustiert.

³ Der sozioökonomische Index wurde aus neun Indikatorvariablen konstruiert. Diese wurden in eine tetrachorische Korrelation und Hauptkomponentenanalyse eingeschlossen. Im Anschluss wurde eine binäre Variable erstellt, hierbei wurde die Population in zwei gleich große Hälften geteilt.

⁴ Eine klinisch relevante Malaria mit *P. falciparum* wurde über eine Parasitendichte > 12.000/µl und Fieber ≥ 38,0°C definiert.

⁵ Alle Proben mit übereinstimmenden serologischen Resultaten in beiden Verfahren (Biotrin und Mikrogen) wurden als IgM-positiv gewertet. Alle Proben, die in der qualitativen PCR positiv waren, sind hier als positive Fälle aufgeführt. Sechs Proben waren PCR- und IgM-positiv.

4. Diskussion

Da die vorliegende Studie Teil einer größeren Studie mit anderen Kernfragen war, sind die Ergebnisse als Resultat einer explorativen Analyse und Testung zu werten und nicht als konformative Daten zu interpretieren. Vorab erfolgte keine Fallzahlberechnung mit Festlegung von Power und Signifikanzniveau.

Innerhalb der untersuchten Population war eine B19V-Infektion in 6,4 % als Ursache des Krankenhausaufenthaltes zu diskutieren und ist damit als Differentialdiagnose bei fieberhaften Erkrankungen im Kindesalter auch in Malaria-Endemiegebieten zu beachten. Eine einheitliche klinische Symptomatik zeigten die Patienten nicht, sodass eine zuverlässige Labordiagnostik entscheidend ist. Nach Auswertung unserer Daten ist die Verlässlichkeit der hierzulande etablierten B19V-Diagnostik in Gebieten südlich der Sahara mit endemisch vorkommender Malaria zu diskutieren und weitere Untersuchungen sind notwendig.

Unterschiede in der klinischen Präsentation, dem Schweregrad der Erkrankung und dem Verlauf fanden sich, unter Vorbehalt der geringen Fallzahl und Follow-up-Einschlussrate, zwischen B19V-Mono- und Koinfektionen nicht.

In unserer Studie zeigte sich eine Assoziation zwischen dem Nachweis von IgM-Antikörpern gegen B19V und dem Vorkommen einer Anämie. Dieser Zusammenhang ließ sich unter den Kindern mit positiver B19V-PCR-Diagnostik nicht darstellen. Zudem stellten sich eine B19V-Infektion (definiert über IgM-Positivität) und eine Infektion mit *P. falciparum* als unabhängige Risikofaktoren für eine Anämie dar, ein Anhalt für einen additiven oder multiplikativen Effekt bot sich aber nicht.

4.1. Parvovirus-B19-Diagnostik

Die Untersuchung und Analyse unserer Daten verdeutlichen die Problematik der adäquaten Diagnostik der Virusinfektion. Gerade die Validität von IgM-Antikörper-Enzymimmuntesten im epidemiologischen Kontext in Gebieten, in denen Malaria endemisch vorkommt, muss vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse hinterfragt werden. Die geeignete Diagnostik einer aktuellen B19V-Infektion wurde in den letzten Jahren vielfach diskutiert (Hoebe *et al.*, 2002; Young & Brown, 2004). Die Kombination von PCR und serologischer Diagnostik ist aktuell empfohlen und wurde in der vorliegenden Studie angewandt, da beide Parameter alleiniger Marker der Infektion sein können (Gallinella *et al.*, 2003).

4.1.1. Sensitivität und Spezifität der serologischen Untersuchungen

Vergleich der Testkits: Die auffällige Diskrepanz zwischen der Anzahl PCR-positiver Proben (36) und der sehr viel höheren Anzahl IgM-positiver Proben mit dem Biotrin-Testkit (155) warf die Frage der Plausibilität und Spezifität der serologischen Untersuchungsergebnisse im epidemiologischen Kontext auf. Nach Erhalt der Ergebnisse der zweiten Testung mit dem Mikrogen-Testkit zeigte sich eine Übereinstimmungsrate im Bereich der positiven Ergebnisse von nur 30 % ($p < 0,01$). Auf der anderen Seite schien die Spezifität beider Testkits gut, hier bestand nur eine Diskrepanz von 0,8 %.

Bisher veröffentlichte Daten zum Vergleich der beiden Testkits an Proben aus den USA und Deutschland legen eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie Übereinstimmungsraten von 96,0-98,7 % nahe (Butchko & Jordan, 2004; Enders *et al.*, 2007). Aus Ländern südlich der Sahara liegen keine Vergleichsdaten vor. Bisher gibt es keine Publikationen, die eine derart starke Diskrepanz der serologischen Ergebnisse (IgM) beschreiben. In Bezug auf die IgG-Bestimmung wiesen beide Testkits unter Vorbehalt einer sehr kleinen Stichprobe eine hohe Übereinstimmungsrate in unserer Population auf (11/12).

Ursachen falsch negativer Ergebnisse

Komplexierung von Virus und Antikörper: Eine mögliche Ursache falsch negativer Ergebnisse ist in der Komplexierung von Virus und spezifischen Antikörpern bis hin zur fehlenden Nachweisbarkeit denkbar. In einer Studie konnten Bredl *et al.* diese Komplexierung bei 24 Antikörper-negativen Proben mit mehrheitlich hoher Viruslast nachweisen. Nach Bearbeitung mit Dissozierungspuffer konnten in allen vormals negativen Proben mit Enzymimmuntest und Immunblot (*recomWell/Line*, Mikrogen) IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Eine Aussage zur IgM-Antikörper-Diagnostik war aufgrund der Methodik nicht möglich (Bredl *et al.*, 2011).

Kooistra *et al.* veröffentlichten Daten von Blutspendern aus den Niederlanden, wo sich bei 70 % der mit PCR auf B19V positiv getesteten Proben keine spezifischen Antikörper nachweisen ließen (Kooistra *et al.*, 2011). Ob dies falsch negative Ergebnisse sind oder die Proben keine Antikörper aufweisen, ist unklar, da auch Konstellationen mit nachweisbarer Viruslast ohne Antikörper möglich sind (Maple *et al.*, 2014).

Möglicherweise ist über diesen Mechanismus auch der geringe Anteil der Proben mit positiven IgM- und PCR-Ergebnissen in unserer Population erklärbar. Aufgrund der durchgeführten rein

qualitativen PCR ist eine Aussage zur Höhe der Viruslast in Abhängigkeit der IgM-Ergebnisse nicht möglich.

Detektion verschiedener Genotypen: Hinzu kommt der Aspekt, dass kommerzielle Testkits primär für die Detektion von Antikörpern gegen den Genotyp 1 des B19V entwickelt wurden. Daten aus Kumasi, Ghana, zeigten, dass 38,5 % der Proben, die mit einem speziell für den Genotyp 3 entwickelten EIA-Test untersucht wurden, Antikörper aufwiesen, die vorab in der Testung mit dem Biotrin-Testkit negativ waren (Candotti *et al.*, 2004).

Abgeschwächte humorale Immunantwort: Im Rahmen einer Immunsuppression bei Kindern kann die humorale Immunantwort abgeschwächt und/oder unzureichend sein, sodass die Aussagekraft einer Antikörper-Testung unklar ist (Flunker *et al.*, 1998). In wieweit dies auf unserer Studienpopulation zutrifft, ist nicht bekannt.

Ursachen falsch positiver Ergebnisse

Polyklonale B-Zell-Stimulation: In Gebieten, in denen Malaria endemisch ist, könnte die polyklonale B-Zell-Stimulation bei *Plasmodien*-Infektion eine mögliche Ursache falsch positiver Antikörperdiagnostik darstellen.

Bei einer Infektion mit Malaria fanden sich bereits in den 1960er Jahren bei Menschen erhöhte Immunglobulinspiegel (Abele *et al.*, 1965), die nur zu einem geringeren Anteil Plasmodien-spezifisch waren (Curtain *et al.*, 1964). Nachdem unter anderem Greenwood 1974 die Existenz von B-Zell-stimulierenden Substanzen der *Plasmodien* als Auslöser der Hypergammaglobulinämie zur Diskussion stellte (Greenwood, 1974), konnten sowohl Freeman und Parish als auch Rosenberg *in vivo* zeigen, dass bei *Plasmodien*-Infektion die Anzahl Immunglobulin-sezernierender Zellen stark anstieg (Freeman & Parish, 1978; Rosenberg, 1978). Im Jahr 1991 veröffentlichten Banic *et al.* Studienergebnisse, in der die Stärke der B-Zell-Stimulation anhand der Anzahl der IgA, IgG oder IgM sezernierenden Zellen im peripheren Blut und der Höhe der Immunglobulintiter bei Infektionen mit *P. falciparum* und *P. vivax* untersucht wurden. In den Gruppen mit akuter Infektion zeigte sich eine in Abhängigkeit von der Parasitendichte steigende Anzahl Immunglobulin-sezernierender Zellen und einen signifikanten Anstieg der IgM-Titer. Im Mittel waren die Antikörpertiter im frühen Verlauf der Infektion höher als nach fünf Tagen, die B-Zell-Stimulation sistierte bei *P. falciparum*-Infektion innerhalb von 15 d nach Behandlungsbeginn (Banic *et al.*, 1991). Einige Jahre später konnte eine mitogene Substanz in Form einer Interaktion zwischen dem Erythrozyten-Membran-Protein 1 und den B-Zellen als Hauptmechanismus der Stimulation identifiziert werden (Donati *et al.*, 2004).

Falsch positive Antikörper-Ergebnisse bei gleichzeitigem Nachweis von *P. falciparum* wurde kürzlich auch in Untersuchungen zu Zikavirus-Infektionen in Madagaskar diskutiert (Schwarz *et al.*, 2017).

In unseren Ergebnissen der IgM-Antikörpertestung mit dem Biotrin-Testkit zeigte sich eine Assoziation zwischen einer *P.-falciparum*-Infektion und positivem IgM-Ergebnis. Unter den Kindern mit *P.-falciparum*-Infektion hatten 18 % einen positiven Antikörperstatus im Vergleich zu 8,3 % innerhalb der Fälle ohne *P.-falciparum*-Infektion (X^2 -Test $p < 0,01$; Tab. 16). Bei Auswertung der Mikrogen-Ergebnisse zum IgM-Antikörperstatus fand sich dieser Zusammenhang nicht (X^2 -Test $p = 0,76$). Die Häufigkeit der IgG-Antikörper verteilte sich ebenfalls relativ gleichmäßig zwischen den Kindern ohne und mit *P.-falciparum*-Infektion (44,7 % vs. 55,2 %; X^2 -Test $p = 0,09$; Daten nicht gezeigt).

Die beschriebene polyklonale B-Zell-Stimulation könnte damit für einen Teil der IgM-positiven Proben mit dem Biotrin-Testkit verantwortlich sein und stellt die Aussagekraft von Antikörper-Enzymimmuntests in Gebieten mit endemischer Malaria in Frage. Unterstützt wird dieser Aspekt dadurch, dass die Assoziation in den Proben mit einer Parasitämie $< 12.000/\mu\text{l}$ nicht mehr nachweisbar war, möglicherweise bedingt durch eine geringere polyklonale B-Zell-Stimulation. Unklar bleibt, in wieweit auch die Testung mit dem Mikrogen-Enzymimmuntest davon betroffen sein könnte oder welche Faktoren gegebenenfalls diesen dafür weniger anfällig machen.

Kreuzreaktion mit anderen Virusinfektionen: Mehrfach wurde beschrieben, dass falsch positive B19V-Antikörper als Kreuzreaktion bei Epstein-Barr-, Herpes-simplex-, Masern- oder Röteln-Virusinfektion in der Diagnostik im klinischen Alltag auftreten können (Jensen & Vestergaard, 1997; Thomas *et al.*, 1999; Gallinella, 2018), die Bedeutung im epidemiologischen Kontext bleibt aber unklar. Unsere Studienpopulation wurde nicht auf diese Virusinfektionen hin untersucht, sodass eine Kreuzreaktion nicht ausgeschlossen werden konnte. Dennoch scheint dies als alleinige Ursache der ausgeprägten Diskrepanz unwahrscheinlich.

Festlegung des Cut-Off-Wertes: Zu diskutieren ist zudem ein möglicherweise zu niedrig angesetzter Cut-Off-Wert bei der Auswertung der IgM-Extinktions-Indexwerte, wobei hier nach den Herstellerangaben vorgegangen wurde. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit der erneuten Testung bei grenzwertigen Ergebnissen wurden zudem grenzwertige Ergebnisse als negativ gewertet. Bei Betrachtung der Extinktionsindexwerte der Biotrin-Testung der Proben, die sich durch den Mikrogen-Test bestätigen ließen, zeigte sich eine leichte Tendenz, dass Proben mit höheren Index-Werten häufiger bestätigt wurden.

Zusammenfassend sind die Komplexierung von Virus und Antikörpern mit konsekutiv negativem Antikörpertest, eine mögliche unzureichende Immunreaktionen im Rahmen einer Immunschwäche sowie die Genotypenvarianz als Ursachen falsch negativer Antikörpertestungen zu diskutieren. Andererseits kann ein falsch positives Testergebnis möglicherweise durch Kreuzreaktion mit anderen Viren hervorgerufen werden, eine Reaktion der Testmethode auf unspezifische Antikörper im Rahmen einer Plasmodien-assoziierten B-Zell-Stimulation ist ebenfalls denkbar. Zusätzlich kann die adäquate Festlegung von Cut-Off-Werten zur Interpretation gemessener Extinktionsindexwerte nach Auswertung unserer Daten diskutiert werden.

4.1.2. Validität und Interpretation des Nukleinsäure-Nachweises

Die Häufigkeit der positiven B19V-PCR von 3,0 % in unserer Studienpopulation ist nicht mit anderen Studien zu vergleichen, da bisher publizierte Daten andere Studienpopulationen zur Basis hatten. Dennoch sind Möglichkeiten der falsch positiven oder negativen Testung, sowie die adäquate Interpretation im epidemiologischen Kontext zu diskutieren.

Detektion unterschiedlicher Genotypen: Kenntnisse über in Ghana vorherrschende Genotypen des B19V stammen aus einer Untersuchung von Blutspendern in Kumasi, der Hauptstadt der Ashanti-Region. Hier zeigte sich eine Dominanz des Genotyp 3 (Candotti *et al.*, 2004). Die genetische Variation der Erythroviren ist mit 1-2 % relativ gering, Untersuchungen zum Genotyp 3 (auch V9 genannt) zeigen aber, dass auch Unterschiede von mehr als 11 % vorkommen. Diese betreffen auch die in der Diagnostik verwendeten Regionen NS1 und VP2, sodass diskutiert wird, ob herkömmliche Tests den Genotyp 3 hinreichend detektieren können oder die Entwicklung spezieller PCRs notwendig ist (Heegaard *et al.*, 2001). Dies verdeutlichen Daten von Hokynar *et al.*, welche die Ergebnisse zweier quantitativer PCR-Diagnostik-Kits von Roche Diagnostics und Artus gegenüberstellten. Sie zeigten, dass das LightCycler®-Kit hoch sensitiv den Genotyp 1 nachwies, aber für die Bestimmung der Genotypen 2 und 3 nicht geeignet war. Das Artus-Kit war weniger spezifisch, wies aber alle Genotypen nach (Hokynar *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete PCR wurde unter Berücksichtigung von Sequenzen aller drei Genotypen entwickelt, dennoch lässt sich diese Fehlerquelle nicht gänzlich ausschließen.

Persistenz nicht-infektiöser DNA-Fragmente: In einer kleinen Untersuchung an zehn Blutspendern mit asymptomatischer B19V-Infektion zeigten Molenaar-de Backer *et al.*, dass eine persistierend positive B19V-PCR nicht nur durch infektiöse Viren, sondern auch durch nackte DNA-Fragmente verursacht werden kann. Die Arbeitsgruppe diskutiert dies vor dem Hintergrund einer möglichen Assoziation von B19V mit Myokarditiden und Arthritiden. Wenn

die positiven PCR-Ergebnisse auf einen Zelluntergang des betroffenen Gewebes mit Freisetzung nicht-infektiöser DNA-Fragmente zurückzuführen sein könnten, müsse damit der kausale Zusammenhang zwischen B19V und den Krankheitsbildern in Frage gestellt werden (Molenaar-de Backer *et al.*, 2016).

Interpretation positiver PCR-Ergebnisse: Die durchgeführte PCR ergab zunächst 39/1189 positive Proben. Drei Proben ließen sich Kindern zuordnen, die bereits in einem vorangegangenen Studieneinschluss eine positive B19V-PCR aufwiesen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass das Virus sowohl bei symptomatischen als auch asymptomatischen Trägern über Monate persistieren kann (Candotti *et al.*, 2004). Daher wurde eine nach drei bis acht Monaten weiterhin positive PCR nicht als Hinweis auf eine aktuelle Infektion gewertet und nur 36 positive PCR-Ergebnisse mit den zugehörigen Studienfällen in die weitere Analyse eingeschlossen. Bei 75,0 % unserer Proben ließen sich zeitgleich nur IgG- und keine IgM-Antikörper nachweisen. Jensen & Vestergaard beschrieben ebenfalls, dass bei 25 Fällen mit klinischem Verdacht auf eine B19V-Infektion und PCR-Nachweis 88,0 % der Proben auch IgG-Antikörper aufwiesen (Jensen & Vestergaard, 1997). In einer Untersuchung von Gallinella *et al.* traf dies nur auf 10,4 % (36/344) der untersuchten Proben zu. Dennoch ist die Interpretation der Laborergebnisse zu diskutieren, insbesondere vor dem Hintergrund eines fehlenden klinischen Verdachts, da diese Konstellation auch für eine chronische Infektion oder Viruspersistenz sprechen kann (Gallinella *et al.*, 2003). Eine quantitative PCR mit Bestimmung der Viruslast und Anwendung von Grenzwerten für aktuelle und zurückliegende Infektion könnten in diesem Zusammenhang zur Klärung beitragen (Maple *et al.*, 2014), in der vorliegenden Studie war eine nachträgliche Ergänzung aufgrund von begrenztem Material nicht möglich.

Letztlich ist die Interpretation unserer PCR-Ergebnisse besonders vor dem Hintergrund möglicher anhaltender Positivität nach stattgehabter Infektion sowie der Persistenz nicht-infektiöser DNA-Fragmente erschwert. Anhand aktueller Datenlage ist keine hinreichende Einordnung positiver PCR-Ergebnisse mit gleichzeitig bereits erfolgter Serokonversion möglich, wenn keine eindeutige klinische Symptomatik besteht, sondern Differentialdiagnosen ursächlich für die Beschwerden denkbar sein können.

4.1.3. Definition der aktuellen Parvovirus-B19-Infektion

In der vorliegenden Arbeit wurde, wie in früheren Arbeiten angewandt und empfohlen (Gallinella *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2012), sowohl der Nachweis einer positiven PCR als auch eine positive IgM-Diagnostik als Hinweis für eine aktuelle B19V-Infektion gewertet. Bisher publizierte Studien zum Themengebiet der B19V-Infektionen in Regionen südlich der Sahara

bzw. tropischen Regionen mit endemisch vorkommender Malaria verwendeten unterschiedliche Definitionen der aktuellen Infektion, welches die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert (tabellarische Übersicht im Anhang). Während Wildig *et al.* aufgrund einer hohen Diskrepanz zwischen IgM- und PCR-Ergebnissen für eine Kombination aus positivem IgM- Antikörperstatus und PCR-Ergebnis plädierten (Wildig *et al.*, 2006), definierten Manning *et al.* eine aktuelle B19V-Infektion über das Vorhandensein mindestens eines positiven Markers (Manning *et al.*, 2012). In einer vorherigen Arbeit wurde jedoch auch der Nachweis beider Marker zur Definition einer akuten Infektion gefordert. Die Arbeitsgruppe von Duedu *et al.* untersuchte die Proben nur mit einer PCR, im Gegensatz dazu wurde durch Tizeba *et al.* nur serologische Diagnostik durchgeführt (Duedu *et al.*, 2013; Tizeba *et al.*, 2018). In der Studie von Toan *et al.* wurde die serologische Diagnostik nur bei PCR-positiven Proben ergänzend durchgeführt (Toan *et al.*, 2013) und damit nicht zur Definition herangezogen.

Übereinstimmung von PCR und Serologie: Selbst bei klinischem Verdacht oder im Rahmen eines Ausbruchs zeigten bisherige Studien keine klare Überlegenheit der serologischen oder der molekulargenetischen Diagnostik. So fanden sich während eines B19V-Ausbruchs in den Niederlanden bei zehn Patienten (58,5 %) übereinstimmende, aber bei sieben Patienten (41,2 %) divergente Ergebnisse der PCR und Serologie (Hoebe *et al.*, 2002). Die insgesamt 83 PCR-positiven Proben aus einer Studie von Bredl *et al.* stammten von 42 symptomatischen Patienten und 41 asymptomatischen Blutspendern. IgM- und IgG-Antikörper fanden sich in 45 (54,2 %) Proben, je sieben (8,4 %) hatten nur IgM bzw. IgG-Antikörper und 24 (28,9 %) wiesen keine Antikörper auf (Bredl *et al.*, 2011). Eine systematische Untersuchung beider Methoden durch Gallinella *et al.* zeigte, dass durch die PCR ca. 80 % (99/125) und durch die Antikörperbestimmung ca. 60 % (75/125) aller Infektionen erfasst werden konnten. Gleichzeitig war die PCR bei 40,0 % (50/125) und der IgM-Nachweis in 20,0 % (26/125) der Fälle der alleinige Hinweis auf eine aktuelle Infektion, sodass eine Kombination der beiden Methoden empfohlen wurde (Gallinella *et al.*, 2003). Eine ähnliche diagnostische Herausforderung mit hohen Divergenzraten zwischen serologischer und molekulardiagnostischer Testung wurde in Bezug auf die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus in Malawi (Afrika) beschrieben. Mögliche Ursachen wie falsch-positive serologische Ergebnisse oder fehlende Detektion aufgrund von Genotyp-Variabilität wurden diskutiert (Stockdale *et al.*, 2018). Auf Basis der angeführten Studien wurde für die vorliegende Arbeit die Definition der B19V-Infektion über den serologischen und molekulardiagnostischen Nachweis festgelegt. In unseren Daten zeigten nur 16,7 % der PCR-positiven Proben auch IgM-Antikörper. Dementsprechend waren die PCR in 30 Fällen (39,5 %) und positive IgM-Antikörper in 40 Fällen (52,6 %) der alleinige Hinweis auf eine aktuelle B19V-Infektion.

Weiterführende Untersuchungen zur Diagnosestellung: Theoretisch wäre eine genauere zeitliche Einordnung der Infektion anhand der Antikörperkonstellationen möglich (siehe Einleitung). So ist bei gleichzeitigem Nachweis von IgM- und IgG-Antikörpern eine aktuelle Infektion immer noch denkbar (ab d 14), allerdings können IgM-Antikörper auch über Monate hinweg nachweisbar bleiben. Der alleinige IgG-Nachweis könnte bei positiver PCR ebenfalls für eine aktuelle als auch für eine persistierende Infektion sprechen (Heegaard & Brown, 2002). Eine Serokonversion innerhalb eines Monats würde ebenfalls eine aktuelle B19V-Infektion stützen, fand sich in unserer Population jedoch bei geringer Follow-up-Teilnahme nicht. Interessanterweise zeigte sich bei elf Kindern, deren initiale B19V-Diagnostik unauffällig war, eine neue alleinige IgG-Seropositivität (ohne IgM-Seropositivität) einen Monat nach Aufnahme. Dies suggeriert einen Kontakt mit B19V nach der Aufnahme, unterstreicht jedoch andererseits die Frage nach Verlässlichkeit unserer initialen serologischen Testung.

Ergänzend können epitopspezifische Reaktionsmuster von IgG-Antikörpern im Enzymimmuntest sowie Aviditätstestungen eine zeitliche Einordnung der Infektion verbessern. Grundsätzlich ist hierbei stets eine Interpretation im klinischen Kontext empfohlen, was den Einsatz im epidemiologischen Kontext erschwert (Gallinella, 2018). Zum anderen wird die Verwendung einer quantitativen PCR unter Anwendung von Grenzwerten zur Unterscheidung zwischen aktueller und persistierender Infektion diskutiert (Maple *et al.*, 2014).

Insgesamt gestaltet sich eine verlässliche Interpretation der Labordiagnostik im epidemiologischen Kontext deutlich erschwert, sodass vor weiteren Studien ein diagnostischer Algorithmus festgelegt werden sollte. Aufgrund der bisherigen Daten scheint die Kombination von serologischer und molekulargenetischer Testung weiterhin sinnvoll. Die Auswertung unserer Daten wirft zudem die Frage auf, ob die etablierte Diagnostik (sowohl Antikörper-Testkits als auch PCRs) für eine Anwendung in Malaria-Endemiegebieten und in Ländern südlich der Sahara ausreichend validiert ist. Eine systematische Untersuchung wäre in einem nächsten Schritt sinnvoll.

4.2. Infektionshäufigkeit von *Plasmodium falciparum* und Parvovirus B19

4.2.1. Häufigkeit von *Plasmodium-falciparum*-Infektionen

Daten aus dem Studiengebiet belegen das endemische Vorkommen der durch *P. falciparum* hervorgerufene Malaria tropica (Abonuusum *et al.*, 2011). In unserer Population war die Hälfte der Kinder an einer unkomplizierten oder komplizierten Infektion mit *P. falciparum* erkrankt. Dies unterstreicht jedoch auch die Bedeutung anderer Infektionserreger bei febrilen

Erkrankungen. Aus den Daten der FWS-Studie ließ sich für unser Studiengebiet eine steigende Wahrscheinlichkeit anderer Fieberursachen mit sinkender Parasitendichte ablesen (Hogan *et al.*, 2018). Für die vorliegende Analyse wurde zur Unterscheidung zwischen einer klinisch führenden Malaria-Erkrankung und möglicher anderer Fieberursache eine Grenze der Parasitämie von 12.000/µl festgelegt. In der Untersuchung einer gesunden Kontrollgruppe der FWS-Studie fand sich bei 15 % eine Parasitämie mit einem Dichteindex von > 10.000/µl. Dies verdeutlicht die Relevanz und gleichzeitige Schwierigkeit der Festlegung eines Grenzwertes (Hogan *et al.*, 2018).

4.2.2. Häufigkeit der Parvovirus-B19-Infektion und Seroprävalenz

Bei Betrachtung febriler Erkrankungen, die zu einem Krankenhausaufenthalt führen, zeigt unsere Studie in 76 Fällen (6,4 %) eine aktuelle B19V-Infektion. Aufgrund unterschiedlicher Studienpopulationen, die in den bisherigen Studien vorrangig aus Kindern mit schwerer Anämie bestanden, sowie der unterschiedlichen Diagnostik der B19V-Infektion ist ein Vergleich der Häufigkeit sowie der klinischen Informationen nur eingeschränkt möglich.

Unter Kindern mit Anämie in Papua-Neuguinea fand sich bei 23,8 % (Manning *et al.*, 2012) und 30,2 % (Wildig *et al.*, 2006) eine B19V-Infektion, im Niger lag die Häufigkeit sogar bei 54,2 % (Jones *et al.*, 1990). In Studien in Gabun (Toan *et al.*, 2013), im Niger (Jones *et al.*, 1990) und in Tansania (Tizeba *et al.*, 2018) lag die Häufigkeit der Infektion um 10 %. Im Gegensatz hierzu war eine B19V-Infektion in den anämischen Studienpopulationen mit 1,7 % in Malawi (Calis *et al.*, 2008), 3,7 % in Kenia (Wildig *et al.*, 2010), 4,7 % in Ghana (Duedu *et al.*, 2013) selten. In einer weiteren Studie in Malawi fand sich unter Kindern mit Anämie keine B19V-Infektion (Yeats *et al.*, 1999).

In einer Studie zum Vergleich von Antikörper-Testkits fanden Parsyan *et al.* bei ghanaischen Kindern unter sieben Jahren mit schwerer Anämie und geplanter Transfusion bei 29-35 von 400 Blutproben IgG-Antikörper (entsprechend 7,3-8,8 %). Über 90 % dieser Kinder hatten eine Malaria-Erkrankung. In einer Subgruppe von 200 Proben fand sich bei 14,7 % eine positive B19V-PCR (Parsyan *et al.*, 2006). Bei Kindern unter sechs Jahren in Kenia lag die IgG-Seroprävalenz bei 14,0 % (Wildig *et al.*, 2010). Unter den Kindern unter sechs Jahren fand sich in unserer Population im Vergleich eine IgG-Seroprävalenz von 12,0 %. In unserer Studienpopulation von Kindern unter 15 Jahren lag die IgG-Seroprävalenz bei 17,0 %. Die Daten von Jones *et al.*, nach denen bis zum Ende des zweiten Lebensjahres bei 90 % der Kinder spezifische IgG-Antikörper nachzuweisen waren, lassen sich am ehesten im Rahmen eines stattgehabten Ausbruchs erklären (Jones *et al.*, 1990). Das Auftreten von B19V-Infektionen in Ausbrüchen bietet einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen

Häufigkeiten der Infektion innerhalb pädiatrischer Populationen (Wildig *et al.*, 2010). Zudem sollten die unterschiedlichen Einschlusskriterien der Studien (Anämie vs. *P.-falciparum*-Infektion vs. febrile Erkrankung) und Altersgruppen als Ursachen für Unterschiede bedacht werden.

Hinweise für ein saisonales Vorkommen der Erkrankung lieferten unsere Daten nicht. Auffällig war jedoch eine Häufung der Fälle aktueller B19V-Infektion innerhalb der ersten neun von 18 Monaten Rekrutierungszeit (71 %), die im Rahmen eines periodischen Vorkommens erklärt werden könnte. Während Wildig *et al.* in den vier Jahren Rekrutierungszeit in Papua-Neuguinea keine temporäre Häufung fanden (Wildig *et al.*, 2006), beschrieben sie eine erhöhte Prävalenz von IgM-Antikörpern in einem der fünf Studienjahre in Kenia (Wildig *et al.*, 2010). Aufgrund des großen Einzugsgebietes unseres Studienkrankenhauses und den verwendeten Einschlusskriterien ist fraglich, ob alle Erkrankungen und Infektionen eines Ausbruchs erfasst worden wären. Eine Datensammlung in Ambulanzen einzelner Stadtteile hätte solche Situationen möglicherweise besser dargestellt. Auch wäre eine Subtypbestimmung des Virus zur Klärung dieser Fragestellung interessant gewesen. Eine mögliche weitere Fehlerquelle kann die Labordiagnostik darstellen, systematische Veränderungen wurden jedoch während der Studie nicht durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt und Erklärungsansatz unterschiedlicher Prävalenzen von B19V ist eine Stimulation der B19V-Replikation durch Derivate des 4-Aminochinolin. Sowohl für das Medikament Chloroquin, das viele Jahre als Erstlinienmedikament bei Malaria eingesetzt wurde, als auch für das heute noch in Kombinationstherapie gebräuchliche Amodiaquin, zeigten Bönsch *et al.* *in vitro* und *in vivo* ein Verstärkungseffekt auf die B19V-Replikation. In ihrer Studie war die Mehrheit der schwer anämischen Kinder zuvor mit einem der beiden Präparate behandelt worden (Bönsch *et al.*, 2010). Auch die Kinder der Studien von Jones *et al.* und Wildig *et al.* wurden mit diesen Medikamente behandelt, aufgrund der Resistenzlage nicht jedoch bei Yeats *et al.* In unserem Studiengebiet wurden auch Amodiaquin-Kombinationspräparate verwendet, doch begann die Therapie zumeist erst bei Krankenhausaufnahme. In wieweit die Kinder jedoch in den vorangegangenen Monaten mit der für die unkomplizierte Malaria-Erkrankung von der WHO empfohlenen Artesunat-Amodiaquin-Kombinationstherapie behandelt wurden, ließ sich nicht verlässlich ermitteln.

Somit sind neben den stark variierenden Studienpopulationen das periodische Vorkommen von B19V-Infektion und ein möglicher Einfluss von 4-Aminochinolin-Derivaten auf die B19V-Replikation als Ursache für die unterschiedlichen Häufigkeiten der B19V-Infektion und B19V-Seroprävalenzen zu diskutieren.

4.2.3. Häufigkeit der Koinfektion

In unserer Studienpopulation fand sich in 60,5 % der Fälle mit B19V-Infektion auch eine Infektion mit *P. falciparum*, in der Gruppe ohne B19V-Infektion hatten 48,5 % der Kinder eine Infektion mit *P. falciparum*. Vergleichbare Häufigkeitsangaben finden sich in bisherigen Studien aufgrund der unterschiedlichen Studienpopulationen nicht. In der anämischen Studienpopulation von Duedu *et al.* in Ghana ließ sich lediglich bei 2/11 Kindern (18 %) mit positiver B19V-PCR keine Malaria-Infektion nachweisen (Duedu *et al.*, 2013). Auch in einer Fall-Kontroll-Studie zu Risikofaktoren einer Anämie aus Gabun wurde eine signifikante Häufung der insgesamt 29 Fälle mit B19V-Infektion innerhalb der Gruppe mit *P. falciparum* postuliert (14,2 % vs. 1,2 %, $p < 0,01$), genaue Häufigkeitsangaben fehlen jedoch (Toan *et al.*, 2013). Bei Jones *et al.* zeigte sich bei 9/13 (54 %) Kindern mit B19V und Anämie (Hämatokrit < 20 %) eine Koinfektion mit *P. falciparum* (Jones *et al.*, 1990), unter Kindern mit schwerer Anämie (Hb < 5 g/dl) in Kenia hatten sechs von zehn (60 %) Kindern mit B19V-Infektion auch eine Koinfektion mit *P. falciparum* (Wildig *et al.*, 2010). Die aktuellste Studie aus Tansania beschrieb unter Kindern mit Anämie und B19V-Infektion ebenfalls eine Häufigkeit von Koinfektionen von 50 % (12/24) (Tizeba *et al.*, 2018).

4.3. Symptomatik bei Parvovirus-B19-Mono- und Koinfektionen

4.3.1. Symptomatik bei Infektion mit Parvovirus B19

In den vorliegenden Studien zu B19V-Infektionen bei Kindern südlich der Sahara wurde neben der Anämie als Leitsymptom die weitere klinische Symptomatik kaum beschrieben. Unter den Kindern mit B19V-Infektion in unserer Studie stellten die behandelnden Ärzte bei keinem Kind den klinischen Verdacht auf ein Erythema infectiosum, ein Hautausschlag und eine generalisierte Lymphadenopathie fanden sich bei je zwei Kindern. Die Mehrheit der Kinder (68,4 %) bot bei Aufnahme eine SIRS-Symptomatik (vs. 56,1 %; $p = 0,04$). Andere spezifische bzw. gegenüber der Vergleichsgruppe deutlich gehäuft auftretende Symptome fanden sich nicht. Vielmehr präsentierten sich die Kinder heterogen mit gastrointestinalen und respiratorischen Beschwerden. Im Vergleich hierzu fanden sich unter den 24 Kindern mit B19V-Infektion und Anämie in Tansania bei 7,2 % Gelenksschmerzen und 12,2 % ein Ausschlag, die mediane Temperatur lag bei 37,1°C (IQR: 36,4-38,9°C) (Tizeba *et al.*, 2018).

Anhalt für einen längeren Krankenhausaufenthalt bei B19V-Infektion als Indikator einer schwereren Erkrankung bot sich in unseren Daten nicht.

Nachweis weiterer Krankheitserreger bei B19V-Monoinfektion: Die weiterführende Labordiagnostik ermöglichte in 50,0 % der Fälle mit B19V-Infektion ohne Infektion mit *P. falciparum* den Nachweis eines weiteren Infektionserregers (Sepsis, Durchfall, Atemwegsinfektion). Auch in anderen Fällen waren klinische Diagnosen wie Harnwegsinfektion, Atemwegsinfektion oder Sichelzellerkrankung führend. Die Kinderärzte und ergänzende Labordiagnostik konnten bei neun Kindern keine weitere Krankheitsursache ausmachen, sodass hier die B19V-Infektion als alleinige Fieberursache wahrscheinlich ist.

Damit sollten einerseits klinisch relevante Koinfektionen zwischen B19V und anderen Erregern diskutiert werden. Andererseits verleiht die Datenlage der Frage nach der Aussagekraft positiver B19V-Diagnostik im epidemiologischen Kontext und fehlendem klinischem Verdacht erneut Nachdruck.

Vergleich zwischen Mono- und Koinfektion: Unter den Kindern mit B19V-Infektion lag bei 60,5 % (n = 46) eine Koinfektion mit *P. falciparum* vor. Im Vergleich zu B19V-Monoinfektionen hatten die Kinder seltener Atemwegsinfektionen und etwas häufiger gastrointestinale Beschwerden. Ein eindeutiger Symptomkomplex fand sich jedoch auch bei Kindern mit Koinfektionen nicht. Dennoch ließ sich bei 76 % der Kinder mit einer Koinfektion kein weiterer Infektionserreger nachweisen, sodass diese, oder auch nur eine der beiden Infektionen alleine, die wahrscheinlichste Ursache des Fiebers und der Krankenhausaufnahme war.

Eine typische Symptomatik einer B19V-Monoinfektion oder einer Koinfektion mit *P. falciparum* ließ sich nicht darstellen. Unter Kindern mit Koinfektion fand sich deutlich seltener eine zusätzliche oder alternative klinische Krankheitsursache oder ein Nachweis eines Krankheitserregers als bei Kindern mit B19V-Monoinfektion. Die höhere Anzahl von Kindern mit B19V-Monoinfektion und alternativen Fieberursachen sollte in der Diskussion um die Aussagekraft und Interpretation der Labordiagnostik bedacht werden.

4.3.2. Risikofaktoren einer Parvovirus-B19-Infektion

Einzig Tizeba *et al.* publizierten bisher Daten zu Risikofaktoren einer über eine IgM-Seropositivität definierten B19V-Infektion. Unter 265 Kindern mit Anämie (Hb < 11 g/dl) hatten 24 eine B19V-Infektion. In der multivariaten Analyse stellte sich eine *P.-falciparum*-Infektion als stärkster unabhängiger Risikofaktor heraus (OR: 6,0; 95%-KI 2,2-16,8; p < 0,01). Auch Kinder aus ländlichen Gebieten hatten eine erhöhte Chance einer B19V-Infektion (OR: 3,4; 95%-KI: 1,2-9,9; p = 0,03) (Tizeba *et al.*, 2018).

In unserer Analyse stellte sich ein niedriger sozioökonomischer Status nach multivariater Analyse als einziger Risikofaktor einer B19V-Infektion heraus (adjustierte OR: 2,1; 95%-KI:

1,3-3,4; $p < 0,01$). Die Größe der Konfidenzintervalle lässt sich durch die kleine Fallgruppengröße von nur 76 Personen mit B19V-Infektion erklären. Die Relevanz des sozioökonomischen Status bei der Häufigkeit von Infektionen ist vielfach beschrieben, sodass sich unsere Ergebnisse in die allgemeine Datenlage einpassen.

4.4. Anämie

4.4.1. Häufigkeit der Anämie

Aufgrund der Einschlusskriterien der Studie mit einer stationären Aufnahme und Fieber $\geq 38,0^\circ\text{C}$ lassen sich keine Rückschlüsse auf die allgemeine Häufigkeit einer Anämie im Kindesalter im Studiengebiet schließen. Mit 38,8 % hatte rund zwei Fünftel der Kinder eine moderate Anämie, 11,7 % eine schwere Anämie. Bei einem Grenzwert von 11 g/dl, wie er von der WHO als allgemeiner Anämie-Grenzwert bei Kindern empfohlen und demnach in vielen Prävalenzstudien verwendet wurde (WHO, 1968), fand sich in unserer Population bei 64,7 % eine Anämie. Frühere Daten aus der Ashanti-Region wiesen bei 79,8 % der Kinder eine Anämie (Hb-Wert < 11 g/dl) und 12,2 % eine schwerer Anämie (Hb-Wert < 7 g/dl) auf (Ewusie *et al.*, 2014). Duedu *et al.* beschrieben die Anämie bei 234 Kindern vorrangig normochrom-normozytär, unter Individuen mit *P.-falciparum*- und B19V-Infektion fand sich eine Dominanz der mikrozytären Anämie (Duedu *et al.*, 2013). In unserer Population ließ sich dieser Unterschied nicht reproduzieren, in der Mehrheit der Fälle zeigte sich eine normochrom-normozytäre Anämie, unabhängig vom Infektionsstatus mit B19V und *P. falciparum*.

4.4.2. Risikofaktoren der Anämie

Zur Differenzierung zwischen IgM- und PCR-Positivität in Bezug auf das Anämierisiko erfolgte die Risikofaktoranalyse in drei Modellen. Die berechneten OR unterschieden sich für die weiteren betrachteten Variablen zwischen den Modellen nur unwesentlich, im Folgenden werden daher nur die Werte aus dem multivariaten Modell mit der B19V-Definition über PCR- oder IgM-Positivität aufgeführt.

Eine Studie aus der Brong-Ahafo-Region im Westen Ghanas beschrieb einen diskret protektiven Charakter des weiblichen Geschlechtes gegenüber dem Auftreten einer Anämie (Hb < 11 g/dl; OR: 0,7; 95%-KI: 0,5-1,0; $p = 0,05$). In unserer Population zeigte sich eine ähnliche adjustierte OR der männlichen gegenüber den weiblichen Kindern von 1,3 (95%-KI: 1,0-1,6), jedoch mit einem p -Wert von 0,07. Kinder unter einem Jahr hatten nach den Daten von Van Buskirk *et al.* sowohl ein höheres Risiko, von einer Anämie betroffen zu sein, als auch

von einer schwereren Form (OR der Kinder > 12 Monate: 0,6; 95%-KI: 0,4-0,8; $p < 0,01$) (Van Buskirk *et al.*, 2014). In unserer Population konnte zwischen den Altersgruppen unter und ab fünf Jahren kein Unterschied gezeigt werden (adjustierte OR: 1,1; 95%-KI: 0,8-1,4; $p = 0,70$). Eine Studie zu Anämieursachen aus Tansania stellte den erschwerten Zugang zur Gesundheitsversorgung (eine Distanz von > 10 km) mit einer OR von 3,0 (95%-KI: 1,9-4,9; $p < 0,01$) und das Vorliegen einer schweren Unterernährung (OR: 2,4; 95%-KI: 1,3-4,3; $p < 0,01$) als wichtige Risikofaktoren dar (Kahigwa *et al.*, 2002). Die Risikofaktoren der akuten und chronischen Unterernährung konnten aufgrund inkompletter Daten in unserer Population nicht abschließend untersucht werden. Die Bedeutung von Vitamin- und Spurenelementmangelzuständen für die Entwicklung einer Anämie ist weitreichend bekannt (Crawley, 2004; Calis *et al.*, 2008) und wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund limitierter Ressourcen nicht untersucht. Calis *et al.* stellten das Vorliegen einer Bakteriämie unter Kindern mit schwerer Anämie als Hauptrisikofaktor dar (OR: 5,3; 95%-KI: 2,6-10,9), in unserer Studienpopulation war die Anzahl der Bakteriämien mit 39 (3,3%) insgesamt gering. Die Hakenwurm-Infestation stellte in Malawi ebenfalls einen wichtigen Risikofaktor dar (OR: 4,8; 95%-KI: 2,0-11,8), in unserem Studiengebiet war bereits vorab eine niedriger Prävalenz beschrieben worden (Krumkamp *et al.*, 2015). Im Vergleich zu anderen Studien war die Bedeutung eines G6PD-Mangels für das Vorliegen einer Anämie ähnlich. In Malawi zeigte sich eine OR von 2,4 (95%-KI: 1,3-4,4) (Calis *et al.*, 2008) während sich in unserer Population eine OR von 2,4 (95%-KI: 1,1-5,0; $p = 0,03$) fand. Stärkster unabhängiger Risikofaktor in unserer Population war jedoch das Vorliegen einer Sichelzellerkrankheit (OR: 6,8; 95%-KI: 2,9-16,3; $p < 0,01$). Mehrere Studien haben sozioökonomische Faktoren wie den Bildungsgrad der Eltern oder die Art des Wohnhauses in univariaten Analysen als Risikofaktoren beschrieben (z. B. Kahigwa *et al.*, 2002). In unserer multivariaten Analyse stellte sich ein niedriger sozioökonomische Status ebenfalls als relevanter unabhängiger Risikofaktor heraus (OR: 2,1; 95%-KI: 1,5-2,8; $p < 0,01$). Auch die Volkszugehörigkeit zu den Northerners stellte einen milden Risikofaktor dar (OR: 1,8; 95%-KI: 1,4-2,5; $p < 0,01$), die Anzahl an Geschwistern verlor in der multivariaten Analyse an Bedeutung.

Eine Infektion mit *P. falciparum* erhöhte die Chance einer Anämie um den Faktor 1,9 (95%-KI: 1,4-2,4; $p < 0,01$). In weiteren Studien hatte eine *P.-falciparum*-Infektion eine OR von 2,2 (95%-KI: 1,5-3,4; $p < 0,01$), 3,0 (95%-KI: 1,4-6,9; $p < 0,01$), 5,8 (95%-KI: 2,9-11,2; $p < 0,01$) und 9,5 (95%-KI: 4,3-21,3; $p < 0,01$) (Kahigwa *et al.*, 2002; Wildig *et al.*, 2006, 2010; Van Buskirk *et al.*, 2014).

B19V hemmt die Erythropoese über die Proliferation der erythroiden Progenitorzellen und kann darüber eine Anämie verursachen (Morinet *et al.*, 2011). Während die ersten Studien zum Zusammenhang zwischen B19V-Infektion und Anämie in Malaria-Endemiegebieten keine Assoziation aufzeigten, (Jones *et al.*, 1990; Yeats *et al.*, 1999) haben aktuellere Studien die Virusinfektion als relevanten Risikofaktor herausgearbeitet (Wildig *et al.*, 2006; Manning *et al.*, 2012; Toan *et al.*, 2013; Duedu *et al.*, 2013; Tizeba *et al.*, 2018). Duedu *et al.* zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schweren Anämie unter Kindern mit milder Anämie im Fall einer positiven B19V-PCR (OR: 4,1; 95%-KI: 0,8-20,3), aufgrund einer geringen Fallanzahl ist die Aussagekraft jedoch deutlich abgeschwächt (Duedu *et al.*, 2013). Unsere Daten zeigten im Gegensatz kein erhöhtes Risiko für eine Anämie bei positiver B19V-PCR (OR: 0,9; 95%-KI: 0,4-1,8; $p = 0,70$). Eine IgM-Seropositivität hingegen war in unserer Studie mit einer Anämie assoziiert (OR: 2,6; 95%-KI: 1,3-5,3; $p < 0,01$) und bestätigte damit die Ergebnisse aus Tansania (Tizeba *et al.*, 2018). Auch eine Studie aus Papua-Neuguinea beschrieb diese Assoziation zwischen B19V-Infektion und Anämie in der Gruppe mit IgM-Seropositivität, nicht jedoch in der Subgruppe der B19V-PCR positiven Fälle (Wildig *et al.*, 2006). Manning *et al.* definierten eine B19V-Infektion bei IgM- oder PCR-Positivität und fanden in der multivariaten Analyse die B19V-Infektion den stärksten Risikofaktor mit einer OR von 75,8 (95%-KI: 15,4-526; $p < 0,01$) (Manning *et al.*, 2012). Daten aus Kenia hingegen zeigten keinen Zusammenhang zwischen IgM- oder PCR-Positivität und Anämie, es wurde jedoch eine Assoziation zwischen hohen IgM-Spiegeln und Anämie dargestellt (Wildig *et al.*, 2010).

Da eine PCR-Diagnostik auch über Monate bis Jahre nach initialer Infektion positiv bleiben kann, ist ein fehlender Zusammenhang mit einer Anämie denkbar (Candotti *et al.*, 2004). In unserer Studie wiesen 33/36 Proben mit positiver PCR auch IgG-Antikörper auf, sodass eine vergangene Infektion möglich wäre. Andererseits hatten auch sechs Fälle einen zeitgleichen Nachweis von IgM, IgG und PCR. Der klare Zusammenhang zwischen IgM-Positivität und Anämie ist über den zeitlichen Zusammenfall zwischen Hb-Abfall und hohen IgM-Titern etwa eine Woche nach B19V-Infektion zu erklären (Wildig *et al.*, 2010).

Da sowohl B19V als auch *P. falciparum* Ursache einer Anämie sein können, wird die Rolle von Koinfektionen seit Längerem diskutiert. Wie auch bei Wildig *et al.* (Wildig *et al.*, 2006) stellten sich in unserer Studie B19V und *P. falciparum* als unabhängige Risikofaktoren heraus. Ein additiver oder multiplikativer Effekt bei Vorhandensein einer Koinfektion ließ sich nicht darstellen. Eine vorangegangene Studie aus Ghana beschrieb die Koinfektion als Risikofaktor einer schweren Anämie (OR: 2,2; 95%-KI: 0,4-12,5), aufgrund von einer geringen Fallzahl (6/234) zeigte sich jedoch ein großes Konfidenzintervall mit eingeschränkter Aussagekraft (Duedu *et al.*, 2013). Toan *et al.* beschrieben einen Hb-Abfall durch B19V-Infektion bei

Kindern mit leichter *P.-falciparum*-Malaria im Vergleich zu Kindern mit schwerer Malaria, ohne mögliche Ursachen zu diskutieren (Toan *et al.*, 2013). Die aktuellste Studie aus Tansania beschrieb eine Differenz der medianen Hb-Werte zwischen Kindern mit Koinfektionen (n = 12) und *P.-falciparum*-Monoinfektionen (4,6 vs. 7,1 g/dl, p = 0,12), ebenfalls jedoch an kleinen Fallzahlen (Tizeba *et al.*, 2018).

Je nach Studienpopulation zeigen sich unterschiedliche Risikofaktoren für eine Anämie, die bisherige Datenlage zum Einfluss der B19V und *P.-falciparum*-Mono- und Koinfektion auf eine Anämie ist uneinheitlich. Mit unserer Studie konnte die bereits beschriebene Assoziation zwischen positivem B19V-IgM-Antikörperstatus und moderater-schwerer Anämie bestätigt werden. Unter Kindern mit positiver B19V-PCR fand sich dieser Zusammenhang nicht, auch konnte kein erhöhtes Anämierisiko im Rahmen von Koinfektionen dargestellt werden.

4.5. Limitierungen der Studie

In den vorliegenden Daten wurde nur eine definierte Subgruppe der Population des Studiengebietes erfasst. Die Aussagekraft zum Vorkommen der Anämie und auch der Häufigkeit und Relevanz von B19V-Mono- und -Koinfektionen ist in diesem Kontext durch die Einschlusskriterien der Studie eingeschränkt. Zum einen wurden nur Kinder mit Fieber (tympurale Temperatur über 38,0°C) eingeschlossen, unabhängig von einer vorausgegangenen Therapie mit Antipyretika. Zum anderen wurden mögliche B19V-Infektion ohne Fieber mit führendem myelosuppressiven Aspekt der Erkrankung in der Studie nicht erfasst. Letztlich ist daher eine Unterschätzung der Häufigkeit der B19V-Infektion und der Relevanz auf das Vorliegen einer Anämie möglich.

Trotz einer relativ großen Studienpopulation fanden sich nur 76 B19V-Infektionen, dementsprechend zeigten sich kleinere Gruppen mit Koinfektionen und/oder Anämie. Die nachfolgende Risikofaktoranalyse ist aufgrund der verhältnismäßig kleinen Subgruppen in ihrer Aussagekraft geschwächt. Für die Risikofaktoranalyse der Anämie konnten aufgrund limitierter Ressourcen keine Untersuchungen auf nutritive Ursachen (insbesondere Eisenmangel, aber auch Folsäure-, Vitamin-B12, Vitamin-A-Mangel) durchgeführt werden. Des Weiteren gilt auch eine akute und chronische Entzündung als wichtiger Risikofaktor einer Anämie. Durch das Einschlusskriterium Fieber muss bei allen Kindern von diesem Zustand ausgegangen werden.

Potenzielle Fehlerquellen in der Labordiagnostik bot der Probentransport vom Studienkrankenhaus in das Labor in Kumasi, wo die DNA-Extraktion erfolgte. Im Anschluss wurden die Proben mehrere Monate bei -20°C und -80°C in Ghana und Deutschland gelagert,

bevor die PCR und serologische Diagnostik durchgeführt wurden. Wegen der zeitlichen Verzögerung war eine erneute Probengewinnung bei grenzwertigen Ergebnissen nicht möglich. Auch die breite Diagnostik bezüglich weiterer Krankheitserreger limitierte das für die B19V-Diagnostik verfügbare Probenmaterial.

Die initial geplante Nachverfolgung der Kinder stellte sich aufgrund der lokalen Begebenheiten deutlich erschwert dar, sodass letztlich aufgrund der geringen Einschussraten keine allgemeinen Schlussfolgerungen möglich waren.

Damit eine validere Aussage zur Häufigkeit von B19V-Mono- und Koinfektionen ermöglicht werden kann, wäre eine Studie mit Einschluss aller hospitalisierten Kinder notwendig. Eine zusätzliche Kontrollgruppe im ambulanten Bereich könnte das Wissen über den Anteil asymptomatischer Mono- und Koinfektionen erhöhen.

4.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Zur abschließenden Beantwortung der Kernfragen werden konfirmative Daten benötigt, die in einer spezifisch zugeschnittenen Studie ermittelt werden müssten.

Die vorliegenden Daten unterstreichen jedoch die mögliche Relevanz von B19V-Infektionen im Kindesalter, sowohl im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Anämie als auch als alleinige Ursache einer fieberhaften Erkrankung mit notwendiger stationärer Behandlung. Trotz andauernder Bemühungen in der Entwicklung eines Impfstoffes sowie einer zielgerichteten Therapie steht beides bisher nicht zu Verfügung.

Hierzulande besteht ein etablierter und validierter diagnostischer Algorithmus für B19V-Infektionen, zudem wird an der Verfeinerung der Diagnostik gerade in Bezug auf persistierende bzw. reaktivierte Infektionen geforscht. Auf Grundlage unserer Daten scheint die Aussagekraft dieser Methoden in Gebieten mit endemischer Malaria südlich der Sahara weniger zuverlässig und sollte vor der Durchführung weiterer Studien systematisch untersucht werden. Gerade die Sensitivität der Erkennung der vorherrschenden B19V-Genotypen mit der PCR-Diagnostik sowie die Spezifität der serologischen Diagnostik bei zeitgleicher *P.-falciparum*-Infektion sind noch ungeklärt.

5. Zusammenfassung

Die Infektion mit Parvovirus B19 (B19V) ist weltweit verbreitet und kann neben der Kinderkrankheit „Ringelröteln“ zu schwerer Anämie und aplastischen Krisen führen. Die Rolle der Viruserkrankung als Koinfektion mit *Plasmodium (P.) falciparum* in Malaria-Endemiegebieten wird seit Längerem kontrovers diskutiert. Mit dieser Studie sollte die Prävalenz und klinische Bedeutung von B19V-Infektionen untersucht, sowie die Auswirkung einer Koinfektionen mit *P. falciparum* auf die Entwicklung einer Anämie bestimmt werden.

Zwischen November 2013 und April 2015 wurden Kinder mit febrilen Erkrankungen in stationärer Behandlung im Presbyterian Hospital in Agogo, Ghana eingeschlossen. Die Blutproben wurden mit dem Mikroskop auf eine Infektion mit *P. falciparum* untersucht, zudem erfolgte die molekulargenetische und serologische Diagnostik einer B19V-Infektion. Eine aktuelle B19V-Infektion wurde über einen positiven IgM-Antikörperstatus oder eine positive B19V-PCR definiert. Für die Anämie wurden altersabhängige Grenzwerte nach WHO-Empfehlung angewandt. Eine Risikofaktorenanalyse erfolgte für B19V-Infektionen sowie für das Vorliegen einer Anämie. Die Häufigkeit der Anämie wurde zwischen Kindern mit und ohne B19V-Infektion in Abhängigkeit von der Koinfektion mit *P. falciparum* verglichen.

Unter den 1.186 eingeschlossenen Fällen zeigte sich bei 76 (6,4 %) mindestens ein Labormarker für B19V positiv (40 IgM+, 30 PCR+, 6 IgM+ und PCR+). Unter den B19V-Infektionen hatten 60,5 % eine Koinfektion mit *P. falciparum*. Insgesamt fanden sich 598 Kinder (50,5 %) mit einer Anämie. Ein positiver B19V-IgM-Antikörperstatus zeigte sich mit dem Vorkommen einer Anämie assoziiert (OR: 2,6; 95%-KI: 1,3-5,3; $p < 0,01$), wohingegen eine positive B19V-PCR diesen Zusammenhang nicht aufwies (OR: 0,9; 95%-KI: 0,4-1,8; $p = 0,70$). Eine Infektion mit *P. falciparum* sowie eine B19V-Infektion, definiert über eine IgM- aber nicht PCR-Positivität, stellten sich als unabhängige Risikofaktoren einer Anämie dar; ein multiplikativer Effekt konnte nicht nachgewiesen werden. Stärkster unabhängiger Risikofaktor für das Vorliegen einer B19V-Infektion war ein niedriger sozioökonomischer Status (OR: 2,1; 95%-KI: 1,3-3,4; $p < 0,01$). Kinder mit B19V-Infektionen boten ein heterogenes Beschwerdebild, Anhalt für einen schwereren Krankheitsverlauf bei Koinfektionen ergab sich nicht.

Komplizierend zeigten sich hohe Diskrepanzen zwischen den zwei verwendeten Antikörper-Testkits sowie eine geringe Übereinstimmungsrate zwischen PCR und serologischer Diagnostik. Konsekutiv stellte sich die Validität der bisherigen Labordiagnostik in Ländern südlich der Sahara mit endemisch vorkommender Malaria in Frage und die Schwierigkeit der Interpretation der B19V-Diagnostik wurde diskutiert.

Abstract

Human parvovirus B19 (B19V) occurs globally and is a common cause of erythema infectiosum but can also lead to severe anaemia. Children in malaria-endemic areas are a vulnerable population, for which the role of co-infections has been controversially discussed. The study aimed to determine prevalence and severity of B19V infection, and the effect of co-infections with the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) on the risk for anaemia.

Between November 2013 and April 2015, a total of 1.186 hospital visits of children with fever admitted to a hospital in Ghana were recorded. Malaria, B19V and additional diagnostics for fever causes were performed. Recent B19V infection was defined as PCR and/or IgM positivity. Anaemia was defined by age-dependent cut-off values according to WHO recommendation. Risk factors for a B19V infection and for anaemia were analysed. The prevalence of anaemia was compared between children with/without B19V infection, stratified for the presence of malaria.

B19V-IgM-PCR was positive in 6.4 % (n = 76; 40 IgM+, 30 PCR+, 6 IgM+ and PCR+). Among the B19V cases 60.5 % had a simultaneous *P. falciparum* infection. A total of 598 (50,5 %) children presented with anaemia. B19V IgM positivity was associated with anaemia (OR = 2.6; 95%-CI: 1.3-5.3; $p < 0.01$), while B19V PCR positivity did not increase the risk for anaemia (OR = 0.9; 95%-CI: 0.4-1.8; $p = 0.70$). *P. falciparum* and IgM positive B19V infection were independent risk factors for anaemia. A multiplicative effect of B19V and *P. falciparum* infection was not found. A low socioeconomic status was the main risk factor for a B19V infection. The clinical presentation of B19V was heterogeneous. The study results did not indicate a more complicated course of infection in the case of coinfection.

We found high discordancy between performed serological assays as well as a small number of samples with positive IgM and PCR results. Hence possible reasons and adequate laboratory diagnostics in malaria-endemic regions in sub-Saharan Africa were discussed. Prior to further investigation validation of existing assays in sub-Saharan Africa, including testing for sensitivity of detection of different viral genotypes and possible interaction in malaria-endemic areas should be performed.

6. Literaturverzeichnis

- Abele DC, Tobie JE, Hill JG, Contactos PG, Evans CB (1965) Alterations in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. *Am J Trop Med Hyg* 14, 191-197.
- Abonuusum A, Owusu-Daako K, Tannich E, May J, Garms R, Kruppa T (2011) Malaria transmission in two rural communities in the forest zone of Ghana. *Parasitol Res* 108, 1465-1471.
- Amoah LE, Opong A, Torgby RA, Abankwa J, Acquah FK (2016) Prevalence of G6PD deficiency and plasmodium falciparum parasites in asymptomatic school children living in southern Ghana. *Malar J* 15, 1-8.
- Amoako N, Asante KP, Adjei G, Awandare G, Bimi L, Owusu-Agyei S (2014) Associations between red cell polymorphisms and plasmodium falciparum infection in the middle belt of Ghana. *PLoS One* 9, e112868.
- Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrrell DAJ (1985) Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 152, 257-265.
- Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CLR, Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS (1983) Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* 1, 1378.
- Asante Akim Central Municipal Assembly (2012) Asante Akim North. Available at: <http://asanteakimnorth.ghanadistricts.gov.gh/> [Accessed August 13, 2015].
- Asobayire FS, Adou P, Davidsson L, Cook JD, Hurel RF (2001) Prevalence of iron deficiency with and without concurrent anemia in population groups with high prevalence of malaria and other infection: a study in Cote d'Ivoire. *Am J Clin Nutr* 74, 776-782.
- Bailey JW, Williams J, Bain BJ, Parker-Williams J, Chiodini PL (2013) Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. *Br J Haematol* 163, 573-580.
- Bald M, Biberthaler P, Blattmann C, Bosse HM, Engelmann G, Freisinger P, Hellstern G, Hempel M, Pape-Feußner N, Trollmann R, Zimmermann T (2012) *Kurzlehrbuch Pädiatrie*. S. 592. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.
- Ballou WR, Reed JL, Noble W, Young NS, Koenig S (2003) Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J Infect Dis* 187, 675-678.
- Banic DM, Viana-Martins FS, de Souza JM, de Castro Peixoto T, Daniel-Ribeiro C (1991) Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 44, 571-577.
- Bejon P, Berkley JA, Mwangi T, Ogada E, Mwangi I, Maitland K, Williams T, Scott JAG, English M, Lowe BS, Peshu N, Newton CRJC, Marsh K (2007) Defining childhood severe falciparum malaria for intervention studies. *PLOS Med* 4, e251.
- Bender M (2017) Sick cell disease. *GeneReviews*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1377/> [Accessed January 14, 2020].
- Bernstein DI, El Sahly HM, Keitel WA, Wolff M, Simone G, Segawa C, Wong S, Shelly D, Young NS, Dempsey W (2011) Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* 29, 7357-7363.
- Boele van Hensbroek M, Calis JCJ, Phiri KS, Vet R, Munthali F, Kraaijenhagen R, van den Berg H, Faragher B, Bates I, Molyneux ME (2010) Pathophysiological mechanisms of severe anaemia in Malawian children. *PLoS One* 5, e12589.
- Bönsch C, Kempf C, Mueller I, Manning L, Laman M, Davis TME, Ros C (2010) Chloroquine and its derivatives exacerbate B19V-associated anemia by promoting viral replication. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e669.
- Bonvicini F, Buaa G, Manaresia E, Gallinella G (2015) Antiviral effect of cidofovir on parvovirus B19 replication. *Antiviral Res* 113, 11-18.
- Brandão MM, Castro M de LRB, Fontes A, Cesar CL, Costa FF, Saad STO (2009) Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 43, 217-221.

- Bredl S, Plentz A, Wenzel JJ, Pfister H, Möst J, Modrow S (2011) False-negative serology in patients with acute parvovirus B19 infection. *J Clin Virol* 51, 115-120.
- Breman JG (2009) Eradicating malaria. *Sci Prog* 92, 1-38.
- Bua G, Conti I, Manaresi E, Sethna P, Foster S, Bonvicini F, Gallinella G (2019) Antiviral activity of brincidofovir on parvovirus B19. *Antiviral Res* 162, 22-29.
- Burchard G-D, Browne ENL, Sievertsen J, May J, Meyer CG (2001) Spleen size determined by ultrasound in patients with sickle cell trait, HbAC trait and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in a malaria hyperendemic area (Ashanti Region, Ghana). *Acta Trop* 80, 103-109.
- Butchko AR, Jordan JA (2004) Comparison of three commercially available serologic assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. *J Clin Microbiol* 42, 3191-3195.
- Calis JCJ, Kamija SP, Faragher EB, Brabin BJ, Bates I, Cuevas LE, de Haan RJ, Phiri AI, Malange P, Khoka M, Hulshof PJM, van Lieshout L, Beld MGHM, Teo YY, Rockett KA, Richardson A, Kwiatkowski DP, Molyneux ME, Boele van Hensbroek M (2008) Severe anemia in Malawian children. *N Engl J Med* 358, 888-899.
- Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J (2004) Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virol* 78, 12169-12178.
- Chandramouli S, Medina-Selby A, Coit D, Schaefer M, Spencer T, Brito LA, Zhang P, Otten G, Mandl CW, Mason PW, Dormitzer PR, Settembre EC (2013) Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate. *Vaccine* 31, 3872-3878.
- Chorba T, Coccia P, Holman RC, Tattersall P, Anderson LJ, Sudman J, Young NS, Kurczynski E, Saarinen UM, Moir R, Lawrence DN, Jason JM, Evatt B (1986) The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect Dis* 154, 383-393.
- Clark MA, Goheen MM, Fulford A, Prentice AM, Elnagheeb MA, Patel J, Fisher N, Taylor SM, Kasthuri RS, Cerami C (2014) Host iron status and iron supplementation mediate susceptibility to erythrocytic stage plasmodium falciparum. *Nat Commun* 5, 4446.
- Cohen BJ, Buckley MM (1988) The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol* 25, 151-153.
- Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D (1975) Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1, 72-73.
- Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K (2016) Malaria: biology and disease. *Cell* 167, 610-624.
- Crawley J (2004) Reducing the burden of anemia in infants and young children in malaria-endemic countries of Africa: from evidence to action. *Am J Trop Med Hyg* 71, 25-34.
- Curtain CC, Kidson C, Champness DL, Gorman JG (1964) Malaria antibody content of gamma-2-7S globulin in tropical populations. *Nature* 203, 1366-1367.
- Dicko A, Klion AD, Théra MA, Sagara I, Yalcouyé D, Niambéle MB, Sogoba M, Dolo G, Dao A, Diallo DA, Doumbo OK, Miller LH (2004) The etiology of severe anemia in a village and a periurban area in Mali. *Blood* 104, 1198-1200.
- Dobbs KR, Dent AE (2016) Plasmodium malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology* 143, 129-138.
- Donati D, Zhang LP, Chen Q, Chene A, Flick K, Nyström M, Wahlgren M, Bejarano MT (2004) Identification of a polyclonal B-cell activator in plasmodium falciparum. *Infect Immun* 72, 5412-5418.
- Dondorp AM et al. (2010) Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* 376, 1647-1657.
- Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ (2000) Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* 16, 228-232.
- Dondorp AM, Lee SJ, Faiz MA, Mishra S, Price R, Tjitra E, Than M, Htut Y, Mohanty S, Yunus E Bin, Rahman R,

- Nosten F, Anstey NM, Day NPJ, White NJ (2008) The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clin Infect Dis* 47, 151-157.
- Duedu KO, Sagoe KWC, Ayeh-Kumi PF, Afrim RB, Adiku T (2013) The effects of co-infection with human parvovirus B19 and plasmodium falciparum on type and degree of anaemia in Ghanaian children. *Asian Pac J Trop Biomed* 3, 129-139.
- Enders M, Helbig S, Hunjet A, Pfister H, Reichhuber C, Motz M (2007) Comparative evaluation of two commercial enzyme immunoassays for serodiagnosis of human parvovirus B19 infection. *J Virol Methods* 146, 409-413.
- Ewusie JE, Ahiadeke C, Beyene J, Hamid JS (2014) Prevalence of anemia among under-5 children in the Ghanaian population: estimates from the Ghana demographic and health survey. *BMC Public Health* 14, 1-9.
- Fleming S, Thompson M, Stevens R, Heneghan C, Plüddemann A, Maconochie I, Tarassenko L, Mant D (2011) Normal ranges of heart rate and respiratory rate in children from birth to 18 years of age: a systematic review of observational studies. *Lancet* 377, 1011-1018.
- Flunker G, Peters A, Wiersbitzky S, Modrow S, Seidel W (1998) Persistent parvovirus B19 infections in immunocompromised children. *Med Microbiol Immunol* 186, 189-194.
- Fowkes FJI, Boeuf P, Beeson JG (2016) Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology* 143, 139-153.
- Freeman RR, Parish CR (1978) Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. *Clin Exp Immunol* 32, 41-45.
- Frickhofen N, Young NS (1989) Persistent parvovirus B19 infections in humans. *Microb Pathog* 7, 319-327.
- Gallinella G (2018) The clinical use of parvovirus B19 assays: recent advances. *Expert Rev Mol Diagn* 18, 821-832.
- Gallinella G, Zuffi E, Gentilomi G, Manaresi E, Venturoli S, Bonvicini F, Cricca M, Zerbini M, Musiani M (2003) Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. *J Med Virol* 71, 135-139.
- Ghana Health Service (2016) *HIV sentinel survey 2015*. p. 15-16
- Ghana Health Service (2017) *Ghana health service, 2016 annual report*. p. 59
- Goheen MM, Wegmüller R, Bah A, Darboe B, Danso E, Affara M, Gardner D, Patel JC, Prentice AM, Cerami C (2016) Anemia offers stronger protection than sickle cell trait against the erythrocytic stage of falciparum malaria and this protection is reversed by iron supplementation. *EBioMedicine* 14, 123-130.
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A (2005) International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 6, 2-8.
- Greenwood BM (1974) Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* 303, 435-436.
- Gupta R (2005) Parvovirus B19 co-infection with falciparum malaria: A cause of severe anemia. *Haematologica* 90, e114.
- Heegaard ED, Brown KE (2002) Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 15, 485-505.
- Heegaard ED, Jensen IP, Christensen J (2001) Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. *J Med Virol* 65, 362-367.
- Hoebe CJPA, Claas ECJ, Steenbergen JE va., Kroes ACM (2002) Confirmation of an outbreak of parvovirus B19 in a primary school using IgM ELISA and PCR on thumb prick blood samples. *J Clin Virol* 25, 303-307.
- Hogan B, Eibach D, Krumkamp R, Sarpong N, Dekker D, Kreuels B, Maiga-Ascofaré O, Boahen KG, Akenten CW, Adu-Sarkodie Y, Owusu-Dabo E, May J (2018) Malaria coinfections in febrile pediatric inpatients: a hospital-based study from Ghana. *Clin Infect Dis* 66, 1838-1845.
- Hokynar K, Norja P, Laitinen H, Palomäki P, Garbarg-Chenon A, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M (2004) Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests. *J*

- Clin Microbiol* 42, 2013-2019.
- Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE (1999) Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* 119, 127-133.
- Jensen IP, Vestergaard BF (1997) Assessment of the specificity of a commercial human parvovirus B19 IgM assay. *Clin Diagn Virol* 7, 133-137.
- Jones PH, Pickett LC, Anderson MJ, Pasvol G (1990) Human parvovirus infection in children and severe anaemia seen in an area endemic for malaria. *J Trop Med Hyg* 93, 67-70.
- Jonker FAM, Poel E, Bates I, Boele Van Hensbroek M (2017) Anaemia, iron deficiency and susceptibility to infection in children in sub-saharan Africa, guideline dilemmas. *Br J Haematol* 177, 878-883.
- Jordan JA (1996) Identification of human parvovirus B19 infection in idiopathic nonimmune hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol* 174, 37-42.
- Jordan JA, Tiangco B, Kiss J, Koch W (1998) Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang* 75, 97-102.
- Kahigwa E, Schellenberg D, Sanz S, Aponte JJ, Wigayi J, Mshinda H, Alonso P, Menendez C (2002) Risk factors for presentation to hospital with severe anaemia in Tanzanian children: a case-control study. *Trop Med Int Heal* 7, 823-830.
- Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, Regan M, Weatherall D, Chou DP, Eisele TP, Flaxman SR, Pullan RL, Brooker SJ, Murray CJL (2014) A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood J* 123, 615-624.
- Kiguli S, Maitland K, George EC, Olupot-Olupot P, Opoka RO, Engoru C, Akech SO, Nyeko R, Mtove G, Reyburn H, Levin M, Babiker AG, Gibb DM, Crawley J (2015) Anaemia and blood transfusion in African children presenting to hospital with severe febrile illness. *BMC Med* 13:21, 1-13.
- Kooistra K, Mesman HJ, de Waal M, Koppelman MHGM, Zaaier HL (2011) Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003-2009. *Vox Sang* 100, 261-266.
- Kreuels B, Kreuzberg C, Kobbe R, Ayim-Akonor M, Apiah-Thompson P, Thompson B, Ehmen C, Adjei S, Langefeld I, Adjei O, May J (2010) Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood* 115, 4551-4558.
- Krumkamp R, Sarpong N, Schwarz NG, Adelkofer J, Loag W, Eibach D, Hagen RM, Adu-Sarkodie Y, Tannich E, May J (2015) Gastrointestinal infections and diarrheal disease in Ghanaian infants and children: an outpatient case-control study. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003568.
- Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ (2007) Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110, 18-28.
- Luzzatto L (1979) Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* 54, 961-976.
- Manaresi E, Gallinella G (2019) Advances in the development of antiviral strategies against parvovirus B19. *Viruses* 11, E659.
- Manning L, Laman M, Rosanas-Urgell A, Michon P, Aipit S, Bona C, Siba P, Mueller I, Davis TME (2012) Severe anemia in Papua New Guinean children from a malaria-endemic area: a case-control etiologic study. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1972.
- Maple PAC, Hedman L, Dhanilall P, Kantola K, Nurmi V, Söderlund-Venermo M, Brown KE, Hedman K (2014) Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study. *J Clin Microbiol* 52, 947-956.
- Marsh K, Kinyanjui S (2006) Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28, 51-60.
- May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, Thye T, Abgenyega T, Horstmann RD (2007) Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *J Am Med Assoc* 297, 2220-2226.
- Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ (2000) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Clin Haematol*

- 13, 21-38.
- Menendez C, Fleming AF, Alonso PL (2000) Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 16, 469-476.
- Menendez C, Kahigwa E, Hirt R, Vounatsou P, Aponte JJ, Font F, Acosta CJ, Schellenberg DM, Galindo CM, Kimario J, Urassa H, Brabin B, Smith T a., Kitua AY, Tanner M, Alonso PL (1997) Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet* 350, 844-850.
- Menon MP, Yoon SS (2015) Prevalence and factors associated with anemia among children under 5 years of age - Uganda, 2009. *Am J Trop Med Hyg* 93, 521-526.
- Molenaar-de Backer MWA, Russcher A, Kroes ACM, Koppelman MHGM, Lanfermeijer M, Zaaijer HL (2016) Detection of parvovirus B19 DNA in blood: viruses or DNA remnants? *J Clin Virol* 84, 19-23.
- Molyneux ME, Taylor TE, Wirima JJ, Borgstein A (1989) Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children. *Q J Med* 71, 441-459.
- Morinet F, Leruez-Ville M, Pillet S, Fichelson S (2011) Concise review: anemia caused by viruses. *Stem Cells* 29, 1656-1660.
- Mortimer P, Humphries RK, Moore JG, Purcell RH, Young NS (1983) A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature* 302, 426-429.
- Parsyan A, Kerr S, Owusu-Ofori S, Elliott G, Allain JP (2006) Reactivity of genotype-specific recombinant proteins of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic. *J Clin Microbiol* 44, 1367-1375.
- Pasvol G (2006) Parvovirus infection, malaria, and anemia in the tropics - a new hidden enemy? *J Infect Dis* 194, 141-142.
- Pasvol G, Waetherall DJ, Wilson RJM, Smith DH, Gilles HM (1976) Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet* 1, 1269-1272.
- Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L (1981) Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1, 664-665.
- Penkert RR, Young NS, Surman SL, Sealy RE, Dormitzer PR, Settembre EC, Chandramouli S, Hankins JS, Hurwitz JL (2017) *Saccharomyces cerevisiae*-derived virus-like particle parvovirus B19 vaccine elicits binding and neutralizing antibodies in a mouse model for sickle cell disease. *Vaccine* 35, 3615-3620.
- Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI (2010) Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* 1, 104.
- Price RN, Simpson J a, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ (2001) Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65, 614-622.
- Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS (2017) Human parvoviruses. *Clin Microbiol Rev* 30, 43-113.
- Rosenberg YJ (1978) Autoimmune and polyclonal B cell responses during murine malaria. *Nature* 274, 170-172.
- Schellenberg JRMA, Smith T, Alonso PL, Hayes RJ (1994) What is clinical malaria? Finding case definitions for field research in highly endemic areas. *Parasitol Today* 10, 439-442.
- Schwarz NG, Mertens E, Winter D, Maiga-Ascofare O, Dekker D, Jansen S, Tappe D, Randriamampionona N, Rakotozandrindrainy R, Schmidt-Chanasit J (2017) No serological evidence for zika virus infection and low specificity for anti-zika virus ELISA in malaria positive individuals among pregnant women from Madagascar in 2010. *PLoS One* 12, e0176708.
- Sengl C, Watkins P, Morse D, Barrett SP, Zambon M, Andrews N, Atkins M, Hall S, Lau YK, Cohen BJ (1994) Parvovirus B19 outbreak on an adult ward. *Epidemiol Infect* 113, 345-353.
- Serjeant GR, Serjeant BE, Thomas PW, Anderson MJ, Patou G, Pattison JR (1993) Human parvovirus infection in

- homozygous sickle cell disease. *Lancet* 341, 1237-1240.
- Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE, Mohamed R (1981) Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* 2, 595-597.
- Statistical Service Ghana (2012) *2010 Population and Housing Census Final Results*.
- Stockdale AJ, Mitambo C, Everett D, Geretti AM, Gordon MA (2018) Epidemiology of hepatitis B, C and D in Malawi: systematic review. *BMC Infect Dis* 18, 516, 1-10.
- Sturm A, Amino R, Sand C Van De, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Menard R, Heussler VT (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287-1291.
- Thomas HIJ, Barrett E, Hesketh LM, Wynne A, Morgan-Capner P (1999) Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J Clin Virol* 14, 107-118.
- Tizeba YA, Mirambo MM, Kayange N, Mhada T, Ambrose EE, Smart LR, Mshana SE (2018) Parvovirus B19 Is Associated with a Significant Decrease in Hemoglobin Level among Children < 5 Years of Age with Anemia in Northwestern Tanzania. *J Trop Pediatr* 64, 479-487.
- Toan NL, Sy BT, Song LH, Luong H V., Binh NT, Binh VQ, Kandolf R, Velavan TP, Kremsner PG, Bock CT (2013) Co-infection of human parvovirus B19 with plasmodium falciparum contributes to malaria disease severity in Gabonese patients. *BMC Infect Dis* 13:375, 1-10.
- Urganci N, Arapoglu M, Kayaalp N (2003) Plasmodium falciparum malaria with coexisting parvovirus B19 infection. *Indian Pediatr* 40, 369-370.
- VanBuskirk KM, Ofosu A, Kennedy A, Denno DM (2014) Pediatric anemia in rural Ghana: a cross-sectional study of prevalence and risk factors. *J Trop Pediatr* 60, 308-317.
- Vyas S, Kumaranayake L (2006) Constructing socio-economic status indices: how to use principal components analysis. *Health Policy Plan* 21, 459-468.
- White NJ (2008) Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 46, 172-173.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM (2014) Malaria. *Lancet* 383, 723-735.
- WHO (1968) Nutritional anaemias: report of a WHO scientific group. World Health Organization; <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40707>
- WHO (2010) *Basic malaria microscopy*, 2nd edn.; <https://www.who.int/publications/i/item/9241547820>
- WHO (2011) Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva, Switz World Health Organization 1-6.
- WHO (2014) Severe malaria. *Trop Med Int Heal* 19, 7-131.
- WHO (2015) Climate and health country profile 2015: Ghana. World Health Organization & United Nations Framework Convention on Climate Change. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/208862>
- WHO (2019) *World malaria report 2019*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>
- Wildig J, Cossart Y, Peshu N, Gicheru N, Tuju J, Williams TN, Newton CR (2010) Parvovirus B19 infection and severe anaemia in Kenyan children: a retrospective case control study. *BMC Infect Dis* 10, 88.
- Wildig J, Michon P, Siba P, Mellombo M, Ura A, Mueller I, Cossart Y (2006) Parvovirus B19 Infection Contributes to Severe Anemia in Young Children in Papua New Guinea. *J Infect Dis* 194, 146-153.
- Yeats J, Daley H, Hardie D (1999) Parvovirus B19 infection does not contribute significantly to severe anaemia in children with malaria in Malawi. *Eur J Haematol* 63, 276-277.
- Young NS, Brown KE (2004) Parvovirus B19. *N Engl J Med* 350, 586-597.

7. Anhang

Risikofaktoren für Anämie: Lineare Regressionsmodelle mit dem Hb-Wert als kontinuierliche Variable

	Univariate Analyse: Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl]	p ¹	Modell mit B19V (PCR und/oder IgM) Multivariate Analyse ² Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl] ³	p ¹	Modell mit B19V-IgM Multivariate Analyse ² Konstante, Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl] ⁴	p ¹	Modell mit B19V-PCR Multivariate Analyse ² Konstant, Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl] ⁵	p ¹
Geschlecht								
Weiblich								
Männlich	-0,27 (-0,53- -0,01)	0,04	-0,23 (-0,47 - 0,02)	0,07	-0,23 (-0,47 - 0,01)	0,06	-0,24 (-0,49 - 0,00)	0,05
Alter								
< 5 Jahre								
≥ 5 Jahre	0,80 (0,49 - 1,11)	< 0,01	0,88 (0,58 - 1,18)	< 0,01	0,90 (0,58 - 1,18)	<0,01	0,86 (0,56 - 1,16)	< 0,01
Geschwister								
Keine								
1-2	-0,14 (-0,49 - 0,21)		-0,15 (-0,33 - 0,30)		0,004 (-0,31 - 0,32)		-0,02 (-0,40 - 0,30)	
3-12	-0,10 (-0,46 - 0,26)	0,73	-0,44 (-0,38 - 0,29)	0,96	-0,03 (-0,37 - 0,30)	0,96	-0,06 (-0,40 - 0,28)	0,93
Volkszugehörigkeit								
Akan								
Northerners	-1,28 (-1,54- -1,02)	< 0,01	-0,63 (-0,92- -0,33)	< 0,01	-0,63 (-0,92- -0,34)	< 0,01	-0,63 (-0,92- -0,34)	< 0,01
Sozioökonomischer Status⁶								
Hoch								
Niedrig	-1,38 (-1,63- -1,13)	< 0,01	-0,88 (-1,17- -0,59)	< 0,01	-0,87 (-1,17- -0,58)	< 0,01	-0,91 (-1,20- -0,61)	< 0,01
G6PD								
Nein								
Ja	-1,63 (-2,30- -0,96)	< 0,01	-0,95 (-1,57- -0,33)	< 0,01	-0,96 (-1,58- -0,34)	< 0,01	-0,90 (-1,52- -0,28)	< 0,01
Sichelzellkrankheit								
Nein								
Ja	-2,36 (-3,08- -1,64)	< 0,01	-2,82 (-3,50- -2,14)	< 0,01	-2,87 (-3,55- -2,18)	< 0,01	-2,86 (-3,54- -2,18)	< 0,01

7. Anhang

	Univariate Analyse: Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl]	p ¹	Modell mit B19V (PCR und/oder IgM) Multivariate Analyse ² Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl] ³	p ¹	Modell mit B19V-IgM Multivariate Analyse ² Konstante, Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl] ⁴	p ¹	Modell mit B19V-PCR Multivariate Analyse ² Konstant, Koeffizient (95%-KI); Hb [g/dl] ⁵	p ¹
<i>P.-falciparum</i>-Infektion⁷								
Nein								
Ja	-0,60 (-0,86- -0,34)	< 0,01	-0,57 (-0,82- -0,32)	< 0,01	-0,57 (-0,81- -0,32)	< 0,01	-0,58 (-0,83- -0,34)	< 0,01
B19V-Infektion (PCR/IgM)								
Nein								
Ja	- 0,48 (-1,02 - 0,05)	0,08	-0,29 (-0,78 - 0,20)	0,25	-		-	
B19V-IgM⁸								
negative								
positive	-0,98 (-1,66- -0,31)	< 0,01	-		-0,95 (-1,57- -0,34)	< 0,01	-	
B19V-PCR⁸								
negative								
positive	0,18 (-0,59 - 0,95)	0,64	-		-		0,58 (-0,12 - 1,28)	0,11

¹ Der Vergleich dichotomer und nominaler Daten wurde mit linearen Regressionsmodellen erstellt.

² Die Werte sind für alle anderen aufgeführten Variablen adjustiert.

³ R²: 0,195

⁴ R²: 0,200

⁵ R²: 0,196

⁶ Der sozioökonomische Index wurde aus neun Indikatorvariablen konstruiert. Diese wurden in eine tetrachorische Korrelation und Hauptkomponentenanalyse eingeschlossen. Im Anschluss wurde eine binäre Variable erstellt, hierbei wurde die Population in zwei gleich große Hälften geteilt.

⁷ Eine klinisch relevante Malaria mit *P. falciparum* wurde über eine Parasitendichte > 12.000/µl und Fieber ≥ 38,0°C definiert.

⁸ Alle Proben mit übereinstimmenden serologischen Resultaten in beiden Verfahren (Biotrin und Mikrogen) wurden als IgM-positiv gewertet. Alle Proben, die in der qualitativen PCR positiv waren, sind hier als positive Fälle aufgeführt. Sechs Proben waren PCR- und IgM-positiv.

Überblick der Studienpopulationen, Labordiagnostik und Definition der Anämie- und B19V-Infektion der zitierten Studien

Autoren, Publikationsjahr, Studienort	Labordiagnostik PCR	Serologie	Definition der B19V-Infektion	Studienpopulation	Definition der Anämie
Jones et al., 1990; Niger	In-situ Hybridisierung (Anderson et al., 1985)	Radioimmunassay (Cohen et al., 1983)	DNA Hybridisierung oder positives IgM-Ergebnis	120 ambulante Kinder mit einem Hkt 10-20 %; 24 Fälle wurden detailliert betrachtet	Schwere Anämie: Hkt < 20 %
Yeats, Daley & Hardie, 1999; Malawi	Nested-PCR	nein	Positives PCR-Ergebnis	313 stationäre Kinder mit Malaria, Vergleich von Kindern mit und ohne Anämie	Schwere Anämie: Hkt ≤ 15 %; keine Anämie: Hkt ≥ 30 %
Wildig et al., 2006; Papua-Neuguinea	Nested-PCR, Primerdesing nach Genomsequenz	EIA Biotrin, Irland; zweifach getestet	Positives IgM- und PCR-Ergebnis	169 Kinder mit V.a. Malaria in Gesundheitseinrichtung und schwerer Anämie, 6-59 Monate; Kontrollgruppe (n = 169)	Schwere Anämie: Hb ≤ 5 g/dl
Wildig et al., 2010; Kenia	PCR (Primer nach Candotti et al., 2004); nur 198 Proben untersucht	EIA Biotrin, Irland; zweifach getestet	Positives IgM-Ergebnis	264 stationäre Kinder unter sechs Jahren mit schwerer Anämie; stationäre Kontrollgruppe (n = 263)	Schwere Anämie: Hb ≤ 5 g/dl
Manning et al., 2012; Papua-Neuguinea	PCR (Primers nach Wildig et al. 2006)	EIA Biotrin, Irland	Positives IgM- oder PCR-Ergebnis	143 stationäre Kinder (0,5-10 Jahre) mit schwerer Anämie; Kontrollgruppe (n = 120) aus der Impfsprechstunde	Schwere Anämie: Hb ≤ 5 g/dl
Duedu et al., 2013; Ghana (Accra)	Semi-nested PCR (Parsyan et al. 2006)	nein	Positives PCR-Ergebnis	234 stationäre Kinder, 0-12 Jahre	Schwere Anämie: Hb ≤ 5 g/dl altersunabhängige Gruppenbildung für die Analyse: Hb < 8 g/dl; 8-10,9 g/dl; ≥ 11 g/dl
Toan et al., 2013; Gabun	Nested PCR (Toan et al. 2006) und quantitative PCR (Bultman et al. 2003, Tschope et al. 2005)	ELISA DxSelect FocusDiagnostic, Deutschland; nur in Subgruppe durchgeführt	Positives PCR-Ergebnis	197 stationäre Kinder mit Malaria (<i>P. falciparum</i>), gesunde Kontrollgruppe (n = 85)	Vergleich von kontinuierlichen Hkt-Werten, keine Kategorien
Tizeba et al., 2017, Tansania	nein	EIA DRG Instruments, Deutschland	Positives IgM-Ergebnis	265 stationäre Kinder unter fünf Jahren	Schwere Anämie Hb < 7 g/dl; moderate Anämie Hb 7-9,9 g/dl; milde Anämie Hb ≥ 10 g/dl

Detaillierte Verlaufsinformationen zu Parvovirus-B19-Mono- und Koinfektionen

B19V-Monoinfektion													
Verlauf des Hb-Wertes [g/dl] und der Temperatur [°C]													
	♂ / ♀	Alter [in Jahren]	PCR	IgM	D 0	Symptomatik und weitere Diagnosen (neben Fieber)	D 1	D 2	D 3	D 5	D 7	F 1	F 2
1.	m	1	-	+	8,0 39,0	Harnwegsinfektion (ohne Erregernachweis)	7,0 37,7	6,8 37,8	7,1 37,6				
2.	m	1	+	+	7,8 38,9	Obere Atemwegsinfektion (ohne Erregernachweis), Durchfall (Rotavirus, Kryptosporidien)							
3.	m	4	-	+	7,5 38,6	Pneumonie (Adenovirus, Pneumokokken), SIRS, HIV-Infektion	7,7 36,6	7,6 36,3	7,7 36,9	7,9 36,9	7,8 37,3		
4.	w	11	-	+	12,0 39,1	SIRS							
5.	m	7	+	+	10,2 40,2	SIRS							10,7 37,0
6.	m	4	-	+	5,1 38,9	SIRS							
7.	m	13	+	-	7,4 38,9	SIRS, Sichelzellkrankheit							
8.	m	8	-	+	9,0 38,1	Pneumonie (ohne Erregernachweis)							
9.	m	3	+	-	12,4 38,9	Untere Atemwegsinfektion (Influenza, Adenovirus, Pneumokokken), SIRS	12,1 38,0	12,6 37,2	13,3 37,0				
10.	w	2	+	+	11,2 38,2	Untere Atemwegsinfektion (Influenza, Pneumokokken)	10,6 37,0	11,2 36,0				11,6 37,6	11,4 36,9
11.	w	1	-	+	7,6 38,8	Pneumonie (ohne Erregernachweis), Diarrhoe (Salmonella spp.), SIRS, HIV-Infektion	6,5 37,8	6,9 38,2	6,5 36,0		6,3 36,9		
12.	w	13	+	-	5,8 39,0	Pneumonie (Mykoplasmen) Sepsis (Salmonella spp.), Sichelzellkrankheit => Kind verstorben							
13.	m	5	-	+	4,5 39,3	Diarrhoe (kein Erregernachweis), SIRS => Kind verstorben							
14.	m	8	+	-	11,3 38,0	keine weitere Symptomatik, Sichelzellkrankheit	11,1 38,2						
15.	m	4	+	-	12,3 38,9	Sepsis (Haemophilus Influenzae)	9,9 38,5	10,3 36,8	10,7 36,2	11,2 36,5	10,0 37,2	11,0 36,8	

7. Anhang

	♂ / ♀	Alter [in Jahren]	PCR	IgM	D 0	Symptomatik und weitere Diagnosen (neben Fieber)	D 1	D 2	D 3	D 5	D 7	F 1	F 2
16.	m	1	-	+	10,3 39,4	Oberer Atemwegsinfektion (Rhinovirus, Adenovirus, Mykoplasmen)	8,8 36,3						
17.	w	1	-	+	10,7 38,6	Atemwegs- und Harnwegsinfektion (je ohne Erregernachweis), SIRS							
18.	m	2	-	+	10,4 38,3	keine weitere Symptomatik/Diagnose	9,8 36,9	9,1 37,4					
19.	m	4	+	+	9,4 39,6	Pneumonie (Pneumokokken), SIRS, HIV-Infektion	10,1 38,2	8,5 36,8	9,6 37,2				
20.	w	5	+	-	12,5 39,5	Untere Atemwegsinfektion (Influenza, Pneumokokken)	12,9 37,0	13,9 37,3				12,8 36,7	
21.	w	6	+	-	12,4 39,8	Bauchschmerzen, SIRS	10,6 37,2	10,5 36,9				11,3 36,4	
22.	m	1	-	+	7,8 39,8	Atemwegsinfektion (Rhinovirus, Adenovirus, Pneumokokken), SIRS; Bluttransfusion im stationären Aufenthalt	6,1 36,8	5,1 37,2	5,4 37				
23.	m	3	+	-	8,9 38,2	SIRS	10,0 36,0					10,4 36,5	
24.	m	1	-	+	10,2 38,7	Pneumonie (Enterovirus), SIRS	10,6 36,3	10,0 36,4	10,9 36,3				
25.	m	0	+	-	12,2 40,3	Obere Atemwegsinfektion (Enterovirus)							12,3 36,1
26.	w	1	-	+	8,0 39,4	keine weitere Symptomatik/Diagnose							
27.	m	2	+	-	- 39,5	Diarrhoe (Salmonella spp.), SIRS							
28.	m	1	+	-	9,6 39,9	Untere Atemwegsinfektion (ohne Erregernachweis), SIRS							
29.	m	2	-	+	11,2 40,2	Obere Atemwegsinfektion (Enterovirus), SIRS						10,0 37	
30.	w	2	+	+	9,9 38,9	SIRS							

7. Anhang

Koinfektion mit B19V und <i>P. falciparum</i>													
Verlauf des Hb-Wertes [g/dl] und der Temperatur [°C]													
	♂ / ♀	Alter [in Jahren]	PCR	IgM	D 0	Symptomatik und weitere Diagnosen (neben Fieber)	D 1	D 2	D 3	D 5	D 7	F 1	F 2
1.	m	3	+	-	10,8 39,0	SIRS	9,5 37,6	10,0 36,8				9,8 36,6	
2.	w	4	+	-	12,7 39,2	Oberer Atemwegsinfekt (kein Erregernachweis), SIRS	12,2 37,0					9,7 37,1	11,5 37,1
3.	m	3	-	+	7,0 40,8	Unterer Atemwegsinfekt (Adenovirus, Humanes Coronavirus 1, Pneumokokken), HIV-Infektion							8,9 37,0
4.	m	6	+	-	11,6 39,3	SIRS							11,2 36,8
5.	w	3	-	+	7,6 39,8	keine weitere Symptomatik/Diagnose							
6.	w	8	-	+	10,9 39,5	SIRS							
7.	m	4	+	-	9,5 39,8	Unterer Atemwegsinfekt (Adeno- und Rhinovirus, Humanes Coronavirus OC34), SIRS	8,8 36,2					9,5 36,6	
8.	m	4	-	+	6,0 40,4	Harnwegsinfektion (kein Erregernachweis), SIRS, G6PD-Mangel, Bluttransfusion im stationären Aufenthalt	4,4 37,2	9,3 36,8	9,8 36,8				
9.	m	2	-	+	5,4 39,0	Unterer Atemwegsinfekt (Pneumokokken), SIRS Bluttransfusion im stationären Aufenthalt	7,2 36,9	7,4 36,2	8,0 35,9				
10.	m	11	-	+	10,8 38,3	keine weitere Symptomatik/Diagnose							
11.	w	3	-	+	7,5 39,2	SIRS Bluttransfusion im stationären Aufenthalt	6,1 37,9	5,5 37,0	9,5 36,5				
12.	w	6	+	-	8,4 40,1	Diarrhoe (kein Erregernachweis), SIRS							
13.	m	2	+	-	12,6 40,2	keine weitere Symptomatik/Diagnose							
14.	m	3	-	+	7,4 38,3	keine weitere Symptomatik/Diagnose	7,5 36,4					7,5 36,9	
15.	m	1	-	+	8,8 38,8	keine weitere Symptomatik/Diagnose	8,1 36,3						
16.	w	3	-	+	12,7 40,1	SIRS	8,9 39,5	7,8 37,0	7,7 37,0			8,7 37,1	10,3 36,8

7. Anhang

	♂ / ♀	Alter [in Jahren]	PCR	IgM	D 0	Symptomatik und weitere Diagnosen (neben Fieber)	D 1	D 2	D 3	D 5	D 7	F 1	F 2
17.	m	10	-	+	10,0 38,4	keine weitere Symptomatik/Diagnose	8,7 38,8	7,2 3,6				7,7 37,0	12,4 37,0
18.	w	1	+	-	11,1 39,3	Diarrhoe (Shigella/EIEC, Giardia lamblia), Harnwegsinfekt (ohne Erregernachweis), SIRS						9,6 36,9	10,2 38,9
19.	w	1	-	+	9,3 38,5	Unterer Atemwegsinfekt (kein Erregernachweis), Diarrhoe (Giardia lamblia), SIRS	8,5 36,2	9,4 36,0	9,2 35,9				
20.	m	1	+	-	9,8 39,3	Diarrhoe (kein Erregernachweis), SIRS	8,4 36,5						12,5 36,8
21.	m	1	+	-	8,1 38,6	Diarrhoe (kein Erregernachweis)	7,7 37,1						10,6 36,6
22.	w	8	-	+	10,1 38,9	Diarrhoe (Giardia lamblia), SIRS	9,6 37,1						15,1 36,0
23.	w	10	-	+	9,9 39,4	Harnwegsinfektion (kein Erregernachweis), SIRS	9,7 36,5					10,2 36,3	12,7 36,8
24.	m	2	-	+	11,6 38,0	keine weitere Symptomatik/Diagnose	9,7 39,8	9,3 36,8	9,3 36,7	9,1 36,5	9,2 36,9	10,3 37,3	
25.	w	5	-	+	8,6 38,7	Harnwegsinfektion (kein Erregernachweis)	8,5 37,1					10,0 37,0	11,5 37,0
26.	m	3	-	+	10,5 41,2	keine weitere Symptomatik/Diagnose							12,0 38,9
27.	m	7	-	+	11,6 39,5	Harnwegsinfektion (kein Erregernachweis)	9,2 36,7						11,3 37,8
28.	w	1	-	+	10,8 39,1	SIRS	10,5 36,7					10,2 36,2	
29.	m	9	+	-	11,3 39,8	Durchfall (kein Erregernachweis), SIRS	10,5 36,7						11,3 36,2
30.	m	2	+	-	8,1 38,5	keine weitere Symptomatik/Diagnose		7,3 36,3					11,5 36,4
31.	m	2	+	-	9,3 38,6	Atemwegsinfekt (Pneumokokken), SIRS							11,4 37,1
32.	m	3	+	-	8,2 38,3	keine weitere Symptomatik/Diagnose							
33.	m	5	+	-	10,6 39,7	SIRS						8,9 36,3	
34.	m	2	-	+	8,9 38,9	SIRS	7,7 37,0						
35.	w	3	-	+	8,8 39,5	Untere Atemwegsinfektion (Humanes Coronavirus OC34), Diarrhoe (ohne Erregernachweis), SIRS	7,0 36,9					14,1	10,3

7. Anhang

	♂ / ♀	Alter [in Jahren]	PCR	IgM	D 0	Symptomatik und weitere Diagnosen (neben Fieber)	D 1	D 2	D 3	D 5	D 7	F 1	F 2
36.	m	1	+	+	7,6 39,7	SIRS							
37.	m	2	+	-	7,9 39,8	SIRS							
38.	w	3	+	-	12,0 39,9	Pneumonie (Influenzavirus), SIRS							14,5 36,4
39.	w	6	-	+	11,1 40,1	Untere Atemwegsinfektion (Adenovirus), SIRS						9,1 37,0	11,1 36,9
40.	m	6	-	+	9,0 39,4	SIRS	8,1 38,5	7,7 36,2	6,9 36,8			11,1 37,0	18,4 37,0
41.	w	0	+	-	8,5 40,0	SIRS	7,5 37,1	6,6 36,0	7,0 36,9	7,2 36,6			9,3 36,6
42.	w		-	+	6,5 38,9	Atemwegsinfektion (kein Erregernachweis)							
43.	w		-	+	8,4 39,4	SIRS	7,2 36,9					7,6 37,9	
44.	m		+	-	11,4 39,5	SIRS							
45.	w		+	-	10,1 39,9	Harnwegsinfektion (kein Erregernachweis), SIRS							
46.	w		-	+	4,6 38,1	Pneumonie (Rhinovirus, Pneumokokken, Chlamydien), Harnwegsinfektion (kein Erregernachweis), SIRS, Bluttransfusion im stationären Aufenthalt	8,2 36,4	8,3 36,5	8,8 35,8				

	Page 3	<input type="checkbox"/> multiple choice <input type="radio"/> single choice <input type="checkbox"/> alphanumeric Grey sections to be completed by study nurse	Case Report Form Agogo Presbyterian Hospital – Children’s Ward	Visit Bar Code	1 st Visit Bar Code (from the very 1 st admission during the whole study)
---	-----------	--	---	----------------	--

J. Gastrointestinal condition

J01	Does/did the child have (last 24h)... vomiting		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	→ if yes, vomiting everything it takes		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	loose stool		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	→ if yes, how often	_ _	times	
	→ if yes, bloody or mucoid stool		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
J02	Inspection: Jaundice	<input type="radio"/> <1 month	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	Auscultation: Bowel sounds hyper peristaltic		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
J03	Palpation: Bowel sounds missing		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	Ascites		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	Abdominal muscular guarding		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	Abdominal mass		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	Abdominal pain		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	→ if yes, McBurney positive		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
J04	Spleen enlargement		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	Liver enlargement		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes

→ **Diagnostics**

	Condition	Test	nd	Pathologic
J11	within the last 24 h: if loose stool ≥2 times OR ≥1 time bloody or mucoid stool	<input type="checkbox"/> Stool sample	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
J12	if AST OR ALT is elevated	<input type="checkbox"/> Ultrasound	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
J13	if any question in J03 "yes"	<input type="checkbox"/> Ultrasound	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

K. Urinary tract condition

K01	Does/did the child have (last 24h)... difficulty in passing urine		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes	<input type="radio"/> unknown
	discomfort/ pain in passing urine		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes	<input type="radio"/> unknown
	increased frequency of urination		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes	<input type="radio"/> unknown
	abnormal colour or odour of urine		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes	<input type="radio"/> unknown
K02	Does the child have renal angle tenderness		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes	<input type="radio"/> <5 years

→ **Diagnostics**

	Condition	Test	nd	Pathologic
K11	always	<input checked="" type="checkbox"/> Urine stix	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
K13	if renal angle tenderness "yes"	<input type="checkbox"/> Ultrasound	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

L. Neurological condition

L01	Does/did the child have (last 24h)... convulsions or seizures		<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
L02	Does the child have...	a stiff neck	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
		a positive Kernig’s sign	<input type="radio"/> <1 year	<input type="radio"/> no
		fontanelle bulging	<input type="radio"/> >3 months	<input type="radio"/> no
			<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes

→ **Diagnostics**

	Condition	Test	nd	Pathologic
L11	if any question in L02 "yes" OR clinical suspicion of meningitis or encephalitis	<input type="checkbox"/> CSF culture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

M. Suspected diagnoses (on admission/OPD)

M01	Diagnoses:	_____ _____ _____
-----	------------	-------------------------

N. Chest X-ray report

N01	Date of chest X-ray:	_ _ / _ _ / _ _ (dd/mm/yy)	
N02	Pathological findings in X-ray ?	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	→ if yes, please specify:	_____ _____ _____	

O. Ultrasound report

O01	Date of ultrasound:	_ _ / _ _ / _ _ (dd/mm/yy)	
O02	Pathological findings in ultrasound?	<input type="radio"/> no	<input type="radio"/> yes
	→ if yes, please specify:	_____ _____ _____	

	Page 4	<input type="checkbox"/> multiple choice <input type="radio"/> single choice <input type="checkbox"/> alphanumeric Grey sections to be completed by study nurse	Case Report Form Agogo Presbyterian Hospital – Children’s Ward	Visit Bar Code	1 st Visit Bar Code (from the very 1 st admission during the whole study)
---	-----------	--	---	----------------	--

P. Diagnoses on discharge

P01	Date of discharge	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> (dd/mm/yy)
P02	1 st Diagnosis:	_____
	2 nd Diagnosis:	_____
	3 rd Diagnosis:	_____

Q. Outcome of diagnoses on discharge

Q01	<input type="radio"/> fully recovered without ongoing treatment <input type="radio"/> discharged with ongoing treatment <input type="radio"/> discharged with permanent disability/treatment <input type="radio"/> referred to another hospital <input type="radio"/> died <input type="radio"/> still hospitalized, but case was closed <input type="radio"/> absconded/lost to follow-up
-----	--

Remarks

_____ _____ _____ _____ _____ _____
--

R. Responsibilities

Study nurse who filled out the questionnaire:
 Initials Date / / (dd/mm/yy)

Doctor who filled in the questionnaire on child’s admission day:
 Initials Date / / (dd/mm/yy)

Doctor who filled in the questionnaire on child’s discharge day:
 Initials Date / / (dd/mm/yy)

Study nurse/ staff who performed the bedside tests:
 Initials Date / / (dd/mm/yy)

Study Doctor who checked the questionnaire:
 Initials Date / / (dd/mm/yy)

Data staff who entered the data in the database:
 Initials Date / / (dd/mm/yy)



ETHIK-KOMMISSION DER
ÄRZTEKAMMER
HAMBURG
Körperschaft des öffentlichen Rechts

Ärzttekammer Hamburg · Postfach 76 01 09 · 22051 Hamburg

Herrn
Prof. Dr. med. Jürgen May
Infectious Disease Epidemiology
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bernhard-Nocht-Str. 74
20359 Hamburg

24.03.2015
UKu

Bearb.-Nr.: PV4592 (Bitte stets angeben!)
Studientitel: Fever of Unknown Origin

Sehr geehrter Herr Kollege May,

den Eingang des Schreibens vom 12.02.2015 (Eingang am 13.02.2015) und Ihres Schreibens vom 24.02.2015 (Eingang am 02.03.2012) mit Ihrer Stellungnahme und den darin enthaltenen revidierten Studienunterlagen bestätigen wir hiermit. Die Bedenken der Ethik-Kommission sind nunmehr ausgeräumt.

Das Vorhaben entspricht den ethischen und fachrechtlichen Anforderungen. Die Ethik-Kommission stimmt dem Vorhaben zu. Dieses Votum umfasst nicht das Amendement. Für die positive Bewertung des Amendements wäre verfahrensmäßig unter anderem die Vorlage einer entsprechend erweiterten Elterninformation erforderlich.

Die Kommission weist darauf hin, dass die Verantwortung des Versuchsleiters für das Forschungsvorhaben und seine Durchführung durch das obige Votum der Kommission nicht berührt wird.

Für den Fall der Durchführung der Studie in Zentren anderer Kammerbereiche geht die Kommission von der Einbindung der lokal zuständigen Ethik-Kommission aus.

Die Ethik-Kommission bittet um Unterrichtung über alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die die Sicherheit der Studienteilnehmer gefährden, in Verbindung mit Ihrer Stellungnahme.

Die Kommission geht davon aus, dass die personenbezogenen Daten der Probanden / Patienten den datenschutzrechtlichen Vorschriften entsprechend behandelt werden.

Die Ethik-Kommission erwartet, dass ihr nach Abschluss des Projektes unaufgefordert ein Abschluss-Bericht übersandt wird (unter Angabe der Bearb.-Nr.), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Mit verbindlicher Empfehlung
im Auftrage der Kommission

Prof. Dr. med. R. Stahl
- Vorsitzender -

P.S. Die Ethik-Kommission arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts und Berufsrechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP.

Deutsche Apotheker- u. Ärztekammer
IBAN: DE71 3006 0601 0001 3461 13. BIC: DAAEED33XXX

Weidestraße 122 b · 22083 Hamburg
Telefon 040/20 22 99-240 · Fax 040/20 22 99-410
ethik@aekhh.de · www.aerztekammer-hamburg.de

Ärztammer Hamburg · Postfach 76 01 09 · 22051 Hamburg



ETHIK-KOMMISSION DER
ÄRZTEKAMMER
HAMBURG
Körperschaft des öffentlichen Rechts

Herrn
Prof. Dr. med. Jürgen May
Infectious Disease Epidemiology
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bernhard-Nocht-Str. 74
20359 Hamburg

27.04.2015

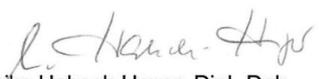
Bearb.-Nr.: PV4592 (Bitte stets angeben!)
Studientitel: Fever of Unknown Origin
Amendment vom 12.02.2014

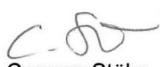
Sehr geehrter Herr Professor May,

den Eingang des Schreibens vom 12.02.2015 (Eingang am 13.02.2015) und 24.02.2015 (Eingang am 02.03.2012) mit Ihrer Stellungnahme und den darin enthaltenen revidierten Studienunterlagen, sowie Ihrem Schreiben vom 15.04.2015 bestätigen wir hiermit. Die Bedenken der Ethik-Kommission sind nunmehr ausgeräumt.

Die Ethik-Kommission hat die eingereichten Unterlagen geprüft und erhebt keine Einwände gegen eine Fortführung der Studie. Der Hinweis aus unserem Schreiben vom 24.03.2015 bezüglich des Amendments wurde umgesetzt. Das bereits erteilte positive Beratungsergebnis behält seine Gültigkeit.

Mit freundlichen Grüßen
im Auftrag der Kommission


Maike Habeck-Heyer, Dipl.-Dok.
Geschäftsführung


Carmen Stöhr
Projektmanagement

Deutsche Apotheker- u. Ärztekammer
IBAN: DE71 3006 0601 0001 3461 13. BIC: DAAEED33XXX

Weidestraße 122 b · 22083 Hamburg
Telefon 040/20 22 99-240 · Fax 040/20 22 99-410
ethik@aekeh.de · www.aerztekammer-hamburg.de



KWAME NKURUMAH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
COLLEGE OF HEALTH SCIENCES



SCHOOL OF MEDICAL SCIENCES / KOMFO ANOKYE TEACHING HOSPITAL
COMMITTEE ON HUMAN RESEARCH PUBLICATION AND ETHICS

Our Ref: CHRPE/AP/427/13

29th November, 2013.

Prof. Jurgen May
Bernhard-Nocht-Str. 74
F-20359 Hamburg
GERMANY.

Dear Sir,

LETTER OF APPROVAL

Protocol Title *“Assessment of Causes of Fever without Source (FWS).”*

Proposed Site: *Agogo Presbyterian Hospital (APH), Agogo, Asante Akim North, Kumasi
Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana,
Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNITM), Hamburg, Germany.*

Sponsor: *German Centre for Infectious Disease Research (DZIF), Inhoffenstraße 7, 38124
Braunschweig, Germany (Federal Ministry of Research and Education, Germany).*

Your submission to the Committee on Human Research, Publications and Ethics on the above named protocol refers.

The Committee reviewed the following documents:

- A memorandum of understanding between Agogo Presbyterian Hospital and Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR) to perform joint medical studies research.
- A completed CHRPE Application Form.
- Participant Information Leaflet and Consent Form.
- Research Proposal.
- Case Report Form.

The Committee has considered the ethical merit of your submission and approved the protocol. The approval is for a fixed period of one year, renewable annually thereafter. The Committee may however, suspend or withdraw ethical approval at anytime if your study is found to contravene the approved protocol.

Data gathered for the study should be used for the approved purposes only. Permission should be sought from the Committee if any amendment to the protocol or use, other than submitted, is made of your research data.

The Committee should be notified of the actual start date of the project and would expect a report on your study, annually or at close of the project, whichever one comes first. It should also be informed of any publication arising from the study.

Thank you Sir, for your application.

Yours faithfully,

Osomfuor Prof. Sir J. W. Acheampong MD, FWACP
Chairman



KWAME NKURUMAH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
COLLEGE OF HEALTH SCIENCES



SCHOOL OF MEDICAL SCIENCES / KOMFO ANOKYE TEACHING HOSPITAL
COMMITTEE ON HUMAN RESEARCH, PUBLICATION AND ETHICS

Our Ref: CHRPE/AP/218/14

23rd June, 2014.

Prof. Jurgen May
Bernhard-Nocht-Str. 74
F-20359 Hamburg
GERMANY.

Dear Sir,

LETTER OF APPROVAL

Protocol Amendment: *"Assessment of Causes of Fever without Source (FWS)."*

Proposed Site: Agogo Presbyterian Hospital (APH), Agogo, Asante Akim North, Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNITM), Hamburg, Germany.

Sponsor: German Centre for Infectious Disease Research (DZIF), Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany (Federal Ministry of Research and Education, Germany).

AMENDMENTS:

1. To include additional investigations during the hospital stay and follow-up after discharge to assess the association between server febrile illness and risk of post-hospital illness.
2. To add the investigation of healthy controls to estimate the pathogenetic potential of the organisms identified in children with fever without source.
3. To extend the project until 31st October, 2015.
4. To modify the following: Work Plan, Study Aim, Study Design, Inclusion and Exclusion Criteria for the Study Population, Items 2.5 and 2.6, Procedure to be Undertaken, Potential Direct Benefits to Participants and Sample Size (all on Application Form).

The Committee has considered the ethical merit of your proposed amendment and approved it.

Thank you Sir, for your application.

Yours faithfully,

Rev. Prof. John Appiah-Poku
Honorary Secretary
FOR: CHAIRMAN



OPEN

A cross-sectional study on risk factors for infection with Parvovirus B19 and the association with anaemia in a febrile paediatric population in Ghana

Wiebke Herr^{1,3,6}, Ralf Krumkamp^{1,6}, Benedikt Hogan¹, Denise Dekker¹, Kennedy Gyau², Ellis Owusu-Dabo², Nimako Sarpong², Anna Jaeger¹, Wibke Loag¹, Doris Winter¹, Charity Wiafe Akenten², Daniel Eibach¹, Helmut Fickenscher², Anna Eis-Hübinger⁴, Jürgen May^{1,6} & Benno Kreuels^{1,5,6}✉

Parvovirus B19 (B19V) occurs globally and can cause severe anaemia. The role of co-infections with *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) has been controversially discussed. The study aimed to determine prevalence and severity of B19V infection, and the effect of co-infections on the risk for anaemia. Between November 2013 and April 2015 a total of 1186 hospital visits of children with fever admitted to a hospital in Ghana were recorded. Malaria, B19V and additional diagnostics for fever causes were performed. Recent B19V infection was defined as PCR and/or IgM positivity. Risk factors for a B19V infection and for anaemia were analysed. The prevalence of anaemia was compared between children with/without B19V infection, stratified for the presence of malaria. B19V IgM/PCR was positive in 6.4% (n = 76; 40 IgM +, 30 PCR +, 6 IgM + and PCR +). Among the B19V cases 60.5% had a simultaneous *P. falciparum* infection. B19V IgM positivity but not PCR positivity was associated with moderate-severe anaemia (OR = 2.6; 95%-CI: 1.3–5.3; $P < 0.01$ vs. OR = 0.9; 95%-CI: 0.4–1.8; $P = 0.70$). *P. falciparum* and IgM positive B19V infection were independent risk factors for anaemia with no evidence of effect modification. Our data show a significant association between B19V infection, defined as IgM but not PCR positivity, and moderate-severe anaemia. A multiplicative effect of B19V and *P. falciparum* infection was not found.

Infections with *human parvovirus B19* (B19V) occur worldwide; seroprevalence data in paediatric populations in sub-Saharan Africa vary between 14% in Kenya (children < 6 years)¹ and more than 90% in a Nigerian population (children ≤ 2 years)². The virus mainly leads to asymptomatic infection and primarily in children can cause erythema infectiosum, a self-limiting viral exanthema. B19V infection can also result in severe anaemia, especially in immunocompromised individuals and patients with underlying erythropoietic disorders³. B19V can induce cell apoptosis and inhibition of erythropoiesis, lasting on average ten days through targeting of the erythroid progenitor cells, i.e. the burst forming unit erythroid (BFU-E) and colony forming unit erythroid (CFU-E)^{4,5}. While healthy individuals can compensate these temporary changes due to the long lifespan of erythrocytes⁶, vulnerable subgroups can suffer from serious illness as transient aplastic crisis and chronic anaemia⁷.

¹Department of Infectious Disease Epidemiology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, 20359 Hamburg, Germany. ²Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, College of Health Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana. ³Institute for Infection Medicine, Christian-Albrecht University of Kiel, University Medical Center Schleswig-Holstein, 24105 Kiel, Germany. ⁴University of Bonn Medical Center, Institute of Virology, 53127 Bonn, Germany. ⁵Department of Tropical Medicine, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine and I. Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. ⁶DZIF-German Center for Infection Research, Partnersite Hamburg-Lübeck-Borstel, 38124 Braunschweig, Germany. ✉email: b.kreuels@uke.de

One such risk group is children in malaria-endemic areas. In this population, *P. falciparum*-malaria itself leads to anaemia via different pathogenetic mechanisms. First, intraerythrocytic parasite-growth causes acute haemolysis and decreased cell flexibility, followed by increased removal by the reticuloendothelial system in the spleen⁸. This effect can also be observed in non-affected erythrocytes⁹. In the course of the disease, especially in recurrent infection, hypersplenism may develop, which reinforces this selection mechanism. Second, autoimmune haemolytic factors can increase anaemia⁸. Lastly, cytokine responses mediate malfunctioning erythropoiesis, leading to a lack of reticulocytes and general dyserythropoiesis⁹.

Research on B19V infection in children from tropical areas has focused on anaemic study populations with contradictory conclusions about frequencies and clinical significance. In studies from Papua New Guinea, Kenya, Ghana and Tanzania B19V infection was described as a major risk factor for the development of anaemia^{1,5,10–12}. A study from Niger rather suggests a temporary significance during viral outbreaks². In contrast data from Malawi do not show any correlation between anaemia and the B19V infection¹³. Similarly, conflicting data have been published about the influence of co-infections of B19V and *P. falciparum* on the development and frequency of anaemia^{1,11,14}.

The aim of this study was to determine the prevalence of B19V infection, its association with anaemia, and the effect of B19V co-infection with the malaria parasite *P. falciparum* in febrile hospitalized children.

Methods

Patients and clinical procedures. Between November 2013 and April 2015 all children with fever (tympanic temperature ≥ 38.0 °C) between four weeks and ≤ 15 years of age, admitted to Agogo Presbyterian Hospital in Ghana were prospectively recruited. Repeated inclusion was possible at least 30 days after initial recruitment. If a child presented twice with a positive B19V PCR, only the first visit was included in the analysis as we aimed at investigating acute B19V infections.

Depending on the presented symptoms blood, stool, urine, respiratory and/or cerebrospinal fluid samples were collected and screened for parasitic, viral and bacterial infection by microscopy, culture or PCR. A detailed description of the diagnostic evaluation has previously been published¹⁵.

Laboratory analysis and case definitions. Thin and thick blood films were examined for malaria parasites, counting parasite number and species determination. Clinical malaria due to *P. falciparum* was defined as a parasite-density of asexual *P. falciparum* stages $> 12,000/\mu\text{l}$ and fever ≥ 38.0 °C. The density cut-off was introduced using data of a control group from the study area in order to avoid overdiagnosis^{15,16}.

For B19V diagnostics, serum collected on the day of admission was tested both by B19V qualitative real-time PCR and IgM- and IgG-antibody assays. The PCR followed an in-house protocol established under accreditation conditions according to EN-DIN-ISO-15189 at the Institute for Infection Medicine, University of Kiel, Germany. The sensitivity was 300 B19V genome copies/ml serum and the PCR primer and probe sequences targeted conserved sequences of all three genotypes. DNA was extracted with the RTP Pathogen Kit (STRATEC Molecular, Birkenfeld, Germany) from 100 μl serum after addition of lambda-phage DNA (Thermo Scientific SD0011, Waltham, MA, USA) as internal extraction and inhibition control. Nucleic acids were collected in 100 μl eluate. Five μl DNA eluate were added to 7.5 μl LC 480 Probe Master (Cat. No: 04707 494 001; Roche, Mannheim, Germany), 0.5 μl LC uracil-DNA glycosylase (Roche), and oligonucleotide primers and probes each at 1.0 pM concentration leading to total reaction volume of 15 μl . The PCR was performed on a Lightcycler 480 instrument (Roche) with the following amplification procedure: initially 40 °C for 10 min for uracil glycosylase treatment, the denaturation at 95 °C for 10 min followed by 45 amplification cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, and terminating in 40 °C for 30 s. The B19V-specific primers and probe targeted the VP2 region: B19vp2F (TGG-CCC-ATT-TTC-AAG-GAA-GT), B19vp2r (CTG-AAG-TCA-TGC-TTG-GGT-ATT-TTT-C), and B19vp2TM (6FAM-CCG-GAA-GTT-CCC-GCT-TAC-AAC-BBQ). The internal lambda-phage DNA control was detected by the following primers and probe: Lambda-F (ATG-CCA-CGT-AAG-CGA-AAC-A), Lambda-R (GCA-TAA-ACG-AAG-CAG-TCG-AGT), and LAM-TM2 (YAK-ACC-TTA-CCG-AAA-TCG-GTA-CGG-ATA-CCG-BBQ). Each PCR was run together with a negative and positive control (TIB Molbiol, Berlin, Germany).

Serum samples were tested with IgM- and IgG-antibody assays (LIAISON Biotrin, Parvovirus B19 IgG, IgM ELISA, DiaSorin, Italy; recombinant VP2 expressed in baculovirus, qualitative assay). All IgM positive samples were retested with a second IgM-antibody assay (*recomWell* Parvovirus B19 IgM, Mikrogen, Neuried, Germany; recombinant VP1 and VP2, qualitative and quantitative assay). Only samples with positive results in both tests were considered positive for IgM.

Both, PCR or IgM positivity, were used as an indicator for recent B19V infection. For further analysis, B19V infections were divided into two groups (PCR positive and IgM positive). Six children were positive for both PCR and IgM and counted in both groups.

Blood count analysis on admission was performed with Sysmex KX-21N (Automated Hematology Analyzer, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany). Anaemia cut-offs were used to differentiate between mild, moderate and severe anaemia among different age groups according to the World Health Organization (WHO) classification¹⁷ (Table 1). Anaemia was categorised into two groups: none or mild, and moderate to severe. This is in view of the limited clinical relevance of mild anaemia and the lack of association observed between B19V and mild anaemia (data not shown).

Statistical analysis. Statistical analysis were performed using STATA/SE v14 (StataCorp LLC, Texas, USA). Patient data were summarized using descriptive statistics. Categorical variables were displayed as percentages while continuous data were summarized as median and interquartile range (IQR). Comparisons of the median of non-parametric data among subgroups of the study were made using the median-test, as we anticipated low

Age	No anaemia Hb (g/dl)	Anaemia Hb (g/dl)		
		Mild	Moderate	Severe
1–59 months	≥ 11	10.0–10.9	7.0–9.9	<7
5–11 years	≥ 11.5	11.0–11.4	8.0–10.9	<8
12–14 years	≥ 12.0	11.0–11.9	8.0–10.9	<8

Table 1. Classification of anaemia.

numbers of individuals in each group. Bivariate comparisons for categorical data were performed using the χ^2 -Test and Fisher's exact test as appropriate. Missing values were excluded from the analysis, which led to differing denominators in some analyses.

A socioeconomic score was constructed from nine indicator variables using principal component analysis (PCA) based on a tetrachoric correlation matrix. Subsequently, a binary variable on socioeconomic status was created by dividing the study group into two equally sized groups¹⁸. The nine indicator variables were: (1) membership in national health insurance, (2) subjective assessment of the financial situation of the family, (3) cooking inside/outside the house, (4) type of water supply, availability of (5) electricity and (6) window screens, ownership of (7) mobile phone, (8) television and (9) fridge.

To assess factors associated with B19V infection (defined as IgM or PCR positivity) a logistic regression analysis was performed. All variables with $P \leq 0.1$ in the univariate model were included in a multivariate logistic regression model. Variables were then removed using a stepwise backwards selection method based on a likelihood-ratio test between the models including and excluding the respective variable, using $P = 0.05$ as the cut-off.

To detect a possible association between B19V infection and anaemia univariate logistic regression analysis was performed, distinguishing between the three subgroups of B19V IgM positive, B19V PCR positive and B19V IgM or PCR positive cases. Other factors putatively associated with anaemia (sex, age, siblings, ethnicity, socioeconomic status, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, sickle cell disease, *P. falciparum* infection) were assessed for an association in univariate logistic regression models. To adjust for possible confounding all variables were included in multivariate models with B19V IgM, B19V PCR and B19V IgM/PCR respectively. In addition all possible risk factors were analysed in uni- and multivariate linear regression models using the haemoglobin concentration (Hb) as a continuous variable as the outcome variable.

Possible effect-modification between B19V and *P. falciparum* was assessed by adding an interaction term to the full model. A likelihood-ratio test for interaction comparing the models was performed.

Ethical approval. The Committee on Human Research, Publications and Ethics, School of Medical Science, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana and the Ethics Committee of the Medical Association Hamburg, Germany approved the study. After informing about the study and procedures written informed consent was obtained from the guardian or parent prior to recruitment. The study was performed in accordance with all relevant national and international guidelines including the declaration of Helsinki.

Results

Study population. From November 2013 to April 2015, 1,238 hospital visits by children with fever ($\geq 38.0^\circ\text{C}$) were recruited to the study. Due to missing B19V PCR or serological results 49 visits were excluded. A further three visits were excluded as these children presented with positive B19V PCR for a second time. Therefore, a total of 1186 visits by 1108 children were included in the analysis. Of the 1108 children, 68 were recruited to the study more than once. The median age was two years (IQR 1–4 years), 54.4% of the children were male.

IgM was positive in 155/1186 (13.1%) participants by the Biotrin assay, of which a total of 46 samples (29.7%, 46/155) were confirmed positive using the Mikrogen assay. Of these 46 samples, six were also PCR positive. A further 30 samples were PCR positive alone, resulting in 76 samples (6.4%) positive for B19V in IgM and/or PCR. Among the 36 PCR positive samples, only three were IgG negative and six were positive for IgM and IgG.

Due to limited serum volume, not all negative samples could be tested with both assays. Results in a subset of initially (Biotrin assay) B19V IgM negative samples tested with both assays were in agreement in 99.2% (127/128).

Among patients with *P. falciparum* infection, more samples were IgM positive by the Biotrin assay (18.0% vs. 8.3%, $P < 0.01$). This was not the case for the Mikrogen assay (17.2% vs. 15.8%, $P = 0.76$). Index values of Biotrin assay and the associated Mikrogen result are displayed in the suppl. Figure 1. The proportion of confirmed positive results increased with higher sample to cut-off ratio (S/CO) values in the initial Biotrin assay result.

Among 76 children with B19V infection, 46 (60.5%) were co-infected with *P. falciparum* however in 92.1% (538/584) of children with *P. falciparum*, PCR and IgM were negative for B19V.

The majority of all B19V infections (67.1%, 51/76) occurred during the first eight months of recruitment, suggesting a cluster between November 2013 to June 2014 (suppl. Figures 2 and 3). Among children 13 months and older, B19V IgG-antibodies (Biotrin assay) were detected in 151 samples, resulting in a seroprevalence of 17.0% (151/889).

Risk factors for B19V infection. Frequencies and associations of possible risk factors for B19V infection are shown in Table 2. Univariate logistic regression analysis showed weak evidence for an association between B19V infection and ethnicity, with a higher risk in children from ethnic groups originating in the North of Ghana (OR = 1.5; 95%-CI: 0.9–2.4; $P = 0.09$). Also children with a low socioeconomic status were more likely

	B19V infection (IgM+ and/or PCR+) ^a	No B19V infection	Total	Univariate analysis Odds ratio (95%-CI)	P ^b	Multivariate analysis ^c Odds ratio (95%-CI)	P ^b
Number of cases	76 (6.4)	1,110 (93.6)	1,186				
Sex							
Female	29 (38.2)	512 (46.1)	541 (45.6)	1			
Male	47 (61.8)	598 (53.9)	645 (54.4)	1.4 (0.9–2.2)	0.17	–	
Age							
Median in months (IQR)	37.5 (24–62.5)	29 (15–52)	29 (15–53)				
<5 years	53 (69.7)	862 (77.7)	915 (77.1)	1			
≥5 years	23 (30.3)	248 (22.3)	271 (22.9)	1.5 (0.9–2.5)	0.12	–	
Siblings^d							
None	9 (11.8)	251 (22.6)	260 (21.9)	1			
1–2	33 (43.4)	460 (41.4)	493 (41.6)	2.0 (0.9–4.2)	0.05		
3–12	33 (43.4)	384 (34.6)	417 (35.2)	2.4 (1.1–5.1)		–	
Socioeconomic status^{d,e}							
High	26 (34.2)	560 (50.4)	586 (49.4)	1		1	
Low	50 (65.8)	534 (48.1)	584 (49.2)	2.0 (1.2–3.3)	<0.01	2.1 (1.3–3.4)	<0.01
Ethnicity^f							
Akan	37 (48.7)	630 (56.8)	667 (56.2)	1			
Northerners	39 (51.3)	444 (40.0)	483 (40.7)	1.5 (0.9–2.4)	0.09	–	
G6PD							
No	75 (98.7)	1065 (95.9)	1140 (96.1)	1			
Yes	1 (1.3)	45 (4.1)	46 (3.9)	0.3 (0.0–2.6)	0.17	–	
Sickle cell disease							
No	73 (96.1)	1074 (96.8)	1147 (96.7)	1			
Yes	3 (3.9)	36 (3.2)	39 (3.3)	1.2 (0.4–4.1)	0.75	–	

Table 2. Risk factors for B19V infection. ^aAll samples with concordant positive serological results in Biotrin- and Mikrogen-assays were considered positive for IgM, all samples reactive by a qualitative PCR assay were considered PCR-positive. Six cases had a positive IgM and PCR result. ^bComparison for dichotomous or nominal data was performed using a logistic regression model. ^cAfter stepwise backwards selection based on a likelihood ratio test between the models the socioeconomic status was the only remaining variable and risk factor. ^dMissing data not listed (number of missing data for siblings and socioeconomic score n = 16, ethnicity n = 5; in addition 31 children belonged to other ethnicities). ^eThe socioeconomic score was constructed using nine indicator variables (membership of national health insurance, subjective assessment of the financial situation of the family, cooking inside/outside the house, type of water supply, availability of electricity and window screens, ownership of mobile phone, television and fridge) that were included into a tetrachoric correlation and principal component analysis (PCA). Subsequently, a binary variable on socioeconomic status was created in further risk factor analysis by dividing the population into two groups.

to be infected with B19V (OR=2.0; 95%-CI: 1.2–3.3; $P<0.01$), as well as children with siblings (1–2 siblings: OR=2.0; 95%-CI: 0.9–4.2; 3–12 siblings: OR=2.4; 95%-CI: 1.1–5.1; $P=0.05$). There was no evidence for an association with B19V and sex, age, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency or sickle cell disease. In multivariate analysis B19V infection only remained associated with a low socioeconomic status (OR=2.1; 95%-CI: 1.3–3.4; $P<0.01$).

Clinical presentation of B19V infection. There was no specific symptom that could be used to clinically diagnose a B19V infection. A rash only occurred in two patients (2.6%). As fever was an inclusion criterion to the study, all children presented with this symptom. Common symptoms in patients with B19V infection were vomiting (44.7%), cough (21.1%) and diarrhoea (17.1%). Children with B19V infection had a similar admission duration as children without markers of B19V infection (median=2; IQR: 1–3 vs. median=2; IQR: 2–4 days respectively; $P=0.01$). There were no relevant differences in clinical presentation between the two groups of B19V infection (IgM positive and PCR positive, data not shown). Symptom frequencies and anaemia prevalence are summarized in Table 3.

Risk factors for anaemia. Overall prevalence of anaemia in the study population was 67.8% (803/1184; two cases without Hb-value). Of these 17.3% (n=139) had severe anaemia, 57.2% (n=459) had moderate anaemia and 25.5% (n=205) mild anaemia. For risk factor analysis cases of moderate and severe anaemia were compared to the group of children with mild and no anaemia. By univariate analysis, associations between

	No B19V infection (%)	B19V infection (IgM and/or PCR+) (%)
Total	1110 (93.6)	76 (6.4)
Vomiting	437 (39.4)	34 (44.7)
Cough	285 (25.7)	16 (21.1)
Diarrhoea	189 (17.0)	13 (17.1)
Spleen enlargement	98 (8.8) ^a	10 (13.2)
Respiratory distress	106 (9.6) ^a	9 (11.8)
Liver enlargement	76 (6.9) ^a	7 (9.2)
Abdominal pain	56 (5.1)	4 (5.3)
Generalized lymphadenopathy	3 (0.3) ^a	2 (2.7) ^a
Rash	24 (2.2) ^a	2 (2.6)
Neurological symptoms	32 (2.9)	0
Body temperature (°C)		
Median (IQR)	39 (38.5–39.6)	39.3 (38.7–39.8)
Duration of admission (days)		
Median (IQR)	2 (2–4)	2 (1–3)
Anaemia^b		
Severe	131 (11.8)	8 (10.5)
Moderate	419 (37.8)	40 (52.6)
Mild	195 (17.6)	10 (13.2)
No anaemia	364 (32.8)	17 (22.4)

Table 3. Clinical details of children with B19V infection. ^aMissing data (No B19V infection: spleen enlargement n = 12, resp. distress n = 9, liver enlargement n = 11, gen. lymphadenopathy n = 5, rash n = 1; B19V infection: gen. lymphadenopathy n = 1). ^bHb-value available for 1184 cases.

moderate-severe anaemia were observed among children with sickle cell disease (OR = 4.7; 95%-CI: 2.0–10.7; $P < 0.01$), glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (OR = 3.7; 95%-CI: 1.8–7.5; $P < 0.01$), children with low socioeconomic status (OR = 3.1; 95%-CI: 2.4–3.9; $P < 0.01$) and children from the north of Ghana relative to children from the Akan ethnicity (OR = 2.8; 95%-CI: 2.2–3.5; $P < 0.01$). Infection with *P. falciparum* increased risk for moderate-severe anaemia with an OR of 1.9 (95%-CI: 1.5–2.4; $P < 0.01$). These effect estimates changed slightly in the multivariate models, but the interpretation of the results remained similar (Table 4).

Among the children with B19V infection 64.0% (48/75) had moderate-severe anaemia. In univariate association the odds ratio for moderate-severe anaemia among those with any marker of B19V infection was of 1.8 (95%-CI: 1.1–2.9; $P = 0.02$), the association weakened in multivariate analysis (OR: 1.5; 95%-CI: 0.9–2.5; $P = 0.14$). More children with a positive IgM result had moderate-severe anaemia relative to children with a positive PCR result (71.7% vs. 57.1%). PCR positivity was not associated with a higher risk for moderate-severe anaemia (OR: 1.3; 95%-CI: 0.7–2.6; $P = 0.43$), while children who were IgM positive had an increased risk for moderate-severe anaemia (OR: 2.6, 95%-CI: 1.3–4.9; $P < 0.01$). In the multivariate analysis with adjustment for all parameters found to be associated with moderate-severe anaemia, IgM positivity and not PCR positivity remained associated with moderate-severe anaemia (IgM: OR: 2.6, 95%-CI: 1.3–5.3; $P < 0.01$; PCR: OR: 0.9; 95%-CI: 0.4–1.8; $P = 0.70$). Similarly, the median Hb-level was lower (9.0 g/dl vs. 10.1 g/dl; $P = 0.08$). Linear regression models using the Hb as a continuous variable led to similar results (suppl. Table 1).

B19V, *P. falciparum* and anaemia. As illustrated above, both *P. falciparum* infection and B19V infection, defined as IgM positivity, were independent risk factors for moderate-severe anaemia while there was no evidence for an association between B19V PCR positivity and moderate-severe anaemia (Table 4). The likelihood-ratio-test between models with and without an interaction term between B19V and *P. falciparum* did not support the hypothesis of effect modification between the two (IgM: $P = 0.91$; PCR: $P = 0.79$).

Discussion

Studies on the clinical relevance of B19V infection in malaria-endemic areas and the role of B19V and *P. falciparum* co-infections in severe anaemia show contradictory results^{12,5,6,10–14}. In our study among febrile, hospitalized children in Ghana, an association was observed between moderate-severe anaemia and B19V IgM positivity but not with B19V PCR positivity. In addition, *P. falciparum* and IgM positive B19V infection were independent risk factors for moderate-severe anaemia with no evidence of effect modification.

B19V affects erythropoiesis by its replication in erythroid progenitor cells and thereby may cause anaemia⁴. While early studies on B19V infection and anaemia in malaria-endemic areas showed no association with anaemia^{2,13}, more recent studies found the viral infection to be an important risk factor. In studies from Papua New Guinea and Ghana B19V infection was a major risk factor for anaemia^{5,10,11}.

As the definition of B19V infection varies between studies, the comparison of the results is challenging. While Wildig et al. defined the B19V infection as presence of IgM and DNA⁵, Manning et al. required positivity of at

	Cases with moderate and severe anaemia (%)	Univariate analysis Odds ratio (95% CI)	P ^a	Model with B19V (PCR or IgM) Adjusted analysis ^b Odds ratio (95% CI)	P ^a	Model with B19V-IgM Adjusted analysis ^b Odds ratio (95% CI)	P ^a	Model with B19V-PCR Adjusted analysis ^b Odds ratio (95% CI)	P ^a
Total	598 (50.5)								
Sex									
Female	257 (47.6)	1		1		1		1	
Male	341 (52.9)	1.2 (1.0–1.6)	0.07	1.3 (1.0–1.6)	0.07	1.3 (1.0–1.6)	0.07	1.3 (1.0–1.6)	0.06
Age									
< 5 years	458 (50.2)	1		1		1		1	
≥ 5 years	140 (51.7)	1.1 (0.8–1.4)	0.70	1.1 (0.8–1.4)	0.73	1.1 (0.8–1.4)	0.71	1.1 (0.8–1.5)	0.70
Siblings									
None	119 (20.1)	1		1		1		1	
1–2	256 (43.2)	1.3 (0.9–1.7)	0.20	1.1 (0.8–1.5)	0.83	1.1 (0.8–1.5)	0.90	1.1 (0.8–1.5)	0.80
3–12	217 (36.7)	1.3 (1.0–1.8)		1.0 (0.7–1.5)		1.0 (0.7–1.4)		1.0 (0.7–1.5)	
Ethnicity									
Akan	265 (39.8)	1		1		1		1	
Northeners	312 (64.7)	2.8 (2.2–3.5)	<0.01	1.8 (1.4–2.5)	<0.01	1.8 (1.4–2.5)	<0.01	1.8 (1.4–2.5)	<0.01
Socioeconomic status^c									
High	216 (36.9)	1		1		1		1	
Low	376 (64.5)	3.1 (2.4–3.9)	<0.01	2.1 (1.5–2.8)	<0.01	2.1 (1.5–2.8)	<0.01	2.1 (1.6–2.8)	<0.01
G6PD									
No	562 (49.4)	1		1		1		1	
Yes	36 (78.3)	3.7 (1.8–7.5)	<0.01	2.4 (1.1–5.0)	0.03	2.3 (1.1–5.0)	0.03	2.3 (1.1–4.9)	0.03
Sickle cell disease									
No	566 (49.4)	1		1		1		1	
Yes	32 (82.1)	4.7 (2.0–10.7)	<0.01	6.8 (2.9–16.3)	<0.01	7.1 (3.0–17.0)	<0.01	6.9 (2.9–16.6)	<0.01
<i>P. falciparum</i>^d									
No	256 (42.6)	1		1		1		1	
Yes	342 (58.7)	1.9 (1.5–2.4)	<0.01	1.9 (1.4–2.4)	<0.01	1.9 (1.5–2.4)	<0.01	1.9 (1.5–2.4)	<0.01
Parvovirus B19									
Negative	550 (49.6)	1		1		–		–	
IgM or PCR pos	48 (64.0)	1.8 (1.1–2.9)	0.02	1.5 (0.9–2.5)	0.14	–		–	
IgM^e									
Negative	565 (49.7)	1		–		1		–	
Positive	33 (71.7)	2.6 (1.3–4.9)	<0.01	–		2.6 (1.3–5.3)	<0.01	–	
PCR^e									
Negative	578 (50.3)	1		–		–		1	
Positive	20 (57.1)	1.3 (0.7–2.6)	0.43	–		–		0.9 (0.4–1.8)	0.70

Table 4. Risk factors for anaemia, univariate and adjusted analysis. ^aComparison for dichotomous or nominal data was performed using a logistic regression model. ^bAdjusted for all other variables in the table. ^cThe socioeconomic score was constructed using nine indicator variables (membership of national health insurance, subjective assessment of the financial situation of the family, cooking inside/outside the house, type of water supply, availability of electricity and window screens, ownership of mobile phone, television and fridge) that were included into a tetrachoric correlation and principal component analysis (PCA). Subsequently, a binary variable on socioeconomic status was created in further risk factor analysis by dividing the population into two groups. ^dClinical malaria with *P. falciparum* was defined as a parasite-density of *P. falciparum* > 12,000/μl and fever ≥ 38.0 °C. ^eAll samples with concordant positive serological results in Biotrin- and Mikrogen-assays were considered positive for IgM, all samples reactive by a qualitative PCR assay were considered PCR positive. Six cases had a positive IgM and PCR.

least one of the two markers¹⁰ and Duedu et al. tested the samples only by PCR¹¹. Toan et al. conducted serological assays only in PCR positive samples¹⁴ and Tizeba et al. performed only IgM and IgG testing¹². Table 2 in the supplement provides an overview of the cited studies, their study populations, B19V definitions and performed laboratory analysis.

In contrast to our findings, Duedu et al. found a higher risk for severe anaemia in already mildly anaemic children if B19V PCR was positive (OR = 4.1; 95% CI: 0.82–20.28) however the number of B19V infections was too low to draw robust conclusions¹¹. Nevertheless our study accords with recently published data from Tanzania where an association between anaemia and B19V (defined as IgM positivity) was found¹². Similarly, a study from Papua New Guinea found an association between severe anaemia and B19V infection in the subgroup of

individuals with positive IgM, but not in the subgroup of children with positive PCR only⁵. In data from Kenya no association between severe anaemia and B19V IgM or IgG or DNA positivity was found, but an association between high IgM-levels and severe anaemia was shown¹. The clear association of IgM positivity and anaemia would fit to the temporal coincidence of haemoglobin drop and high IgM levels during the natural course of B19V infection, when DNA-levels may already have dropped¹. On the other hand, in some patients with B19V infection low amounts of B19V DNA may be detected in blood for years after acute infection^{19,20}. In addition, remnant B19V DNA strands may cause positive PCR results²¹. Therefore a positive PCR result might not unequivocally indicate an acute infection leading to a possible underestimation of the risk for anaemia in B19V infections. In our population 15 children with positive B19V PCR did not have moderate or severe anaemia. These cases could represent persistent PCR positive results following past infection. In support of this, 33 of 36 PCR positive samples had additional IgG-antibodies, possibly indicating past infection. Concomitant IgG and IgM were identified in six PCR positive cases. Differentiation of active B19V infection and detection of B19V viral DNA indicating past infection is challenging.

Our study highlights diagnostic difficulties that may be common in several viral infections in sub-Saharan Africa. Commonly used PCRs may not detect the genotype 3 of B19V, that is characterized by higher genome diversity²² and predominantly found in sub-Saharan-Africa²⁰. Our PCR was developed using all available information about genome diversity, but not previously validated in sub-Saharan-African populations. Therefore, non-detection cannot be fully excluded and could contribute to the low number of patients that were positive for both PCR and IgM in our study.

We found B19V and *P. falciparum* to be independent risk factors for anaemia, as described before⁵. Our data showed no effect modification between simultaneous B19V and *P. falciparum* infection. Previous data from Ghana described co-infections as a risk factor for severe anaemia with an OR of 2.2 (95%-CI: 0.4–12.5), however, the confidence interval around this estimate was wide due to a small sample size (6/234)¹¹. Toan et al. found B19V to decrease hemoglobin levels in children with mild but not in children with severe *P. falciparum*-malaria. The authors did not provide explanations for this finding¹⁴. The most recent study from Tanzania described a difference of median Hb between small groups of children with co-infections (n = 12) and *P. falciparum* mono-infection (n = 34) (4.6 vs. 7.1 g/dl)¹².

In our study 67.1% of B19V infections occurred during the first eight months of recruitment. The first publication on B19V infection reported a high prevalence in the first study period, followed by a rather low prevalence during the second observation time, suggesting an epidemic outbreak². While Wildig et al. found no temporal clustering during the four years of sample collection in Papua New Guinea⁵, they described an increased prevalence of B19V IgM in one of five years of analysis in Kenya¹. Seasonal occurrence might partly explain different findings and prevalence of B19V. Furthermore varying inclusion criteria of the studies (anaemia vs. *P. falciparum* infection vs. febrile infection) and age distribution in the study populations should be considered.

The role of laboratory diagnostics for acute B19V infection have been discussed extensively elsewhere^{23,24}. The testing of both, serology and PCR, has been recommended, as each can be the only marker of recently acquired or acute infection²⁵.

We found high discordancy between the IgM results obtained by the Biotrin and Mikrogen assays that has not been described before. Former systematic comparisons of these assays revealed no relevant differences^{26,27}, but were performed in different settings. In our study, false positive IgM results could have been triggered by the polyclonal B-cell-stimulation during *P. falciparum* infection²⁸. While 18.0% of the children with *P. falciparum* infection were IgM positive with the Biotrin assay, the percentage among children without *P. falciparum* infection was only 8.3% ($P < 0.01$). Also, false positive cross-reaction during measles, rubella virus, EBV or HSV infection or other infections have been described and cannot be ruled out in our study population²² but probably will not account for the great difference between the two assays. On the other hand the Mikrogen assay could be less sensitive in the studied setting, but existing literature provides no evidence of differing sensitivity^{26,27} and it is unclear how a lower sensitivity specifically in this setting could be explained.

In the cases of HCV infection in Africa, high rates of discordancy between serological and molecular assays have been described. The reason for this remains unclear (false positive serological results vs. non-detection of genotype differences of the RNA assay), but may indicate a high unspecific background activity in African populations leading to unreliability of some serological tests²⁹.

The combination of PCR and serological testing is broadly established for the diagnosis of acute B19V infection³⁰. However, we illustrated several aspects of diagnostic uncertainty. To improve B19V diagnostics the viral load can be determined by quantitative PCR and it may be possible to develop cut-off values suggestive of acute, past or rather persistent infection³¹. IgG-avidity-testing may also help to diagnose an acute infection³². Furthermore, our data indicate that the currently available commercial antibody-assays and PCR may not be sufficiently validated for testing in African population and further validation is warranted.

Due to our study design only children with fever at admission were included, while children with intake of antipyretics and therefore presentation without fever as well as anaemic children without fever were not included. This may have led to exclusion of children with B19V infection possibly with anaemia but no fever leading to an underestimation of the effect B19V has on the risk of anaemia. Due to limited resources iron deficiency, known as a major contributor to anaemia in children in low-income settings was not assessed. Probably all children were in an inflammatory status, therefore inflammation could not be studied as a risk factor for anaemia. Despite a large number of study participants only 76 children had a B19V infection resulting in smaller subgroups with anaemia and/or simultaneous *P. falciparum* infection, limiting the available power to perform subgroup analysis.

Conclusion

Our data show a significant association between B19V infection and moderate-severe anaemia in febrile hospitalized children in Ghana. We can confirm the previously described significance of *P. falciparum* infection for anaemia in this context, while a multiplicative effect of B19V and *P. falciparum* infection could not be found. Prior to further investigation existing assays should be validated in sub-Saharan Africa, tested for sensitivity of detection of different viral genotypes and possible interaction in malaria-endemic areas.

Data availability

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 22 May 2020; Accepted: 2 September 2020

Published online: 24 September 2020

References

- Wildig, J. *et al.* Parvovirus B19 infection and severe anaemia in Kenyan children: A retrospective case control study. *BMC Infect. Dis.* **10** (2010).
- Jones, P. H., Pickett, L. C., Anderson, M. J. & Pasvol, G. Human parvovirus infection in children and severe anaemia in an area endemic for malaria. *J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 67–70 (1990).
- Qiu, J., Söderlund-Venermo, M. & Young, N. S. Human parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 43–113 (2017).
- Morinet, F., Lereux-Ville, M., Pillet, S. & Fichelson, S. Concise review: Anemia caused by viruses. *Stem Cells* **29**, 1656–1660 (2011).
- Wildig, J. *et al.* Parvovirus B19 infection contributes to severe anemia in young children in Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.* **194**, 146–153 (2006).
- Pasvol, G. Parvovirus infection, malaria, and anemia in the tropics—A new hidden enemy?. *J. Infect. Dis.* **194**, 141–142 (2006).
- Frickhofen, N. & Young, N. S. Persistent parvovirus B19 infections in humans. *Microb. Pathog.* **7**, 319–327 (1989).
- Menendez, C., Fleming, A. F. & Alonso, P. L. Malaria-related anaemia. *Parasitol. Today* **16**, 469–476 (2000).
- Lamikara, A. A. *et al.* Malarial anemia: Of mice and men. *Blood* **110**, 18–28 (2007).
- Manning, L. *et al.* Severe anemia in Papua New Guinean children from a malaria-endemic area: A case-control etiologic study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1972 (2012).
- Duedu, K. O., Sagoe, K. W. C., Ayeh-Kumi, P. F., Affrim, R. B. & Adiku, T. The effects of co-infection with human parvovirus B19 and *Plasmodium falciparum* on type and degree of anaemia in Ghanaian children. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 129–139 (2013).
- Tizeba, Y. A. *et al.* Parvovirus B19 is associated with a significant decrease in hemoglobin level among children < 5 years of age with anemia in Northwestern Tanzania. *J. Trop. Pediatr.* **64**, 479–487 (2018).
- Yeats, J., Daley, H. & Hardie, D. Parvovirus B19 infection does not contribute significantly to severe anaemia in children with malaria in Malawi. *Eur. J. Haematol.* **63**, 276–277 (1999).
- Toan, N. L. *et al.* Co-infection of human parvovirus B19 with *Plasmodium falciparum* contributes to malaria disease severity in Gabonese patients. *BMC Infect. Dis.* **13**(375), 1–10 (2013).
- Hogan, B. *et al.* Malaria coinfections in febrile pediatric inpatients: A hospital-based study from Ghana. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 1838–1845 (2018).
- Schellenberg, J. R. M. A., Smith, T., Alonso, P. L. & Hayes, R. J. What is clinical malaria? Finding case definitions for field research in highly endemic areas. *Parasitol. Today* **10**, 439–442 (1994).
- WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. *Vitam. Miner. Nutr. Inf. Syst.* (2011).
- Vyas, S. & Kumaranyake, L. Constructing socio-economic status indices: How to use principal components analysis. *Health Policy Plan.* **21**, 459–468 (2006).
- Kooistra, K., Mesman, H. J., de Waal, M., Koppelman, M. H. G. M. & Zaaijer, H. L. Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003–2009. *Vox Sang.* **100**, 261–266 (2011).
- Candotti, D., Eitz, N., Parsyan, A. & Allain, J. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* **78**, 12169–12178 (2004).
- Molenaar-de Backer, M. W. A. *et al.* Detection of parvovirus B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants? *J. Clin. Virol.* **84** 19–23 (2016).
- Gallinella, G. The clinical use of parvovirus B19 assays: Recent advances. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **18**, 821–832 (2018).
- Young, N. S. & Brown, K. E. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med.* **350**, 586–597 (2004).
- Hoebe, C. J. P. A., Claas, E. C. J., Steenberg, J. E. & Kroes, A. C. M. Confirmation of an outbreak of parvovirus B19 in a primary school using IgM ELISA and PCR on thumb prick blood samples. *J. Clin. Virol.* **25**, 303–307 (2002).
- Gallinella, G. *et al.* Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. *J. Med. Virol.* **71**, 135–139 (2003).
- Enders, M. *et al.* Comparative evaluation of two commercial enzyme immunoassays for serodiagnosis of human parvovirus B19 infection. *J. Virol. Methods* **146**, 409–413 (2007).
- Butchko, A. R. & Jordan, J. A. Comparison of three commercially available serologic assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3191–3195 (2004).
- Banic, D. M., Viana-Martins, F. S., de Souza, J. M., de Castro Peixoto, T. & Daniel-Ribeiro, C. Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 571–577 (1991).
- Stockdale, A. J., Mitambo, C., Everett, D., Geretti, A. M. & Gordon, M. A. Epidemiology of hepatitis B, C and D in Malawi: Systematic review. *BMC Infect. Dis.* **18**(516), 1–10 (2018).
- Corcoran, A. & Doyle, S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J. Med. Microbiol.* **53**, 459–475 (2004).
- Maple, P. A. C. *et al.* Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 947–956 (2014).

Author contributions

W.H. and B.K. designed the research and wrote the paper. B.H., D.E., W.H., N.S. organized and realized data collection. K.G., D.W., C.W., D.E. performed laboratory analysis and implemented quality standards. W.H., R.K., B.K. were responsible for the statistical analysis and interpretation of the data. D.D., D.E., H.F., A.E.-H. contributed additionally to the interpretation of the data. A.J. and W.L. were in charge of data management and data cleaning. E.O.D. and J.M. designed and supervised the underlying study on causes of febrile illness in Ghanaian

www.nature.com/scientificreports/

children and gave valuable input to the writing of the manuscript. All authors contributed substantially to the writing of the manuscript and have read and approved the final version.

Funding

Open Access funding provided by Projekt DEAL. This work was supported by federal funds from the German Center for Infection Research (Deutsches Zentrum für Infektionsforschung, DZIF, funding number 8000 201-3) and through a DZIF Clinical Leave Stipend (Grant Number: TI 07.001 to BK).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72657-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.K.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Januar 2014 bis September 2021 in Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und der Abteilung für Infektionsepidemiologie des Bernhard-Nocht-Instituts, Hamburg durchgeführt.

Dementsprechend gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. May des Bernhard-Nocht-Instituts für die Möglichkeit diese Forschungsarbeit in Hamburg und acht Monate in Ghana zu verwirklichen. Gleichmaßen danke ich Herrn Prof. Dr. Fickenscher des Universitätsklinikums Kiel für die Ermöglichung der Kooperation und Betreuung dieser Arbeit an der Universität zu Kiel.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Benno Kreuels, der mich von der Entwicklung der Fragestellung bis hin zur Auswertung der Daten unterstützt hat. Für seine Betreuung und sein offenes Ohr während meines Aufenthaltes in Ghana danke ich Dr. Ben Hogan. Für die Unterstützung der Datenaufarbeitung und -auswertung danke ich im Besonderen Dr. Daniel Eibach, Anna Jaeger und Ralf Krumkamp.

Ohne die großartige Zusammenarbeit mit dem Team der „FWS-Studie“ in Ghana wäre die Datenerhebung nicht möglich gewesen, mein besonderer Dank gilt Henry Hanson, Kwabena Oppong und Grace Owusu. Daneben danke ich Richard Affreh, Berchie Agyemang, Dennis Appiah, Clinton Azuure, Emmanuel Baah, Geoffrey Foli, Kennedy Gyau Boahen, Veronica Kwaning Obeng, Felix Owusu, Dr. Nimako Sarpong und Charity Wiafe Akenten für die gemeinsame Arbeit.

Für die Unterstützung und Durchführung der Labordiagnostik danke ich Andrea Hölzgen und Petra Krüger des Instituts für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Eis-Hübinger am Institut für Virologie an der Universitätsklinik Bonn sowie Nassim Behjat und Doris Winter des Bernhard-Nocht-Instituts, Hamburg.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinem engen Freundeskreis für die anhaltende Unterstützung und Ermutigung während der vergangenen Jahre.

Mein abschließender Dank gilt unseren kleinen Patientinnen und Patienten und ihren BegleiterInnen für die Teilnahme an der Studie.

9. Lebenslauf

01/2014 – 03/2023	Medizinische Doktorandin; Kooperation zwischen dem Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Prof. Dr. Helmut Fickenscher) und des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg, Abteilung für Infektionsepidemiologie (Prof. Dr. Jürgen May)
02/2014 - 10/2014	Achtmonatiger Forschungsaufenthalt in Ghana, Förderung durch das „Deutsche Zentrum für Infektionsforschung“ (DZIF)

Veröffentlichungen

Herr W, Krumkamp R, Hogan B, Dekker D, Gyau K, Owusu-Dabo E, Sarpong N, Jaeger A, Loag W, Winter D, Akenten CW, Eibach D, Fickenscher H, Eis-Hübinger A, May J, Kreuels B (2020) A cross-sectional study on risk factors for infection with Parvovirus B19 and the association with anaemia in a febrile paediatric population in Ghana. *Sci Rep* 10, 15695. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72657-5>

Hogan B, Eibach D, Krumkamp R, Sarpong N, Dekker D, Kreuels B, Maiga-Ascofaré O, Gyau Boahen K, Wiawe Akenten C, Adu-Sarkodie Y, Owusu-Dabo E, May J; Fever Without Source (FWS) Study Group (2018) Malaria coinfections in febrile pediatric inpatients: a hospital-based study from Ghana. *Clin Infect Dis* 66:1838-1845. doi: 10.1093/cid/cix1120. PMID: 29408951; PMCID: PMC5982794.

Posterpräsentationen

Herr W, Hogan B, Eibach D, Sarpong N, Owusu-Dabo E, Fickenscher H, May J, Kreuels B (2016) *Human Parvovirus B19 and Plasmodium falciparum co-infection in febrile children from Ghana*. 13. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, 15-18.06.2016, Würzburg, und Jahrestagung des Deutschen Zentrum für Infektionsforschung, 24.-26.11. 2016, Köln
