

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Sektion Tropenmedizin

Direktor/in der Einrichtung
Prof. Dr. med. A. Lohse

Verzögerte, behandlungspflichtige Hämolyse nach parenteraler Artesunatgabe bei Kindern mit schwerer Malaria in Afrika

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Dorothee Nicole Spahlinger
aus München

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 15.10.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gerd-Dieter Burchard

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Marylyn Addo

1 Einleitung	5
1.1 Malaria.....	5
1.1.1 Erreger und Epidemiologie	5
1.1.2 Entwicklungszyklus von Plasmodium falciparum	5
1.1.3 Klinisches Bild	7
1.1.4 Schwere Malaria.....	8
1.1.5 Medikamentöse Therapie der schweren Malaria	11
1.1.6 Therapie der schweren Malaria mit Artesunat.....	12
1.2 Anämie	14
1.2.1 Definition	14
1.2.2 Ursachen und Klinik	15
1.2.3 Hämolytische Anämie.....	15
1.2.4 Anämie bei Malaria.....	18
1.2.5 Hämolytische Anämie unter Artesunat-Therapie.....	20
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Studienort	22
2.1.1 Ethik	22
2.2 Studienpopulation	23
2.2.1 Einschlusskriterien	23
2.2.2 Ausschlusskriterien	23
2.3 Studienablauf	23
2.3.1 Medikamentöse Therapie.....	24
2.3.2 Wiedervorstellung und Follow-up	25
2.4 Blutuntersuchungen	25
2.4.1 Anfertigung des Blutausstrichs.....	25
2.4.2 Anfertigung Dicker Tropfen	26
2.4.3 Retikulozytenzählung	26
2.4.4 Parasitologische Untersuchung.....	26
2.5 Studienziele	27
2.6 Statistische Auswertung	27
2.7 Material	28
2.7.1 Material am Studienort in Ghana.....	28
2.7.1.1 Laborgeräte	28
Tabelle 10: Laborgeräte Ghana	28
2.7.1.2 Blutentnahme	28
2.7.1.3 Giemsa-Färbung	29
2.7.1.4 Retikulozyten-Färbung	29
2.7.1.5 Öl für Mikroskop	29
2.7.2 Material in Deutschland	29
3 Ergebnisse	29
3.1 Demografische und klinische Parameter der rekrutierten Kinder	29
3.2 Kriterien für schwere Malaria.....	30
3.3 Auswertung der erhobenen Daten	31
3.4 Patienten mit verzögerter Hämolyse an Tag 14	32
3.4.1 Fallbeschreibung eines Patienten mit Hämolyse an Tag 14	32
3.4.2 Zeitliche Verläufe der relevanten Laborparameter	33
3.5 Vergleich der Gruppen im Man-Whitney-U-Test	34
4 Diskussion	35
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	35

4.2 Kritische Betrachtung von Material und Methodik	37
4.2.1 Studiendesign	37
4.2.2 Fallzahl	37
4.3 Interpretation und Vergleich der Ergebnisse mit dem gegenwärtigen Forschungsstand	39
4.3.1 Überblick über die Fallberichte und Studienergebnisse	39
4.3.1.1 Ergebnisse aus retrospektiven Studien und Fallberichten	39
4.3.1.2 Ergebnisse aus prospektiven Studienansätzen	40
4.3.2 Probandenalter und Parasitenwerte	40
4.3.3 Artesunat-Dosierung	42
4.3.4 Darreichungsform und Verabreichungsmuster	42
4.3.5 Artemisinin-Derivate	43
4.3.6 Art der Herstellung von Artesunat	44
4.4 Fehlende Berichte über therapieassoziierte Hämolyse bisher.....	44
4.5 Abgrenzung zu anderen Formen der hämolytischen Anämie und mögliche pathophysiologische Mechanismen	45
4.5.1 Hämolyse bei akuter Malariainfektion	45
4.5.2 Hämolyse bei Schwarzwasserfieber	45
4.5.3 Hämolyse durch Transfusionsreaktion	46
4.5.5 Autoimmun-vermittelte Hämolyse	46
4.5.6 Genetische Ursachen	47
4.5.7 Pitting	48
4.6 Erkenntnisse seit Abschluss der Studie	49
5 Zusammenfassung/ Summary	51
6 Abkürzungsverzeichnis	53
7 Tabellenverzeichnis	54
8 Abbildungsverzeichnis	54
9 Literaturverzeichnis	55
10 Danksagung	61
11 Eidesstattliche Versicherung	62

1 Einleitung

1.1 Malaria

Laut Schätzung der WHO erkrankten im Jahr 2015 weltweit 212 Millionen Menschen an Malaria (geschätzte Spanne 148- 304 Millionen), 429 000 davon verstarben (geschätzte Spanne 235 000- 639 000). 92% der Todesfälle traten südlich der Sahara auf. Dort starben 292 000 Kinder vor dem fünften Lebensjahr an einer Malariainfektion. Somit ist die Malaria eine der häufigsten Todesursachen im subsaharischen Afrika bei Kindern unter 5 Jahren.

Dies ist besonders schwerwiegend, da es sich bei der Malariainfektion um eine vermeidbare und einfach behandelbare Erkrankung handelt (WHO 2016).

1.1.1 Erreger und Epidemiologie

Bei den Erregern der Malaria handelt es sich um Protozoen der Gattung Plasmodium. Als intrazelluläre Parasiten infizieren sie die Erythrozyten. Es sind derzeit vier humanpathogene (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) und eine nur teils humanpathogene Spezies (*P. knowlesi*) bekannt.

Beim Menschen wird die Erkrankung fast ausschließlich durch den Stich einer infizierten Mücke der Gattung *Anopheles gambiae* hervorgerufen. Die Übertragung auf direktem Weg, zum Beispiel durch Bluttransfusion, ist weitaus seltener, aber möglich (Löscher, Burchard et al. 2010; White 2014).

Schwere Verlaufsformen werden in erster Linie durch *P. falciparum* verursacht, den Erreger der Malaria tropica (Greenwood, Bojang et al. 2005; Rosenthal 2008). Er ist auch für über 80% der durch Malaria verursachten Todesfälle verantwortlich (Haldar and Mohandas 2009; Perkins, Were et al. 2011).

Da für diese Arbeit ausschließlich die Malaria tropica relevant ist, beziehen sich alle folgenden Ausführungen auf diese Erkrankungsform.

1.1.2 Entwicklungszyklus von Plasmodium falciparum

Der Entwicklungszyklus von *P. falciparum* verläuft in zwei Stadien. Im menschlichen Organismus findet die asexuelle und in der übertragenden Mücke die sexuelle Vermehrung statt (Löscher, Burchard et al. 2010).

Wird der Mensch von einer infizierten weiblichen Mücke gestochen, gelangen bei der Blutmahlzeit so genannte Sporozoiten aus ihrer Speicheldrüse in den menschlichen Organismus. Über die Blutbahn gelangen sie in die Leber und befallen die Hepatozyten. Hier durchlaufen sie verschiedene Stadien und entwickeln sich schließlich zu Merozoiten. Nach Ruptur der befallenen Hepatozyten (ca. eine Woche nach Infektion) gelangen die Merozoiten in die Blutbahn und befallen Erythrozyten. In diesen entwickeln sie sich über das Ring- und das Trophozoitenstadium zu mehrkernigen Gewebsschizonten, aus denen erneut Merozoiten hervorgehen. Dabei verbraucht der Parasit den Großteil der erythrozytären Zellbestandteile. Die betroffenen Erythrozyten rupturieren und die frei werdenden Merozoiten befallen weitere Erythrozyten.

In diesem intraerythrozytären Stadium manifestieren sich die klinischen Symptome (siehe auch 1.1.3), sobald die Parasitendichte 50/μl Blut erreicht hat. Krankheitserscheinungen entstehen aus Befall und Zerstörung der Erythrozyten, sowie der diesbezüglichen inflammatorischen Reaktion des Wirts.

Die Dauer eines solchen intraerythrozytären oder asexuellen Zyklus beträgt um die 48 Stunden (Weatherall, Miller et al. 2002; Rosenthal 2008; White 2014).

Die Inkubationszeit der Malaria beträgt in den meisten Fällen 10 bis 14 Tage (Löscher, Burchard et al. 2010; White 2014).

Aus einigen Merozoiten entwickeln sich Gametozyten (männliche und weibliche Geschlechtsformen des Malariaerregers), welche von der Mücke bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden können. In ihrem Magen vollzieht sich dann der geschlechtliche Zyklus. Es entstehen Sporozoiten, welche in die Speicheldrüse der Mücke wandern und bei der nächsten Blutmahlzeit erneut auf den Menschen übertragen werden können (Wirth 2002).

Der Ablauf eines gesamten Entwicklungszyklus dauert um die 30 Tage (White 2014).

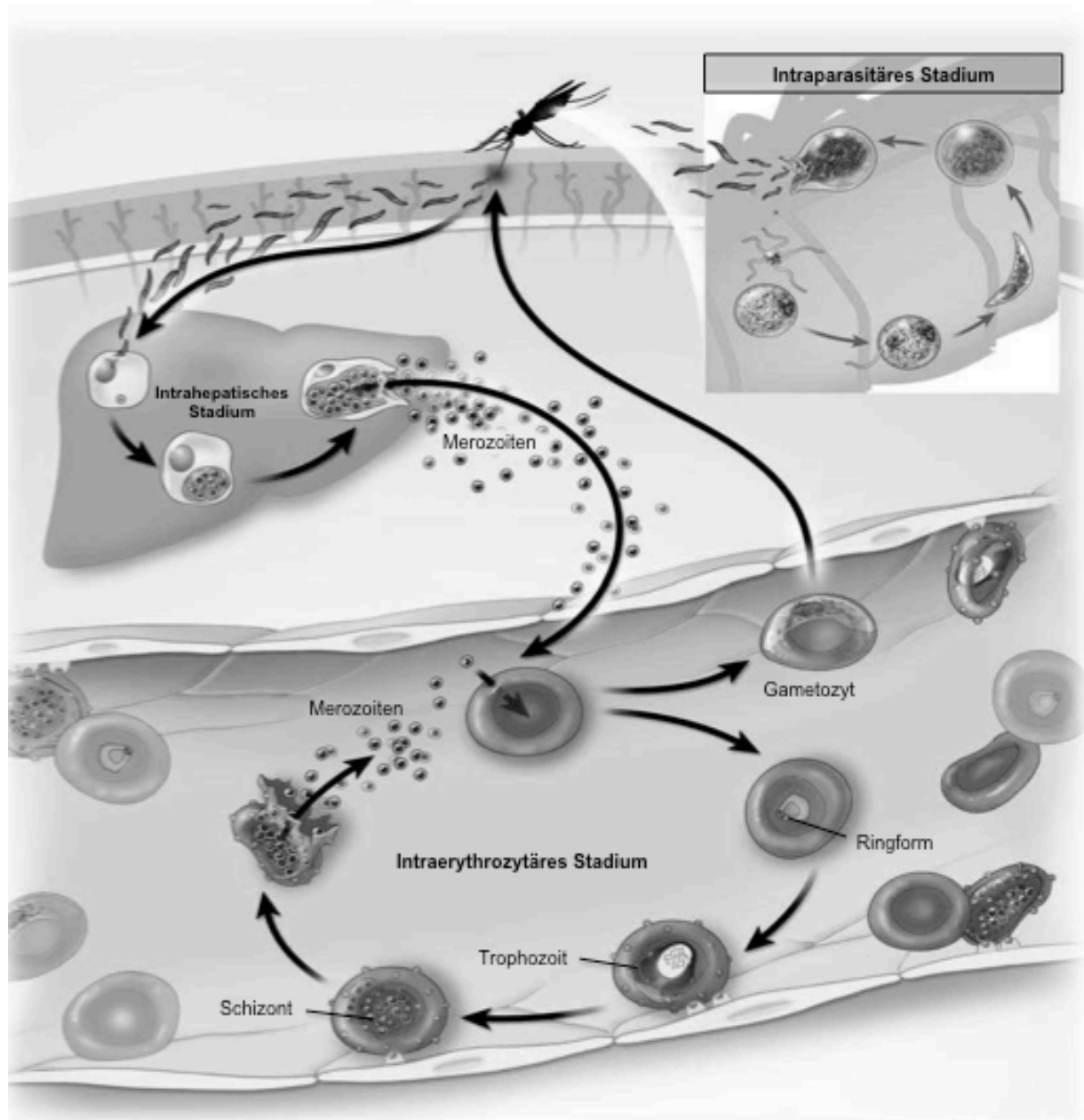


Abbildung 1: Lebenszyklus von *P. falciparum* (Rosenthal 2008)

1.1.3 Klinisches Bild

Der wiederholte Befall und die Zerstörung der Erythrozyten führen zu den für die Malaria charakteristischen Fieberschüben, welche das Leitsymptom bilden, aber nicht obligat sind (Weatherall, Miller et al. 2002; Whitty, Chiodini et al. 2013).

Als weitere Symptome können allgemeines Krankheitsgefühl, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe auftreten (Rosenthal 2008).

Diese Symptome überschneiden sich mit denen vieler anderer infektiöser Erkrankungen und erschweren damit die Diagnosestellung, insbesondere in nicht-endemischen Regionen (Whitty, Chiodini et al. 2013).

Aufgrund der Multisystembeteiligung, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium, können die klinischen Kriterien denen eines septischen Krankheitsbildes gleichen (Mackintosh, Beeson et al. 2004; Singer, Deutschman et al. 2016).

Die Schwere des Krankheitsverlaufs hängt sowohl vom Lebensalter als auch von der individuellen Immunitätslage des Erkrankten ab (Mackintosh, Beeson et al. 2004; Perkins, Were et al. 2011).

1.1.4 Schwere Malaria

Treten bei einer akuten Malaria Zeichen von Organdysfunktion auf oder finden sich hohe Parasitenzahlen im Blut spricht man von einer schweren Verlaufsform (Rosenthal 2008). In Tabelle 1 sind die durch die WHO festgelegten Kriterien einer schweren Malaria dargestellt.

Der milde Verlauf des frühen Erkrankungsstadiums kann innerhalb weniger Stunden in eine schwere Malaria mit zahlreichen Komplikationen übergehen. Die Differentialdiagnostik kann hierbei durch das gleichzeitige Vorhandensein anderer gravierender Erkrankungen erschwert sein. Dies gilt vor allem für Endemiegebiete.

Erkrankte ohne vorausgegangenem Kontakt mit dem Erreger sind besonders von schweren Verläufen gefährdet (Newton and Krishna 1998). Dies betrifft in Gebieten mit stabiler Malariatransmission vor allem Kinder unter fünf Jahren. Ab dem 5. Lebensjahr hat sich bei den Kindern aufgrund der wiederkehrenden Infektionen in der Regel eine sogenannte Teilimmunität gegen die Malaria ausgebildet, welche die Erkrankungsschwere deutlich abmildert (Bull, Lowe et al. 1998).

78% aller lebensbedrohlichen Malariaerkrankungen treten bei afrikanischen Kindern auf (WHO 2016).

Das klinische Erscheinungsbild der schweren Malaria beim nicht- immunen Erwachsenen unterscheidet sich deutlich von dem nicht-immuner afrikanischer Kinder (Greenwood, Bojang et al. 2005). So treten beim nicht-immunen Erwachsenen häufiger ein akutes Lungenödem, akutes Nierenversagen sowie ein

Ikterus auf. Bei Kindern werden häufiger schwere Anämien und Hypoglykämien gesehen.

Eine Azidose oder auch eine zerebrale Malaria mit Koma können in allen Altersgruppen auftreten (Dondorp, Lee et al. 2008).

Neben der veränderten Erythrozytenmorphologie nach Parasiteninvasion führt auch der Prozess der Sequestration zu einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und lokaler Perfusion verschiedener Organe. Die Sequestration meint die Adhäsion des befallenen Erythrozyten an das Gefäßendothel. So verbleibt der befallene Erythrozyt in den peripheren Gefäßen und wird nicht in der Milz eliminiert (Heddini 2002; Rosenthal 2008). Funktionsstörungen die dadurch entstehen, manifestieren sich unter anderem in Gehirn, Lunge und Niere. Ersteres wird als zerebrale Malaria bezeichnet, manifestiert sich durch Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma und tritt oft mit Krampfanfällen auf. Sie ist eine fulminante Verlaufsform der schweren Malaria (Mackintosh, Beeson et al. 2004).

Bleibt die schwere Malaria unbehandelt, führt sie in der Mehrzahl der Erkrankungsfälle zum Tode. Ein besonders hohes Mortalitätsrisiko besteht bei Erkrankten, die nicht mehr mit oralen Medikamenten behandelt werden können (WHO 2000).

Die Letalität einer schweren Malariainfektion, insbesondere nach Auftreten zerebraler Schäden, liegt trotz Behandlung bei bis zu 12- 22 % (Dondorp, Nyanoti et al. 2002; Newton, Angus et al. 2003; Dondorp, Nosten et al. 2005; Askling, Bruneel et al. 2012). Wird eine unkomplizierte Verlaufsform rasch und effektiv behandelt, sinkt die Letalität auf deutlich <1% (Cramer, Lopez-Velez et al. 2011; Askling, Bruneel et al. 2012; White 2014).

In Europa beträgt das Gesamtüberleben für importierte Malaria tropica Infektionen (bezogen auf einen Zeitraum von 28 Tagen) 98,4% (Kurth, Develoux et al. 2015). 4% der Infektionen gehen in eine komplizierte Verlaufsform über (Bruneel, Tubach et al. 2010; Cramer, Lopez-Velez et al. 2011).

Von der WHO wurden verschiedene klinische Merkmale und laborchemische Befunde als Kriterien zur Diagnosestellung der schweren Malaria bei nachgewiesener Parasitämie definiert (WHO 2012):

Symptom/ Kriterium	Definition
• Zerebrale Malaria • Koma • Wiederholte generalisierte oder fokale Krampfanfälle • Schwere Anämie • Azidose • Hyperlaktatämie • Kreislaufversagen oder Schock • Hyperparasitämie • Hypoglykämie • Ikterus • Akutes Nierenversagen • Hämoglobinurie • Atemnotsyndrom • Lungenödem • Spontane Blutung • Disseminierte intravasale Gerinnung • Schweres Erbrechen • Prostration	Glasgow Coma Scale (GCS) <11/15 oder Blantyre Coma Scale (BCS) <4/5 (siehe Tabelle 2) in Anwesenheit einer <i>P. falciparum</i> Malaria und nach Ausschluss anderer neurologischer Ursache GCS ≤ 9/15 oder BCS ≤ 2/5 Mehr als zwei Anfälle innerhalb von 24 Stunden Hämatokrit (Hk) <15% oder Hämoglobin (Hb) <5 g/dl pH <7,35, Plasma-Bikarbonat (HCO₃⁻) <15 mmol/l, Base excess (BE) <2 mmol/l >5 mmol/l systolische Blutdruckwerte <50 mmHg bei Kindern bzw. <80 mmHg beim Erwachsenen und klinische Hinweise auf schwache periphere Durchblutung bzw. Kreislauf-Zentralisierung Befall von ≥ 4% (≥ 200 000/μl) der Erythrozyten bei Kindern und nicht-immunen Erwachsenen ≥ 10% der Erythrozyten bei erwachsenen Patienten aus Malaria-Endemiegebiet Blutzucker (BZ) <40 mg/dl bzw. 2,2 mmol/l Gesamtbilirubin ≥ 3,0 mg/ dl Bei Erwachsenen: Kreatinin >3,0 mg/dl bzw. 265 μmol/l persistierend nach Rehydrierung mit Ausscheidung <400 ml/ 24 Stunden; Bei Kindern: Ausscheidung <12 ml/kg/24 Stunden Dunkelrot oder schwarz gefärbter Urin und positiver Urinteststreifen für Hämoglobin/Myoglobin Bei Erwachsenen: sichtbare zentrale Zyanose oder Atemfrequenz anhaltend >32/min. Bei Kindern: beim nicht weinenden oder aufgeregten Kind mit Nasenflügeln, inter- und/ oder subkostalen Einziehungen, tiefe, Kussmaulsche Atmung Unfähigkeit orale Medikation zu sich zu nehmen Unfähigkeit zu sitzen, ausgeprägte Schwäche

Tabelle 1: Definition der schweren Malaria nach WHO- Kriterien (WHO 2014; WHO 2015)

	Blantyre Coma Scale	Punkte	Glasgow Coma Scale	Punkte
Augen öffnen	Gerichtet Ungerichtet	1 0	Spontan	4
			Auf Ansprache	3
			Auf Schmerzreiz	2
			Gar nicht	1
Sprache	Schreien Inadäquates Schreien/Stöhnen Gar nicht	2 1 0	Orientiert	5
			Desorientiert	4
			Inadäquate Worte	3
			Unverständliche Laute	2
			Gar nicht	1
Motorik	Lokalisiert Schmerzreiz Zieht betroffenes Körperteil weg Unspezifische oder fehlende Reaktion auf Schmerzreiz	2 1 0	Befolgt Anweisungen	5
			Reagiert auf Schmerzreiz	4
			Flexionsreaktion	3
			Extensionsreaktion	2
			Keine Reaktion	1

Tabelle 2: Blantyre Coma Scale/ Glasgow Coma Scale (Mabeza, Moyo et al. 1995; Newton, Chokwe et al. 1997)

1.1.5 Medikamentöse Therapie der schweren Malaria

Malaria ist heilbar, wenn sie rechtzeitig erkannt und schnell und korrekt therapiert wird. In frühen Stadien der Erkrankung ist eine zügige Genesung ohne Entwicklung von Komplikationen bzw. Verbleib von Folgeschäden möglich. Jede schwere Malaria ist ein lebensbedrohlicher Zustand und muss als Notfall angesehen werden (WHO 2015).

Die schwere Malaria wird zunächst parenteral therapiert, um die Parasitenzahl rasch zu reduzieren. Von dieser Vorgehensweise verspricht man sich eine Verminderung von mikrovaskulär bedingten Organschäden und hierüber eine signifikante Senkung der Mortalitätsrate.

Neben der antiparasitären Behandlung ist eine umfassende individuelle supportive Therapie erforderlich. Diese sollte, je nach örtlichen Gegebenheiten, auf einer Intensivstation erfolgen (Day and Dondorp 2007).

Lange Zeit war Chinin das Mittel der ersten Wahl zur Therapie der schweren Malaria und ist es hauptsächlich aus Kostengründen und durch bessere Verfügbarkeit vielerorts immer noch; jedoch findet hier ein deutlicher Wandel statt. Es wird intravenös oder intramuskulär verabreicht. Die intravenöse Gabe sollte aus Gründen der Kardiotoxizität langsam über 4 Stunden gegeben werden. Alternativ ist die intramuskuläre Gabe möglich, wobei sie sehr schmerzhaft ist und zu einer lokalen Reizung oder Abszessbildung führen kann (Day and Dondorp 2007; Rosenthal 2008; Dondorp, Fanello et al. 2010).

Chinin zerstört späte Ringstadien, Trophozoiten und frühe Schizonten, verhindert also die Entwicklung der späten Ringstadien in das der Schizonten. Bereits vorhandene späte Schizonten schließen jedoch trotz ausreichender Chininspiegel ihre Entwicklung ab und setzen Merozoiten frei, die wiederum weitere Erythrozyten befallen. Daher kann die Parasitendichte innerhalb der ersten 24 Stunden der Therapie nochmals ansteigen und so zu einer gleichzeitigen Zunahme der Symptome führen.

Chinin hat eine geringe therapeutische Breite und zudem ein ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum (Dondorp, Fanello et al. 2010). Häufige unerwünschte Wirkungen sind Tinnitus, Taubheit, Schwindel und Erbrechen. Sie sind in der Regel reversibel und von milder Ausprägung. Seltene, aber schwerwiegendere Nebenwirkungen sind Hypoglykämien, allergische Reaktionen, Agranulozytose, ventrikuläre Herzrhythmusstörungen sowie Gerinnungsstörungen mit erhöhter Blutungsneigung (Cramer, Lopez-Velez et al. 2011; WHO 2015). Bei einigen Patienten kam es im Zusammenhang mit einer Chinin-Therapie zum sogenannten Schwarzwasserfieber mit Hämolyse und Hämoglobinurie (Pasvol 2005).

Während der Therapie sind deshalb regelmäßige Kontrollen von klinischem Verlauf, EKG, Blutbild und Blutzucker erforderlich.

Nach Beendigung der parenteralen Behandlung wird die Malariatherapie mit einem oralen Medikament weitergeführt und abgeschlossen (WHO 2015).

1.1.6 Therapie der schweren Malaria mit Artesunat

Artesunat ist ein wasserlösliches Artemisinin-Derivat, das nach der Resorption zum aktiven Metabolit Dihydroartemisinin (DHA) hydrolysiert wird. Es kann intravenös, intramuskulär, rektal und oral verabreicht werden und wird im Gegensatz zum auf Öl basierenden Artemether rasch resorbiert (Woodrow, Haynes et al. 2005).

Im Jahr 2006 wurde Artesunat in die Therapieempfehlungen der WHO aufgenommen (WHO 2006; April). Seit 2010 wird Artesunat von der WHO als Therapie der ersten Wahl der schweren Malaria bei Erwachsenen und Kindern empfohlen (Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012; WHO 2014; WHO 2015).

Seine Überlegenheit gegenüber Chinin bezüglich der Mortalität bei schwerer Malaria wurde in zwei großen vergleichenden Studien in den beiden Endemiegebieten Asien (SEAQUAMAT: South-East Asia Quinine Artesunate Malaria Trail) und Afrika

(AQUAMAT: Africa Quinine Artesunate Malaria Trail) nachgewiesen. (Dondorp, Nosten et al. 2005; Dondorp, Fanello et al. 2010)

In der SEAQUAMAT-Studie (Juni 2003 – Mai 2005 in Bangladesch, Indien, Indonesien und Myanmar an 1461 Erwachsenen mit Malaria tropica, davon 1050 mit schwerer Malaria tropica) zeigte sich bei der Therapie mit Artesunat gegenüber Chinin eine absolute Senkung der Mortalitätsrate um 34,7% (95% CI 18,5 – 47,6%; $P=0,0002$) (Dondorp, Nosten et al. 2005).

In der AQUAMAT- Studie (Oktober 2005 - Juli 2010 in neun afrikanischen Ländern an 5425 Kindern <15 Jahren mit Malaria tropica, davon 4618 mit schwerer Malaria tropica) zeigte sich bei der Therapie mit Artesunat gegenüber Chinin eine absolute Senkung der Mortalitätsrate um 22,5% (95% CI 8,1 – 36,9; $P=0.0022$) und ein rascherer Rückgang der Parasitämie (Dondorp, Fanello et al. 2010).

Zudem wird Artesunat ein milderes Nebenwirkungsspektrum nachgesagt. Langzeituntersuchungen hierzu fehlen jedoch noch (Dondorp, Fanello et al. 2010).

Im Vergleich zu Chinin wirkt Artesunat nicht nur auf die späten Ringstadien des Parasiten, sondern auch auf die frühen Ringstadien. Daher tritt die Wirkung bereits wenige Stunden nach dem parasitären Befall ein und verhindert das Heranreifen des Plasmodiums im Erythrozyten. Es erreicht auch die Gametozyten und vermindert so auch die Transmission der Erreger durch die Mücke (Hien, Davis et al. 2004; Woodrow, Haynes et al. 2005; Rosenthal 2008).

Besonders die Wirkung auf die unreifen Ringstadien führt zu einer schnellen Eliminierung der Parasiten durch die Milz. Da sich die jungen Ringstadien nicht weiter entwickeln können, wird auch die Sequestration befallener Erythrozyten im Kapillarbett verhindert. So kann die Komplikation des mikrovaskulären Gefäßverschlusses und der daraus resultierenden lebensbedrohlicher Organschädigung vermindert werden (Day and Dondorp 2007; Dondorp, Fanello et al. 2010).

Auch die einfachere Darreichungsform als Bolus ist möglich. Chinin muss kontinuierlich über mehrere Stunden verabreicht werden (Day and Dondorp 2007; Zoller, Junghanss et al. 2011). Außerdem ist bei Niereninsuffizienz keine Dosisreduktion notwendig, und es sind bisher noch keine Interaktionen mit anderen Arzneimitteln bekannt. Die Datenlage hierzu ist jedoch noch lückenhaft (Cramer, Lopez-Velez et al. 2011).

Die vereinfachte rektale Gabe ist eine weitere Applikationsform. Sie ist als Alternative zur parenteralen Gabe besonders für ländliche ressourcenschwächere afrikanische Regionen geeignet (Hien, Tam et al. 1991; Simpson, Agbenyega et al. 2006).

Alle Artemisinin-Derivate haben eine kurze Halbwertszeit. (Rosenthal 2008)

Zu den häufiger beobachteten Nebenwirkungen von Artesunat zählen Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit und Schwindel, seltener Neutropenie, Anämie mit und ohne Hämolyse (siehe hierzu Kapitel 1.2) und Anstieg der Leberenzyme. Hypoglykämien treten seltener auf als unter einer Chinin-Therapie. (Newton, Angus et al. 2003)

Bisher wird das einzige weltweit erhältliche, präzertifizierte Produkt in China (Guilin Pharmaceutical Company Ltd., Shanghai) produziert. Ein nach europäischem Standard und *Good Manufacturing Practice (GMP)* hergestelltes Produkt existiert noch nicht (Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012).

1.2 Anämie

1.2.1 Definition

Eine Anämie ist definiert durch das Vorliegen einer reduzierten Erythrozytenmasse. In der Labordiagnostik geben ein reduzierter Hämoglobinanteil, ein verminderter Hämatokrit und eine verminderte Erythrozytenanzahl Auskunft über das Vorliegen einer Anämie (McLean, Cogswell et al. 2009).

Die Anämie ist eine Blutbildveränderung, der vielerlei Ursachen mit unterschiedlicher Pathophysiologie zugrunde liegen können. Sie kann Begleitsymptom verschiedener Erkrankungen oder Ausdruck von Mangelerscheinungen sein.

Anämien werden anhand der Hämoglobinkonzentration in mild (ab unteren Grenzwert bis 10,0 mg/dl), moderat (10,0- 8,0 mg/dl), schwer (8,0- 6,5 mg/dl) und lebensbedrohlich (unter 6,5 mg/dl) eingeteilt.

Die Referenzbereiche und Grenzwerte sind geschlechts- und altersabhängig (Thomas 2012).

Kinder			
Nabelschnurblut	13,5-20,7		
1. Tag	15,2-23,5	8-10 Monate	10,5-12,9
2-6 Tage	15,0-24,0	11-13,5 Monate	10,7-13,0
14-23 Tage	12,7-18,7	1,5-3 Jahre	10,8-12,8
24-37 Tage	10,3-17,9	5 Jahre	11,1-14,3
40-50 Tage	9,0-16,6	10 Jahre	11,9-14,7
2-2,5 Monate	9,2-15,0	12 Jahre	11,8-15,0
3-3,5 Monate	9,6-12,8	15 Jahre	12,8-16,8
5-7 Monate	10,1-12,9		
Erwachsene			
Weiblich	11,5-16,0		
Männlich	13,5-17,8		

Tabelle 3: Referenzbereich von Hämoglobin (Angaben in mg/dl) (Thomas 2012)

1.2.2 Ursachen und Klinik

Bei Anämie ist die Sauerstoffversorgung der Gewebe und Organe nicht ausreichend gewährleistet. Symptome sind folglich eine allgemeine Schwäche, Müdigkeit, Atemnot, blasse oder ikterische Hautfarbe, Schwindel und Kopfschmerzen. Die Herzfrequenz kann kompensatorisch erhöht sein, was durch Palpitationen auffallen kann (Arastéh and Baenkler 2013).

Im Folgenden werde ich auf die hämolytische Anämie im Speziellen eingehen, da sie für diese Arbeit relevant ist.

1.2.3 Hämolytische Anämie

Die hämolytische Anämie wird durch einen beschleunigten Abbau oder Zerstörung von Erythrozyten vor Ablauf ihrer durchschnittlichen Lebensdauer von 120 Tagen verursacht (< 100 Tage) (Herold 2014).

<i>korpuskuläre hämolytische Anämien (meist angeboren)</i>	<i>extrakorpuskuläre hämolytische Anämien (stets erworben)</i>
Anomalien der Erythrozytenmembran ■ hereditäre Sphärozytose ■ hereditäre Elliptozytose ■ PNH = paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (erworben)	Immunhämolyse ■ autoimmunhämolytische Anämien (AIHA): Wärme-, Kälte- oder bithermische Auto-Antikörper richten sich gegen Antigene eigener Erythrozyten ■ alloimmunhämolytische Anämien: Antikörper richten sich gegen Antigene fremder Erythrozyten. Beispiele: hämolytische Transfusionsreaktion, fetale Erythroblastose bei Rh- oder ABO-Inkompatibilität, Anämie nach Organtransplantation ■ medikamentös-induzierte immunhämolytische Anämie: man unterscheidet : Methyldopa-Typ, Immunkomplex-Typ (viele Medikamente), Hapten-Typ (z. B. Penicillin)
Enzymdefekte der Erythrozyten* (angeboren) ■ Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel ■ Pyruvatkinasemangel	toxische Hämolyse (dosisabhängig) ■ Medikamente, z. B. Sulfonamide ■ Toxine/Erreger, z. B. Schlangengifte, Malariaerreger (Plasmodium)
angeborene Störungen der Hämoglobinsynthese (Hämoglobinopathien) ■ Synthese abnormer Hämoglobine (qualitative Hämoglobinopathie)*: – Sichelzellkrankheit (Synthese von HbS) – Hämoglobin-C-Krankheit (Synthese von HbC) ■ verminderte Synthese normaler Hämoglobine (quantitative Hämoglobinopathie): Thalassämien	mechanische Hämolyse ■ Marschhämoglobinurie ■ Hämolyse nach Herzklappenersatz ■ mikroangiopathische Anämien (thrombotisch-thrombozytopenische Purpura = TTP, hämolytisch-urämisches Syndrom = HUS) ■ disseminierte intravasale Gerinnung (DIC)
	Hypersplenismus Splenomegalie (Folge portaler Hypertension, einer Entzündung, Stoffwechselerkrankung oder einer malignen Erkrankung hämatopoetischer Zellreihen) führt zu einer Zunahme der Blutfilterung in der Milz und somit zu verstärktem Erythrozytenabbau.
* Aufgeführt sind die häufigsten Enzymdefekte bzw. abnormen Hämoglobine.	

Abbildung 2: Einteilung der hämolytischen Anämien (Arastéh and Baenkler 2013)

Es gibt unterschiedliche Ansätze, die hämolytische Anämie einzuteilen. Je nach dem Ort des Zerfalls kann eine intravasale oder extravasale Form unterschieden werden. Bei der intravasalen Hämolyse wird die Zelle im Blutkreislauf zerstört und Zellbestandteile gehen ins Plasma über. Bei der extravasalen Hämolyse werden Erythrozyten mit veränderter Zellmembranstruktur von Makrophagen, der Milz oder der Leber entfernt (Dhaliwal, Cornett et al. 2004).

Es gibt intra- und extrakorpuskuläre Ursachen für eine Hämolyse (Herold 2014). Außerdem muss zwischen angeborenem und erworbenem Defekt unterschieden werden. So sind die korpuskulären Formen meist angeboren, die extrakorpuskulären stets erworben (Arastéh and Baenkler 2013).

Es kommt zu laborchemischen Veränderungen, die den gesteigerten Zellzerfall und die reaktive Zellerneuerung wiedergeben. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die laborchemischen Veränderungen, die bei einer hämolytischen Anämie gemessen werden können.

Zellzerfall / -abbau
Serumbilirubin ↑
Laktatdehydrogenase (LDH) ↑
Hämoglobin (Hb) ↓
Erythrozytenzahl ↓
Hämatokrit (Hkt) ↓
Serumhaptoglobin ↓
Regeneration
Retikulozyten im peripheren Blut ↑
Knochenmarkshyperplasie

Tabelle 4: Laborchemische Veränderungen bei hämolytischer Anämie (Herold 2014)

Durch die Zerstörung der Erythrozyten sinken deren gemessene Gesamtzahl, der Hämoglobinwert und der Hämatokrit. Beim Zellzerfall wird LDH ins Plasma freigesetzt, das als ansteigender Wert gemessen wird. Auch das Hämoglobin geht ins Plasma über und wird dort an das Plasmaprotein Haptoglobin gebunden und zur Milz transportiert. Dadurch werden niedrige Haptoglobin-Werte gemessen. In Milz und Leber wird das Hämoglobin zu Bilirubin abgebaut. Die Serumbilirubinwerte steigen als Folge an (Dhaliwal, Cornett et al. 2004).

Die Erythropoeseleistung wird kompensatorisch gesteigert. Dies kann vor allem bei chronischen Verlaufsformen gemessen werden. Um die Knochenmarksfunktion einzuschätzen, werden die Retikulozytenzahl im peripheren Blut, der Retikulozyten-Produktions-Index (RPI) und die Erythroblasten-Zahl im Knochenmark genutzt. Im Knochenmark finden sich vermehrt normal ausreifende Erythroblasten und eine Verschiebung der Vorstufen zur Seite der roten Reihe. Im peripheren Blut steigt der Anteil der Retikulozyten reaktiv an und der RPI nimmt Werte über 3 an (RPI>3). In die Berechnung des RPI gehen neben der Retikulozytenzahl in Prozent, der Hämatokrit und die Retikulozyten-Reifungszeit (sog. Shift) mit ein (Herold 2014).

$$RPI = \frac{\text{Retikulozyten}(\%)}{\text{shift}(\text{Tage})} \times \frac{\text{Hkt}(\%)}{45}$$

Tabelle 5: Formel für Retikulozyten-Produktions-Index (RPI) (Herold 2014)

Die hämolytische Anämie ist normozytär und normochrom. Allerdings kann die reaktive Retikulozytose die Messungen für das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) erhöhen (Dhaliwal, Cornett et al. 2004).

Bei einer Malariainfektion zerstört der Parasit die Erythrozyten, was eine hämolytische Anämie zur Folge hat. Hierbei sind außerdem Mechanismen von Bedeutung, die nicht-befallene Erythrozyten betreffen (dazu siehe 1.2.4).

Auch einige Medikamente können hämolytische Anämien auslösen. Beide Formen sind nach obiger Aufteilung erworben (Arastéh and Baenkler 2013).

Hämolytische Anämien, die mit der Einnahme von Medikamenten assoziiert sind, können durch Stimulation des B-Zellsystems oder auch durch Antikörper vermittelte Reaktionen, z.B. durch Immunkomplex-Bildung oder Autoantikörper verursacht werden. (Dhaliwal, Cornett et al. 2004; Johnson 2009; Garratty 2010)

Das Medikament Chinin, das lange Zeit für die Therapie der schweren Malaria eingesetzt wurde und noch wird, kann eine Hämolyse mit Immunkomplex-Bildung auslösen. Chinin löst die Produktion von IgM-Antikörpern aus, die sich mit dem Medikament verbinden. Dieser Medikamente-Antikörperkomplex bindet wiederum an die Zellmembran der Erythrozyten, aktiviert die Komplementkaskade und führt zur intravasalen Hämolyse. (Dhaliwal, Cornett et al. 2004)

1.2.4 Anämie bei Malaria

Eine Anämie in unterschiedlicher Ausprägung tritt bei jeder Form der Malaria auf. Sinkt der Hämoglobingehalt dabei unter 5 g/dl, oder der Hämatokritwert unter 15%, liegt definitionsgemäß eine schwere Malaria vor (WHO-Kriterien der schweren Malaria) (WHO 2015). Wie andere Formen der hämolytischen Anämie ist die der akuten Malaria in der Regel normochrom und normozytär. Die schwere Anämie hat eine entscheidende Rolle in Mortalität und Morbidität der Erkrankung.

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind noch nicht endgültig geklärt, auch ein Hauptmechanismus ist noch unbekannt (Ekvall 2003).

Befallene Erythrozyten rupturieren, wenn am Ende des Entwicklungszyklus der Plasmodien Merozoiten freigesetzt werden. Andere werden durch Phagozytose aus dem Blutkreislauf entfernt. Das Ausmaß des Parasitenbefalls korreliert mit der

direkten Hämolyse und der Schwere der Anämie. Bei hohen Parasitenwerten kann der Hämoglobinwert rasch absinken. (Perkins, Were et al. 2011)

Bei nicht betroffenen Erythrozyten wurde eine verkürzte Lebenszeit festgestellt. Sie gehen durch komplementgesteuerte Lyse und gesteigerter Phagozytose zugrunde (Mackintosh, Beeson et al. 2004). Rund 90% des Hämatokrit-Abfalls während einer akuten Malariainfektion sind durch diesen Mechanismus bedingt (Dondorp, Angus et al. 1999).

Intrazelluläre Prozesse mit beschleunigtem und verstärktem Verbrauch von Proteinen verändern die Membran des Erythrozyten, wodurch die Zelle an Flexibilität und Deformierbarkeit verliert. Auch nicht befallene Erythrozyten sind betroffen (Dondorp, Angus et al. 1999).

Ein weiterer Mechanismus, der im Zusammenhang mit der Anämie bei Malaria beschrieben wird, ist das ‚Rosetting‘. Nicht befallene Erythrozyten gehen hierbei über das *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) eine spontane Bindung mit einer infizierten Zelle ein. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass nach Ruptur des infizierten Erythrozyten Zellbestandteile an den nicht befallenen Zellen verbleiben. Dies vereinfacht die Immunerkennung und die Phagozytose in der Milz (Heddini 2002; Weatherall, Miller et al. 2002).

In der Milz werden bei einer akuten Malariainfektion veränderte Erythrozyten beschleunigt abgebaut. Zusätzlich eliminiert die Milz durch den Mechanismus des ‚pitting‘ Parasiten direkt aus zirkulierenden Erythrozyten (Angus, Chotivanich et al. 1997).

Ebenso scheinen Antikörper und unspezifische Immunreaktionen eine Rolle zu spielen (Dondorp, Angus et al. 1999).

Zusätzlich kann der erhöhte Zellumsatz durch eine ineffiziente Erythropoese nicht ausreichend kompensiert werden. Die Knochenmarkdepression wird mit unregelmäßigen Zytokin-Konzentrationen in Verbindung gebracht und hemmt die Blutbildung (Ekvall 2003).

Interaktionen zwischen Malariainfektion und anderen parasitären Infektionen sowie Mangelernährung können insbesondere in Endemiegebieten und besonders bei Kindern die Entstehung einer schweren Anämie negativ beeinflussen (Miller, Baruch et al. 2002; Ehrhardt, Burchard et al. 2006).

1.2.5 Hämolytische Anämie unter Artesunat-Therapie

Verzögerte Hämolyse nach Artesunat-Therapie wurde bei Patienten nach schwerer *P. falciparum* Malaria beobachtet (Zoller, Junghanss et al. 2011; Rolling, Schmiedel et al. 2012; White 2014). Nach 7 bis 31 Tagen fiel bei den Betroffenen ein erneuter Abfall des Hämoglobinwerts auf, nachdem sich die Blutwerte nach der akuten Malariainfektion zunächst wieder normalisiert hatten (Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012; Rolling, Schmiedel et al. 2012).

Laut eines Reviews von Rehmann et al., in dem alle vorhandenen Berichte über Hämolyse nach der Malaria-Therapie mit Artemisinin-Derivaten ausgewertet wurden, wurde der Nadir im Median für die niedrigsten Hämoglobin-Werte an Tag 15 nach Verabreichung der Medikation erreicht (Rehman, Lotsch et al. 2014).

Bei allen betroffenen Patienten waren zum Zeitpunkt der neu aufgetretenen Hämolyse die Malariasymptome abgeklungen und keine Plasmodien mehr im Blut nachweisbar. Der direkte Zusammenhang zur akuten Infektion oder dem Parasitenbefall schien daher nicht für den Untergang der Erythrozyten ursächlich (Arguin 2014; Jaureguiberry, Ndour et al. 2014).

In allen beschriebenen Fällen war die verspätete Hämolyse selbstlimitierend und es kam zu keinen schwerwiegenden Komplikationen. Bei einigen Patienten wurde jedoch die mehrfache Gabe von Bluttransfusionen notwendig.

In den großen Vergleichsstudien zwischen der Therapie mit Chinin und der Therapie mit Artesunat, die in endemischen Gegenden durchgeführt wurden, gibt es keinen Hinweis auf Ereignisse dieser Art. Die untersuchten Patienten wurden nach der medikamentösen Therapie keinem Follow-up unterzogen. Eine verzögerte Hämolyse in der hier beschriebenen Form wäre daher nicht aufgefallen (Dondorp, Nosten et al. 2005; Dondorp, Fanello et al. 2010).

Zoller et al. berichten in einer retrospektiven Analyse aus Europa von sechs Fällen mit Hämolyse nach Artesunat-Therapie. Hier wurde ein Zusammenhang zur Artesunat-Dosierung beschrieben. Die betroffenen Patienten hatten höhere Dosen bekommen als diejenigen ohne Hämolyse (Zoller, Junghanss et al. 2011).

Neben der verzögert-auftretenden Hämolyse wurden auch persistierende Formen der Hämolyse beschrieben. Bei diesen Patienten blieb ein Anstieg des Hämoglobinwertes nach der akuten Malariainfektion aus, die LDH-Werte blieben

erhöht. Dieser Zustand hielt bis zu vier Wochen an (Zoller, Junghanss et al. 2011; Rehman, Lotsch et al. 2014; Rolling, Agbenyega et al. 2015).

Es ließ sich für die beschriebenen Fälle bislang kein eindeutiger Mechanismus feststellen, der für die hämolytische Reaktion verantwortlich gemacht werden kann. Über die zugrundeliegenden pathophysiologischen Ursachen gibt es bisher noch keine eindeutige Erklärung (Raffray, Receveur et al. 2014; Rehman, Lotsch et al. 2014; Rolling, Agbenyega et al. 2015).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Für die vorliegende Arbeit wurde in einem prospektiven explorativen Studienansatz das Auftreten von therapieassoziierten selbstlimitierten Hämolysen nach Gabe des Medikamentes Artesunat bei schwerer Malaria untersucht. Bisher wurden Fälle von Hämolyse nach der Gabe von Artesunat hauptsächlich bei Reiserückkehrern in Europa festgestellt. Es sollte überprüft werden, ob diese Arzneimittelreaktion auch in endemischen Regionen wie Ghana auftritt und eine klinische Relevanz hat. Die schwere Malaria tritt dort hauptsächlich bei Kindern unter fünf Jahren auf, sie machen somit auch den größten Anteil an der erkrankenden Weltbevölkerung aus. Daher stehen afrikanische Kinder bei Fragestellungen, die das Risiko und das Nebenwirkungsprofil von Artesunat betreffen, in besonderem Fokus.

Erschwerend kommt hinzu, dass viele Kinder in Afrika ohnehin eine Anämie haben und eine weitere Verschlechterung schwerwiegender ausfällt als bei gesunden Erwachsenen (wie z.B. Reiserückkehrern) (Ehrhardt, Burchard et al. 2006). Schwere Anämie im Rahmen einer Malaria bei Kindern ist mit einer hohen Sterblichkeit verbunden (Phiri, Esan et al. 2012; Fanello, Onyamboko et al. 2017).

Auch die Transfusionstherapie unterliegt nicht denselben Sicherheitsstandards und kann zusätzliche Komplikationen nach sich ziehen.

In europäischen Ländern, in denen grundsätzlich die Gesundheitsversorgung besser ist als in afrikanischen Ländern, ist auch die Bereitschaft, bei Beschwerden einen Arzt aufzusuchen, höher, so dass eine Anämie diagnostiziert werden kann. In Afrika bleibt eine Wiedervorstellung und folglich eine Diagnose im Zweifelsfall aus, wodurch weitere Komplikationen auftreten können.

2 Material und Methoden

2.1 Studienort

Die Pilotstudie wurde zwischen April und September 2012 am Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Kumasi, Ghana durchgeführt.

In der Region um Kumasi sind 100% der Malariainfektionen durch *P. falciparum* bedingt (*World Malaria Report WHO 2013 Fact Sheet*). Die Übertragung ist ganzjährig holoendemisch, mit Schwankungen zwischen Regen- und Trockenzeit. In den beiden Regenperioden (Mai bis Juli und September) lassen sich Höchstwerte beobachten. In der Trockenzeit von Dezember bis April sinkt die Übertragungsrate (Ehlkes, Krefis et al. 2014).

Die Untersuchungen zur verzögerten Hämolyse wurden als Substudie der multizentrischen „Comparative, Open Label, Dose and Regimen Optimization Follow-up Study of Intravenous and Intramuscular Artesunate in African Children with Severe Malaria“ durchgeführt. (Pan African Clinical Trial Registry 201102000277177).

2.1.1 Ethik

Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission (comitee on Human Research and Ethics Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana) beraten und bewilligt.

Die Eltern oder Erziehungsberechtigten der Probanden wurden über Ablauf und Ziele der Studie aufgeklärt. Vorteile und mögliche Risiken, die sich durch eine Teilnahme ergeben könnten, wurden erläutert.

Die Ärzte, die das Aufklärungsgespräch abhielten, sprachen Englisch oder Twi (lokale Sprache). Das Einverständnis wurde mit Unterschrift oder Fingerabdruck eingeholt. Für Eltern oder Erziehungsberechtigte, die nicht lesen und schreiben konnten, wurden Zeugen eingesetzt, die ihre Anwesenheit bei den Aufklärungsgesprächen schriftlich bestätigten. Die Zeugen durften nicht Teil des Studienteams sein. Es wurden meist Eltern anderer Kinder oder Medizinstudenten eingesetzt.

2.2 Studienpopulation

2.2.1 Einschlusskriterien

- 1) Kinder zwischen 6 Monaten und 10 Jahren.
- 2) Klinische Diagnose einer schweren Malaria tropica, die eine stationäre Aufnahme bedarf.
- 3) Parasitämie ($>5,000$ asexuelle *P. falciparum*/ μL im initialen Dicken Tropfen).
- 4) Einwilligung durch ein Elternteil oder einen Erziehungsberechtigten, per Unterschrift oder Fingerabdruck.
- 5) Bereitschaft und Möglichkeit dem Studienprotokoll für den Zeitraum der Rekrutierung nachzukommen.

Tabelle 6: Studieneinschlusskriterien

2.2.2 Ausschlusskriterien

- 1) Bekannte, schwerwiegende Unverträglichkeit oder Hypersensibilität auf Artemisinin-Derivate.
- 2) Teilnahme an einer Interventionsstudie innerhalb der letzten 30 Tage vor Screening.
- 3) Adäquate (nach WHO- und landesspezifischen Leitlinien) Antimalaria-Therapie innerhalb 24 Stunden vor Aufnahme.

Tabelle 7: Studienausschlusskriterien

2.3 Studienablauf

Jedes rekrutierte Kind wurde 28 Tage beobachtet. Stationäre Aufnahme, Screening und erste Artesunat-Dosis bezeichneten Tag 0. Die Dauer des stationären Aufenthaltes betrug mindestens drei Tage zur kontinuierlichen parenteralen Therapie. Abhängig vom individuellen Allgemeinzustand des jeweiligen Kindes konnte auch ein längerer Aufenthalt notwendig werden. Nach Entlassung folgten drei weitere Termine zum Follow-up (dazu siehe 2.3.2).

Die Studienprozeduren an den jeweiligen Tagen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

	Screening/ Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 28
Einverständniserklärung	X			
Stationäre Aufnahme	X			
Vitalparameter	X	X	X	X
Klinische Symptome	X	X	X	X
Körperliche Untersuchung	X			
Blutbild/ Hämatologie	X	X	X	X
Klinische Chemie	X	X	X	X
Parasitologische Untersuchung - Dicker Tropfen	X	X	X	X
Artesunatgabe	X			

Tabelle 8: Maßnahmen der Studie im zeitlichen Überblick nach Studienprotokoll

2.3.1 Medikamentöse Therapie

Alle Kinder wurden mit einer Gesamtdosis von 12 mg/kg Körpergewicht parenteralem Artesunat (Guilin Pharmaceutical Company, Shanghai, China) behandelt.

Die weitere adjuvante Therapie erfolgte nach Maßgaben des behandelnden Arztes.

Nach Abschluss der parenteralen Therapie folgten sechs gewichtsadaptierte Dosen Artemether/Lumefantrin 20mg/120mg (Coartem®, Novartis Pharmaceutical Company, Suffern, New York, USA) oral als Anschlussbehandlung nach dem in Tabelle 9 abgebildeten Schema.

Körpergewicht	Dosis Artemether/Lumefantrin
5kg-15kg	2 Tabletten/ Tag (1-0-1)
15kg- 25kg	4 Tabletten/ Tag (2-0-2)
25kg- 35kg	6 Tabletten/ Tag (3-0-3)
>35kg	8 Tabletten/ Tag (4-0-4)

Tabelle 9: Dosis-Schema Artemether/Lumefantrin 20mg/120mg

Ferner erhielt jeder Patient unterstützend Folsäure oral für mindestens 14 Tage.

Der diensthabende Arzt erhob bei Aufnahme eine ausführliche Anamnese. Bei jedem Kind wurde eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Die Körpertemperatur

wurde axial mit den Thermometern vor Ort gemessen. Puls-, Atemfrequenz- und Blutdruckmessungen wurden bestimmt und in den entsprechenden Case Report Forms (CRF) dokumentiert.

2.3.2 Wiedervorstellung und Follow-up

Die Studienteilnehmer wurden an Tag 7, 14 und 28 zu Follow-up-Untersuchungen wiedereinbestellt. Zu jedem der drei Termine wurden die Kinder klinisch untersucht, die Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Atemfrequenz, Blutdruck) gemessen. Anamnestisch wurde nach erneuten Fieberepisoden oder anderen klinischen Symptomen einer Malariainfektion gefragt. Insbesondere das Auftreten von Arzneimittel-Nebenwirkungen bzw. Unverträglichkeiten des Artesunat wurden im Anamnesegespräch und durch körperliche Untersuchung evaluiert und gegebenenfalls im CRF dokumentiert.

2.4 Blutuntersuchungen

Zur Malariadiagnostik wurden aus venösem Blut Dicke Tropfen und dünne Blutausstriche angefertigt. Jede mikroskopische parasitologische Untersuchung wurde vor Ort von zwei Laboranten durchgeführt (zur Technik des Erregernachweises siehe unten).

Blutuntersuchungen (Blutbild, klinische Chemie) waren an den Tagen 0, 7, 14 und 28 vorgesehen. Das Blut am Tag 0 wurde vor der ersten Artesunatgabe entnommen.

Hämoglobin-, Hämatokrit-, Leukozyten-, Thrombozyten-, Erythrozytenwerte und Gesamtbilirubin wurden im Labor am KATH mit Sysmex KX-21N und Selectra PROs (EliTech Clinical Systems) bestimmt.

Die Retikulozyten wurden in Supravital-Färbung manuell ausgezählt (zum Verfahren siehe unten).

Die Serumproben wurden vor Ort abzentrifugiert und bei – 20°C gelagert. Im Labor Fenner in Hamburg wurden die Werte für Haptoglobin und LDH bestimmt.

2.4.1 Anfertigung des Blutausstrichs

Zur Anfertigung eines Blutausstrichs wird ein kleiner Tropfen von etwa 5 µl Blut auf einen Objektträger gegeben. Mit der Kante eines zweiten Objektträgers wird der

Tropfen dann in einem Winkel von 45° ausgestrichen und luftgetrocknet. Anschließend folgt die Fixierung mit Methanol und die Färbung nach Giemsa (Moody 2002; Löscher, Burchard et al. 2010).

2.4.2 Anfertigung Dicker Tropfen

Zur Anfertigung eines Dicken Tropfens wird etwa 10 µl Blut auf einen Objektträger gegeben. Das Blut wird dann mit der Ecke eines weiteren Objektträgers durch kreisende Bewegungen verteilt, bis eine Fläche von etwa einem cm² entstanden ist. Durch den so entstandenen Dicken Tropfen soll gedruckte Schrift lesbar sein. Der Dicke Tropfen wird vollständig an der Luft getrocknet und dann nach Giemsa eingefärbt. Eine Fixierung erfolgt hier nicht. Es handelt sich um ein Anreicherungsverfahren (Moody 2002; Löscher, Burchard et al. 2010).

2.4.3 Retikulozytenzählung

Retikulozyten sind die Vorstufe des reifen Erythrozyten. Der RNS- Gehalt der Zellen ist noch so hoch, dass er im Durchflusszytometer oder im Mikroskop erkannt werden und so von der reifen Form unterschieden werden kann (Thomas 2012).

Für die supravitale Retikulozyten-Färbung wurde zu gleichen Teilen EDTA- Blut mit Brilliantkresylblau in einem Reaktionsgefäß gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten wurde aus dem Gemisch ein Ausstrich hergestellt und luftgetrocknet. Durch die Färbung wird in den Retikulozyten ein netzförmiges Präzipitat (Substantia reticulo filamentosa) sichtbar, das sich blaugefärbt darstellt (Thomas 2012).

Die anschließende Zählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop und Ölimmersion bei 100facher Vergrößerung. Dafür wurden alle Zellen mit bläulichem Zellinhalt pro 1000 Erythrozyten gezählt und ihr Prozentanteil errechnet.

2.4.4 Parasitologische Untersuchung

Für die Bestimmung der Parasitämie wurden zunächst aus venösem antikoaguliertem (EDTA) oder kapillärem Blut je zwei dünne Ausstriche und zwei Dicke Tropfen auf Objektträgern angefertigt.

Hierzu wurden die lufttrockenen Präparate (der Dicke Tropfen unfixiert, und der Blutausstrich methanolfixiert) mit einer 3%igen Giemsa-Lösung (BDH Gurr Giemsa's stain solution in Puffer) eingefärbt. Nach 45 Minuten wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet.

Anschließend erfolgte die Beurteilung lichtmikroskopisch unter Ölimmersion bei 100facher Vergrößerung.

Im Dicken Tropfen wurden pro Blickfeld Parasiten und Leukozyten ausgezählt, bis eine Gesamtzahl von 200 Leukozyten erreicht war. Betrug die Parasitenzahl weniger als 9, wurde bis 500 Leukozyten weitergezählt.

Mit folgender Formel wurde die Parasitenanzahl berechnet:

$\frac{\text{Anzahl Parasiten} \times \text{Leukozyten pro ml Blut}}{\text{gezählte Leukozyten (200 bzw. 500)}}$
--

Tabelle 9: Formel für die Berechnung der Parasitenzahl

Im Blutausstrich wurden insgesamt 1000 Erythrozyten gezählt und der befallene Anteil bestimmt.

Ein Blutausstrich wurde erst dann als negativ bewertet, wenn mindestens 200 parasitenfreie Blickfelder begutachtet worden waren.

2.5 Studienziele

Primäres Studienziel war es die Inzidenz von verzögerter, therapieassoziierter Hämolyse ab Tag 14 nach parenteraler Artesunatgabe zu bestimmen.

Die Definition einer Hämolyse war festgelegt als gleichzeitiger Abfall des Hb-Werts und Anstieg des LDH-Wertes zwischen Tag 7 und Tag 14 und einem Haptoglobin-Wert < 0,30 mg/dl an Tag 14. Anämie war über einen Hb- Wert < 8 g/dl, schwere Anämie über einen Hb-Wert < 5 g/dl definiert.

Sekundärer Endpunkt war der Vergleich zwischen den Gruppen mit und ohne verzögerter Hämolyse im Hinblick auf demografische, klinische und biochemische Daten.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem SPSS- Paket 17.7 durchgeführt.

Zur Beschreibung der Studienpopulation dienten deskriptive Analysen; für normal verteilte Parameter wurde das arithmetische Mittel gebildet, für nicht normal verteilte Parameter das Median; kategoriale Variablen wurden anhand ihrer Häufigkeiten beschrieben,

Um die Signifikanz eines Unterschiedes zweier numerischer Variablen in den unabhängigen Gruppen (Hämolyse vs. keine Hämolyse) zu bestimmen, wurde

aufgrund der niedrigen Fallzahl ein nichtparametrischer Signifikanztest (Mann-Whitney-U) eingesetzt.

Zudem wurde zum Vergleich von kategorischen Variablen (z.B: Geschlecht, Alter) der Chi² oder Fisher exact Test angewandt.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl wurde auch auf die logistische Regression zum Hinweis auf die Eintretenswahrscheinlichkeit einer Hämolyse in Abhängigkeit möglicher Einflussgrößen verzichtet.

2.7 Material

2.7.1 Material am Studienort in Ghana

2.7.1.1 Laborgeräte

- Sysmex KX-21N
- Selectra PROs (EliTech Clinical Systems)
- Mikroskop: Leitz LABORLUX 11 (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Type 020-435028 512718, made in Germany)
- Zentrifuge: Clay adams Brand, Compact II Centrifuge
- Whirlpool Quick Chill

Tabelle 10: Laborgeräte Ghana

2.7.1.2 Blutentnahme

- EDTA-Röhrchen: P- Smart/ VACUUM TUBE sterile/ EDTA. K3 5ml
- Biochem.: Vacuum Tube/ Gel Clot Activator 4 ml/ ADD Surgifiled medicals Meddlesex England

Tabelle 11: Material Blutentnahme

2.7.1.3 Giemsa-Färbung

- BDH Gurr, Microscopy, Giemsa's stain solution, improved R 66 (contains methanol), Prod 350865P; VWD International Ltd. Poole, BH15 1TD, England
- Buffer pH 7,00 ± 0,02 tablets, 50 Tablets Ref. 3315525; VWD BDH PROLABO, Made in EC, EMB 45053
- AnalAR NORMAPUR (2,5l), Methanol; UN 1230, made in EC- EMB 45053, EC label: 200-659-6

Tabelle 12: Material Giemsa Färbung

2.7.1.4 Retikulozyten-Färbung

- Microscopy, Brilliantkresylblau-Lösung 100ml, Hx 106155, IVD; 1.01384.0100, 2014/01/31; Merck kGaA, 64271 Darmstadt, Germany

Tabelle 13: Material Retikulozyten-Färbung

2.7.1.5 Öl für Mikroskop

- Cargille non-drying immersion oil for microscopy, Type A Formula: Code 1248, Standardized at 23°C; Cargille Laboratories, Ceder Grove, NJ 07009 USA

Tabelle 14: Öl für Mikroskop

2.7.2 Material in Deutschland

Die Werte der klinischen Chemie wurden entsprechend der Standardverfahren im Labor Fenner in Hamburg bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Demografische und klinische Parameter der rekrutierten Kinder

Von April bis September 2012 wurden insgesamt 53 Kinder mit Zeichen der schweren Malaria in die Studie eingeschlossen. Bei allen wurde eine Infektion durch

P. falciparum nachgewiesen und gemäß WHO-Kriterien eine schwere Malaria diagnostiziert. Alle wurden mit einer Gesamtdosis von 12 mg/ kg Körpergewicht (KG) Artesunat behandelt. Tabelle 15 gibt einen Überblick über demografische und klinische Parameter der rekrutierten Kinder bei Einschluss in die Studie, sowie über relevante Laborparameter (Blutbild und klinischer Chemie) bei Aufnahme.

Parameter		Normwerte
N	53	-
Alter in Monaten, Median (Interquartilbereich IQR)	30 (25-98)	-
Weibliches Geschlecht, n (%)	16 (30)	-
Temperatur, °C, Median (IQR)	37,80 (1-2)	≥ 36 – ≤ 37,5
Geometrisches Mittel der asexuellen <i>P. falciparum</i> am Tag 0 [μ l]	309931 (221655; 398208)	-
Hämoglobin [g/dl]	7,30 (6,60; 7,99)	11 – 18
Leukozyten [μ l]	10,59 (9,41; 11,76)	2,5 – 8,0
Thrombozyten [$10^3/\mu$ l]	77,01 (57,20; 96,83)	140 – 440
Glukose [mmol/l]	5,25 (4,59; 5,91)	> 2,2
Kreatinin [μ mol/l]	42,74 (20,01; 65,46)	20 – 124
Bilirubin gesamt [mg/dl]	1,64 (1,35; 1,92)	< 67
Bluttransfusion n (%)	25 (47,2%)	-
Todesfälle	2	-

Tabelle 15: Demografische und klinische Parameter der rekrutierten Kinder im Überblick. Angaben im Mittelwert (95%-Konfidenzintervall), soweit nicht anderweitig angegeben; Normwerte gemäß der Standards am Studienort

25 der 53 Kinder (48,1%) erhielten Bluttransfusionen bei niedrigen Hb-Werten nach Ermessen des behandelnden Arztes.

Zwei Kinder verstarben noch am Tag der Einweisung im Krankenhaus. Im Verlauf gab es keine weiteren Todesfälle.

3.2 Kriterien für schwere Malaria

Die Häufigkeit der Symptome, die die Kinder mit einer schweren Malariainfektion nach WHO-Kriterien bei Aufnahme zeigen, wird in Tabelle 13 und Abbildung 3

aufgeführt. Zur Diagnosestellung war zusätzlich zum Parasitennachweis mindestens ein Kriterium vorhanden.

Dabei war ‚Bewusstseinsbeeinträchtigung‘ mit 84,9% (45/53) das am häufigsten dokumentierte Kriterium. Es wurde die Blantyre Coma Scale (BCS) angewandt.

Eine Hyperparasitämie konnte bei 54,7% (29/53) der Kinder nachgewiesen werden.

Die Kriterien Azidose, Hyperlaktatämie, Lungenödem, spontane Blutung und disseminierte intravasale Gerinnung kamen bei keinem der Kinder vor bzw. wurden nicht gemessen.

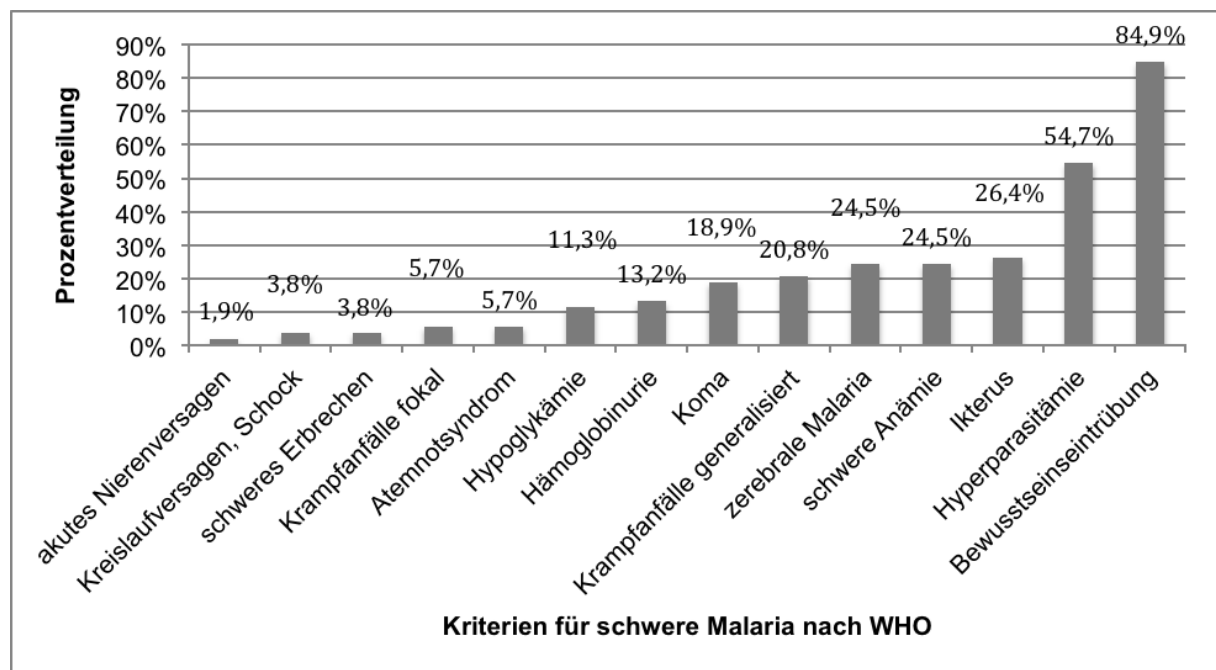


Abbildung 3: Kriterien für schwere Malaria nach WHO: Häufigkeitsverteilung im Patientenkollektiv; Veranschaulichung der WHO-Kriterien im Balkendiagramm

3.3 Auswertung der erhobenen Daten

Von 39 der 53 Studienteilnehmer lagen komplette Datensätze für die Parameter Hämoglobin und Laktatdehydrogenase an Tag 7 und 14 und für Haptoglobin an Tag 14 vor. Diese konnten in die statistische Auswertung einbezogen werden. 14 unvollständige Datensätze konnten nicht für die Endanalysen genutzt werden. Gründe hierfür waren fehlendes Erscheinen zu den Follow-up Untersuchungen und nicht ausreichendes Probenmaterial für die Laboruntersuchungen in Deutschland.

3.4 Patienten mit verzögerter Hämolyse an Tag 14

Vier der 39 Kinder boten Zeichen der verspäteten Hämolyse nach oben genannter Definition. Die relative Häufigkeit lag somit bei 9%.

Drei der betroffenen Kinder waren Jungen. Nur eines der Kinder war älter als 24 Monate.

Bei allen Kindern mit Zeichen einer verzögerten Hämolyse wurde bei Aufnahme eine Parasitendichte von über 200 000/μl asexuelle *P. falciparum* nachgewiesen. Dies entspricht laut WHO einer Hyperparasitämie. Zwei Kinder boten bei Aufnahme Zeichen der zerebralen Malaria, eines mit generalisierten Krampfanfällen. Bei einem Kind wurde eine schwere Anämie festgestellt.

Zwei der Kinder erhielten am Tag der Aufnahme Bluttransfusionen.

Bei keinem der Kinder waren am Tag 14 asexuelle Parasiten (*P. falciparum*) im Blut nachweisbar.

Die Daten für Tag 28 konnten bei zwei der vier betroffenen Kinder verwendet und ausgewertet werden. Bei beiden waren die Werte für Hämoglobin und LDH zu diesem Zeitpunkt wieder im Normbereich. Die restlichen Daten fehlen aufgrund von Nichterscheinen zum Follow-up-Termin.

Patient	Geschlecht	Alter; Monate	Hb (g/dl) Tag 0	Hb (g/dl) Tag 7	Hb (g/dl) Tag 14	Hb (g/dl) Tag 28	ΔHb (g/dl) (Tag 14- Tag 7)	ΔLDH (U/l) (Tag14- Tag 7)	Parasitendichte (/μl)
H1	w	24	4,1*	6,8	6,0	10,1	-0,8	460	391 465
H2	m	6	6,6*	7,0	2,8**		-4,2	1013	466 745
H3	m	24	11,4	9,3	8,6	10	-0,7	242	316 800
H4	m	63	11,3	9,5	9,0		-0,5	118	223 125

(*: Hb nach Transfusion betrug H1: 6,8 g/dl, H2: 9,0 g/dl; **: kein Hb-Wert nach Transfusion vorhanden)

Tabelle 16: Übersicht wichtiger Daten bei Patienten mit verzögerter Hämolyse

3.4.1 Fallbeschreibung eines Patienten mit Hämolyse an Tag 14

Patient H2 wurde am Tag 14 mit erneut aufgetretener Schwäche in die Kinder-Notaufnahme gebracht. Der Hb-Wert betrug 2,8 g/dl und der Patient erhielt mehrere Bluttransfusionen. Der Allgemeinzustand konnte stabilisiert und der Patient zur weiteren Diagnostik in die „National Pediatric Oncological Unit“ in Accra überwiesen

werden. Dort wurde eine maligne Zweiterkrankung als Ursache für die erneute massive Hämolyse ausgeschlossen.

Der Patient erschien nicht mehr zur Follow-up-Untersuchung an Tag 28, daher stehen keine Daten des weiteren Verlaufs zur Verfügung. Vier Monate nach der Rekrutierung hatten sich allerdings alle Laborwerte und der Allgemeinzustand wieder normalisiert.

Keiner der anderen Patienten zeigte an Tag 14 relevante klinische Symptome oder Auffälligkeiten und es mussten keine weitere Therapie eingeleitet werden.

3.4.2 Zeitliche Verläufe der relevanten Laborparameter

Abbildung 5 veranschaulicht links die zeitlichen Verläufe von Hb- und LDH- Werten der einzelnen vier Patienten mit Hämolyse und im Gruppenvergleich.

Die Hb-Werte fallen an Tag 14 ab (Mittelwert ΔHb Tag 14-Tag 7: -1,55 mg/dl), während die LDH-Werte ansteigen (Mittelwert ΔLDH Tag 14- Tag 7: 458,25 U/l).

Auf der rechten Seite werden die Mittelwerte der Patienten mit Hämolyse (blaue Kurve, Rauten) mit den Mittelwerten der Patienten ohne Hämolyse (rote Kurve, Quadrate) übereinander abgebildet. Der Graph der Gruppe ohne Hämolyse verläuft nahezu linear, für die Hb-Werte ansteigend, die LDH-Werte fallend. Der Graph, der die Daten der Hämolyse-Gruppe wiedergibt, fasst die Einzelgraphen zusammen. Die Gesamttendenz zeigt: Je stärker der Hb-Wert zwischen Tag 7 und Tag 14 abgesunken ist, desto höher war die gemessene LDH-Aktivität als Maß für die Hämolyse.

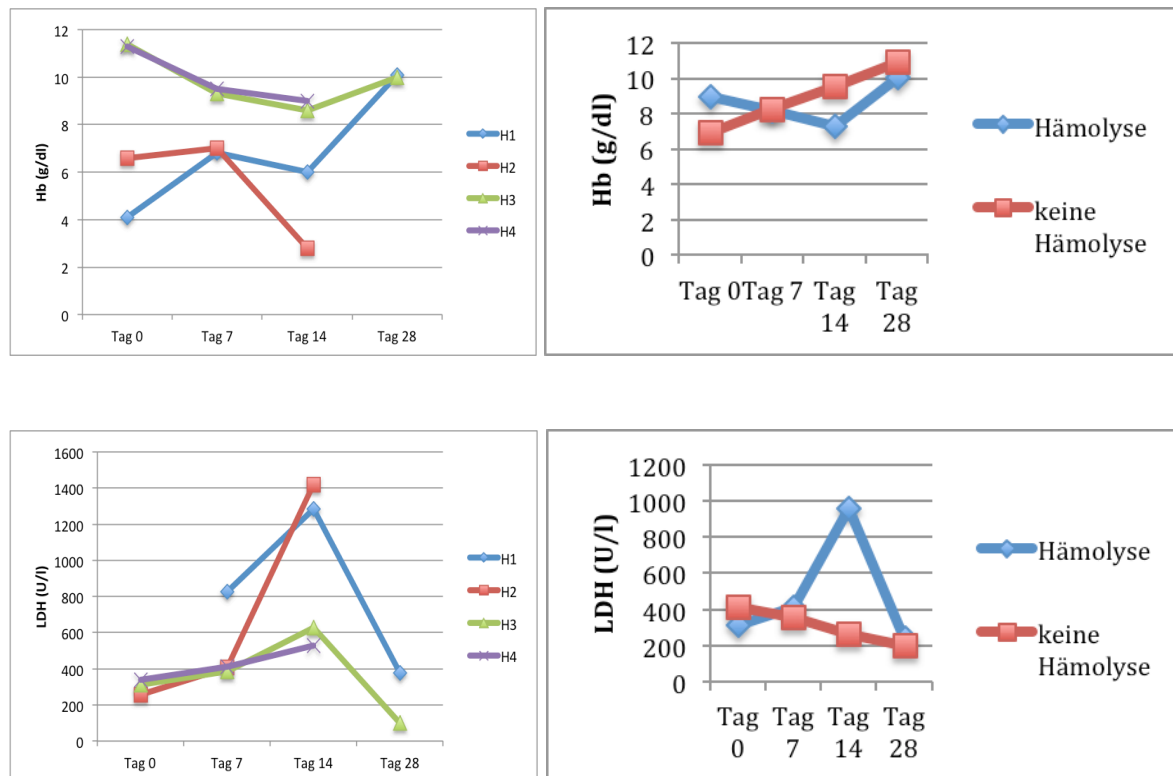


Abbildung 4: Zeitliche Verläufe von Hb- und LDH-Werten

3.5 Vergleich der Gruppen im Man-Whitney-U-Test

Tab. 18 zeigt die Ergebnisse im Gruppenvergleich nach Mann-Whitney.

Einen signifikanten p-Wert ergab sich beim Vergleich der Hb- und LDH-Werte an Tag 14 ($p[\text{Hb}] = 0,017$; $p[\text{LDH}] < 0,002$). Da dies gleichzeitig Teil der Fragestellung des primären Endpunktes war, verwundert es jedoch nicht.

Für den Großteil der übrigen berechneten Variablen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, es zeichnen sich aber Auffälligkeiten ab.

In der Gruppe Hämolyse fallen höhere Parasitenwerte (349 534 vs. 284 526/ μl) und ein geringeres Durchschnittsalter (24 vs. 33 Monate) auf, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu präsentieren.

Die Geschlechterverteilungen ähneln sich bei einer Abweichung von 6%, soweit diese aufgrund der geringen Fallzahl in der Hämolyse-Gruppe repräsentativ ist.

Bei dem WHO-Kriterium Hyperparasitämie ergab sich ebenfalls ein signifikanter p-Wert von 0,048. In der Gruppe Hämolyse waren alle Patienten hyperparasitäm.

	Keine Hämolyse an Tag 14	Hämolyse an Tag 14	p-Wert
N	35	4	-
Alter in Monaten, Median (IQR)	33 (35)	24 (0,0)	0,431
Female gender, n (%)	11 (31,4)	1 (25)	
Geometrisches Mittel der asexuellen <i>P. falciparum</i> am Tag 0 (/μl)	284 526 (169 351; 399 700)	349 534 (183 793; 515 374)	0,267
WHO- Kriterium Hyperparasitämie, n (%)	26 (74,3)	4 (100)	0,048 (chi ²)
Hb Tag 0 (g/dl)	7,0 (6,0; 7,9)	8,35 (2,6-14,10)	0,487
Leukozyten Tag 0 (/μl)	10 676 (9 117; 12 235)	13 050 (2 775; 23.325)	0,517
Glukose Tag 0 (mmol/l)	5,2 (4,2; 6,1)	4,3 (0,0; 9,6)	0,643
Kreatinin Tag 0 (μmol/l)	52,3 (14,7; 89,8)	32,0 (5,8; 58,1)	0,961
Bilirubin gesamt Tag 0 (mg/dl)	1,6 (1,16; 1,95)	0,97 (-0,04; 1,97)	0,329
Transfusion Tag 0, n (%)	18 (27,3)	2 (50)	
Hb Tag 14 (g/dl)	9,6 (9,0; 10,1)	6,6 (2,0; 11,2)	0,017
LDH Tag 14	290,2 (245,0; 335,5)	964,8 (244,1; 1685,4)	<0,002

Tabelle 17: Vergleich der Patientengruppen; Mittelwerte (95%- Konfidenzintervall), soweit nicht anderweitig angegeben

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Studie konnte bei 4 der 39 Probanden mit kompletten Datensätzen am Tag 14 nach der initialen Verabreichung eine verspätete Hämolyse nachgewiesen werden. Die relative Häufigkeit liegt bei 9,3 % und das Auftreten einer hämolytischen Anämie nach Artesunat-Gabe kann gemäß WHO-Klassifizierung als eine häufige unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung angesehen werden.

sehr häufig	$\geq 1/10$	($\geq 10\%$)
häufig	$\geq 1/100$ und $< 1/10$	($\geq 1\%$ und $< 10\%$)
gelegentlich	$\geq 1/1.000$ und $< 1/100$	($\geq 0,1\%$ und $< 1\%$)
selten	$\geq 1/10.000$ und $< 1/1.000$	($\geq 0,01\%$ und $< 0,1\%$)
sehr selten	$< 1/10.000$	($< 0,01\%$)

Tabelle 18: Klassifizierung der Häufigkeit unerwünschter Arzneimittelwirkungen (Höffler 2005)

Eines der Kinder (H2) wurde von seinen Eltern zur Follow-up Untersuchung an Tag 14 mit neu aufgetretenen Zeichen von Krankheit und Schwäche vorgestellt. Mit einem Hämoglobinwert von 2,8 g/dl und auffälligen Hämolyseparametern wurden Erythrozytenkonzentrate transfundiert. Es konnten keine Malariaparasiten im *Dicken Tropfen* nachgewiesen werden. Trotz ausführlicher interdisziplinärer Untersuchungen konnte keine andere Ursache für das hämolytische Ereignis gefunden werden.

Die anderen drei Patienten, bei denen laborchemisch niedrigen Hämoglobinwerte bestimmt wurden, zeigten in der klinischen Untersuchung keinerlei Auffälligkeiten.

Ohne die Kontrollen im Rahmen des studienbedingten Follow-ups wäre die Anämie wohl nicht aufgefallen. Eine Ausnahme stellt Patient H2 dar, der aufgrund klinischer Auffälligkeiten bei einem Hb-Wert von 2,8 g/dl von seinen Eltern vorgestellt wurde.

Alle vier Patienten erholten sich vollständig innerhalb des Beobachtungszeitraums. Von zwei der vier Patienten liegen Hb-Werte für die Nachkontrolle an Tag 28 vor, die sich jeweils im Normbereich befinden.

Diese Studie ist die erste prospektive Studie zu dieser Fragestellung und die erste, die in einem Endemiegebiet durchgeführt wurde.

Alle weiteren Berichte stammen vorwiegend aus Zentren in Europa, betreffen meist erwachsene Reiserückkehrer und sind retrospektive Analysen (Caramello, Balbiano et al. 2012; Eder, Farne et al. 2012; Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012; Rolling, Schmiedel et al. 2012; Jaureguiberry, Ndour et al. 2014; Rolling, Agbenyega et al. 2015).

Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass therapieassoziierte Hämolysen außerhalb Europas auftreten und eine klinische Relevanz haben.

In Endemiegebieten erkranken insbesondere Kinder unter 5 Jahren an schwerer Malaria. Durch bereits bestehende Anämien im Zusammenhang mit Mangelernährung und anderer Infektionserkrankungen kann eine zusätzliche

therapieassoziierte Hämolyse ein deutliches gesundheitliches Risiko nach sich ziehen (Ehrhardt, Burchard et al. 2006; Burdam, Hakimi et al. 2016).

4.2 Kritische Betrachtung von Material und Methodik

Bezüglich des primären Endpunktes ließ sich durch die Pilotstudie zeigen, dass Hämolysen nach der Therapie mit Artesunat in Afrika auftreten. Die Interpretation und Aussagekraft der weiteren explorativen Analysen sind durch folgende Faktoren limitiert und dadurch nur eingeschränkt verwertbar.

4.2.1 Studiendesign

Zunächst muss berücksichtigt werden, dass es sich um eine Pilotstudie handelt. Sie wurde als Erweiterung der bereits laufenden vergleichenden *SMAC*- Studie durchgeführt. Daher waren die Rahmenbedingungen bereits festgelegt und das Studienprotokoll wurde zu großen Teilen übernommen. Es bestand geringer Handlungsspielraum bei der Modifizierung des Protokolls.

Um die Aussagekraft der Studie zu verstärken, wäre die Gegenüberstellung mit einer Kontrollgruppe in einem randomisierten kontrollierten Ansatz sinnvoll gewesen.

Bei der Wahl einer geeigneten Kontrollgruppe wäre Chinin als Therapieoption infrage gekommen. Da die Überlegenheit von Artesunat in umfangreichen Vergleichsstudien bereits belegt wurde, wäre dies aber ethisch nicht vertretbar gewesen.

In der Literatur wurden retrospektive Daten als Kontrollgruppenäquivalent genutzt um die Aussagekraft zu verstärken. Ergebnisse aus verschiedenen europäischen Zentren und die klinische Erfahrung zeigten, dass es unter alleiniger Chinin-Therapie nicht zu Hämolysen kam (Rolling, Wichmann et al. 2013; Rolling, Agbenyega et al. 2014; Jaureguiberry, Thellier et al. 2015; Kurth, Develoux et al. 2015).

4.2.2 Fallzahl

Ein zweiter Aspekt, der die Aussagekraft der explorativen Analysen hinsichtlich möglicher Risikofaktoren besonders einschränkt, ist die geringe Fallzahl. Hier war einerseits der festgelegte Studienzeitraum entscheidend. Im Umkehrschluss hätte eine längere Zeitspanne auch mehr Probanden bewirkt.

Die Fallzahl wurde aber durch unvollständige Datensätze noch weiter reduziert.

Im Rekrutierungszeitraum sollte jedes Kind mit Zeichen einer schweren Malaria in die Studie aufgenommen werden.

In der pädiatrischen Notaufnahme kam es durch Schichtdienst und Rotation zum häufigen Wechsel des ärztlichen Personals, das im Rekrutierungsvorgang mit beteiligt war. Somit waren die Studieninhalte nicht immer ausreichend präsent. Daher bekamen Kinder mit dem klinischen Bild einer Malariainfektion häufig schon vor Erhalt der Blutergebnisse Chinin, da es während des Studienzeitraumes noch die Standardtherapie war und Artesunat nur im Rahmen der Studie verfügbar war.

Diese Kinder konnten nach Bestätigung einer Parasitämie nicht mehr in den Rekrutierungsprozess aufgenommen werden.

Diese Limitierung ist hauptsächlich durch eine schwache Kommunikation zu erklären und wäre minimierbar gewesen.

Unvollständige Datensätze kamen auch dadurch zustande, dass Patienten nicht mehr, unregelmäßig oder sehr verspätet zu den Follow-up-Untersuchungen erschienen sind. Meist waren hierfür lange Anfahrten und das Fehlen eines festen Wohnsitzes ursächlich. Weitere Ursachen für die mangelnde Compliance sind fehlendes Verständnis, Analphabetismus und niedriger Bildungsstand.

Es kann auch davon ausgegangen werden, dass Eltern nach Entlassung und Genesung ihrer Kinder eine Wiedervorstellung nicht mehr für nötig gehalten haben oder mögliche finanzielle Risiken zu groß erschienen (Osei and Commey 1994; Yeboah-Antwi, Gyapong et al. 2001).

Die Proben von Tag 7 und 14 waren für die Fragestellung einer verzögerten Hämolyse besonders entscheidend.

Zum Teil war das Material, das für die Laboruntersuchungen in Deutschland vorbereitet wurde, nicht ausreichend.

Am Ende des Beobachtungszeitraums waren Datensätze unvollständig und konnten daher nicht in die Endanalyse eingehen.

Bei 10 Kindern waren die Datensätze für Tag 14 nicht vollständig. Es kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es bei ihnen zu hämolytischen Veränderungen gekommen ist.

Bei den Kindern, die nicht zur Follow-up-Untersuchung erschienen sind, kann vermutet werden, dass keine schwerwiegenden klinischen Symptome aufgetreten sind. Ansonsten wäre es wohl eher zu einer Wiedervorstellung gekommen.

Dennoch ist dieser der erste prospektive Studienansatz zum Thema, der eine Aussage zur Inzidenz und Auftretenswahrscheinlichkeit von verzögert auftretenden Hämolysen nach Artesunat-Therapie in endemischer Region machen kann.

4.3 Interpretation und Vergleich der Ergebnisse mit dem gegenwärtigen Forschungsstand

4.3.1 Überblick über die Fallberichte und Studienergebnisse

Eine alleinige Interpretation der Ergebnisse sowie der demografischen Angaben der vier Kinder in dieser Studie ist aufgrund der kleinen Fallzahl nur eingeschränkt möglich. Um die Aussagekraft zu verstärken, ist es sinnvoll, zusätzliche Veröffentlichungen hinzuzuziehen und deren Ergebnisse in die Diskussion zu integrieren.

Der Großteil der veröffentlichten Daten geht aus retrospektiven Analysen hervor. Zusätzlich finden sich Einzelfallberichte (Caramello, Balbiano et al. 2012). Die meisten der erhobenen Daten beziehen sich auf erwachsenen Reiserückkehrer und wurden aus Europa, Großbritannien, den USA und Kanada veröffentlicht.

Diese Studie war der erste prospektive Ansatz, es folgten weitere im Verlauf.

4.3.1.1 Ergebnisse aus retrospektiven Studien und Fallberichten

Die ersten Berichte von Hämolysen nach der Therapie mit Artemisinin-Derivaten stammen von Zoller et al. In einer retrospektiven Analyse wurden insgesamt 25 Patienten aus sieben europäischen Zentren untersucht, von denen sechs Hämolyse entwickelten. Die Betroffenen hatten höhere Artesunat-Dosen erhalten (Zoller, Junghanss et al. 2011)

In einer weiteren Studie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, der Fallberichte vorausgingen, wurden Artesunat- und Chinin-Therapie bei Erwachsenen miteinander verglichen. Bei fünf Patienten wurde eine hämolytische Reaktion festgestellt. Drei der Fälle traten nach intravenöser Artesunat-Therapie auf, die anderen nach Chinin-Therapie, allerdings hatten beide Patienten zusätzlich intrarektales Artesunat erhalten. Alle Patienten waren im akuten Krankheitsstadium

hyperparasitäm. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie und den oben beschriebenen (Rolling, Wichmann et al. 2013; Rolling, Agbenyega et al. 2014).

Aus den Niederlanden und Belgien stammen Daten von 68 Patienten. Bei sechs von ihnen wurde eine verzögerte hämolytische Reaktion nach Artesunat-Therapie gesehen (Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012).

Weitere Fallberichte stammen aus Italien, dem asiatischen Raum, Kanada und den USA. (Caramello, Balbiano et al. 2012; Eder, Farne et al. 2012; MMV 2013; March; Paczkowski, Landman et al. 2014)

Im Gesamtüberblick stammen die Studien und Fallberichte alle aus nicht-endemischen Ländern. Das weibliche Geschlecht war ebenso betroffen wie das männliche. Die Betroffenen sind fast ausschließlich nicht-immune erwachsenen Reiserückkehrer oder Immigranten, die aus einem Heimaturlaub zurückgekehrt waren. Dieses Ergebnis ist wohl durch die konsequenteren Nachkontrolle im Rahmen der besseren Infrastruktur und nicht zwingend an Wahrscheinlichkeit oder Risiko (Rehman, Lotsch et al. 2014).

4.3.1.2 Ergebnisse aus prospektiven Studienansätzen

Im Hinblick auf prospektive Studien sind bisher deutlich weniger Ergebnisse publiziert. Die Publikation von Rolling et al, in der auch die hiesigen Daten zusammen mit Daten aus Gabun ausgewertet wurden, war die erste mit Studienstandort im endemischen Raum. Von 72 rekrutierten Kindern waren insgesamt fünf betroffen (Rolling, Agbenyega et al. 2014).

In einer prospektiven Studie aus Frankreich wurden insgesamt 123 Patienten einschlossen, die mit Artesunat behandelt worden waren. Davon waren 75 Patienten länger als acht Tage nachverfolgt worden. Weitere 15 wurden aufgrund von Transfusionen während der akuten Malariainfektion ausgeschlossen. Von den verbleibenden 60 entwickelten 13 Patienten Hämolysen (Jaureguiberry, Ndour et al. 2014).

4.3.2 Probandenalter und Parasitenwerte

Aus den Analysen geht hervor, dass sich signifikante Unterschiede in den Kategorien Alter und Parasitenwerten bzw. Hyperparasitämie ergeben.

In der Veröffentlichung von Rolling et al. gingen zusätzlich zu den hier verwendeten Daten auch Daten aus Gabun in die statistischen Analysen ein. Dadurch umfasste das Kollektiv 72 Kinder, von denen insgesamt fünf eine Hämolyse entwickelten (7 %). Der Gruppenvergleich zeigte, dass die Patienten mit verzögerter Hämolyse an Tag 14 höhere initiale Parasitenwerte hatten (306 968 Parasiten/ μ l vs. 92 642 Parasiten/ μ l, $P = 0.028$) und jünger waren (mittleres Alter: 24 Monate vs. 43 Monate, $P = 0.046$) (Rolling, Agbenyega et al. 2014).

Wie im Ergebnisteil beschrieben fallen diese beiden Punkte auch im hier untersuchten kleineren Patientenkollektiv auf. Signifikante Unterschiede zwischen Probandenalter und Parasitenwerten der Gruppen fallen im Mann-Whitney-U Test jedoch nicht auf.

Dennoch ergaben sich im hier untersuchten kleineren Patientenkollektiv beim WHO-Kriterium der Hyperparasitämie signifikante Daten ($P = 0,048$). Alle vier Patienten, die am Tag 14 mit Hämolyse auffielen, hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Hyperparasitämie (100%).

Eine Erklärung für die abweichenden Signifikanzen kann unter anderem durch die größere Fallzahl erklärt werden.

Betrachtet man zusätzlich den Vergleich der beiden Studienorte Ghana und Gabun hinsichtlich der mittleren Parasitendichte und dem Probandenalter, so ergeben sich auch hier signifikante Unterschiede.

Die Kinder in Ghana, deren Daten in dieser Arbeit verwendet wurden, waren insgesamt jünger (mittleres Alter: 31 Monate vs. 49 Monate, $P = 0,027$) und hatten eine höhere mittlere Parasitendichte (211 103 Parasiten/ μ l vs. 71 826 Parasiten/ μ l, $P = > 0.001$) als die in die Studie eingeschlossenen Patienten in Gabun.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass vier der insgesamt in beiden Studienstandorten betroffenen 5 Kinder aus dem Studiengebiet Ghana stammten und nur ein Kind aus Gabun. Somit ähnelt die Gruppe der Patienten mit Hämolyse der Gesamtgruppe Ghana, weshalb sich in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Dennoch waren alle 5 Patienten (4 Patienten aus dem Studienstandort Ghana, 1 Patient aus dem Studienstandort Gabun) hyperparasitäm mit Parasitenwerten von $>200\,000$ Parasiten/ μ l (Rolling, Agbenyega et al. 2014).

Eine weitere Publikation aus endemischem Gebiet wurde 2014 aus der Republik Kongo veröffentlicht. Bei insgesamt 23 von 201 Probanden konnte eine verzögerte Anämie 7 bis 21 Tage nach erstmaliger Artesunat-Therapie festgestellt werden. Bei fünf der Betroffenen kam es zu einem Hb-Abfall ≤ 5 g/dl. Ihr Alter lag zwischen 6 Monaten und 3 Jahren. Eine Auskunft über einen Zusammenhang mit der Parasitämie ist in der Publikation nicht enthalten (Burri, Ferrari et al. 2014).

Insgesamt zeichnet sich somit ein Zusammenhang zwischen der Auftretenswahrscheinlichkeit einer Hämolyse und den beiden Parametern Parasitendichte und Probandenalter ab. Hohe Parasitendichte (insbesondere Hyperparasitämien mit $> 200\,000$ Parasiten/ μ l) und niedriges Lebensalter scheinen mögliche Risikofaktoren für das Entwickeln einer therapieassoziierten Hämolyse zu sein.

4.3.3 Artesunat-Dosierung

Zoller et al. haben einen Zusammenhang zwischen der Artesunat-Dosis und dem Auftreten einer Hämolyse beschrieben. In einem retrospektiven Ansatz wurden 25 Patienten die an 7 verschiedenen Krankenhäusern in Europa mit Artesunat behandelt worden waren untersucht. Den sechs Patienten, die eine therapieassoziierte Hämolyse entwickelten, war eine höhere Dosis iv Artesunat verabreicht worden als denjenigen ohne Hämolyse (Zoller, Junghanss et al. 2011).

Die Artesunat-Gesamtdosis im hiesigen Studienansatz stimmte bei allen Probanden überein. Somit ist eine Aussage zu einer Dosisabhängigkeit des Artesunat und dem Auftreten von Hämolysen aus den erhobenen Ergebnissen nicht möglich.

4.3.4 Darreichungsform und Verabreichungsmuster

In dieser Studie wurden unterschiedliche Darreichungsformen und Verabreichungsmuster des Artesunat genutzt. Dies war Inhalt des Studienprotokolls der übergeordneten SMAC-Studie. Die Angaben bezüglich der jeweiligen Kohorten können Tabelle 20 entnommen werden. Patient H1 gehörte zu Kohorte 3, H2 zu Kohorte 1, H3 und H4 zu Kohorte 2.

- Kohorte 1: iv Artesunat 4 mg/kg initial, und dann 24 bzw. 48 Stunden nach Erstgabe;
- Kohorte 2: im Artesunat 4 mg/kg initial, und dann 24 bzw. 48 Stunden nach Erstgabe;
- Kohorte 3: im Artesunat 2.4 mg/kg initial, und dann 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Erstgabe

Tabelle 19: Kohorten für die Behandlung nach SMAC-Studienprotokoll

Aufgrund der niedrigen Fallzahl kann hier keine Aussage über eine Abhängigkeit zwischen einer Hämolyseentwicklung und der Darreichungsform bzw. dem Verabreichungsmuster oder zu Inzidenzen in den jeweiligen Kohorten getroffen werden.

4.3.5 Artemisinin-Derivate

Im Anschluss an die parenterale Medikation erhielten alle Patienten eine gewichtsadaptierte Dosis Artemether/Lumefantrin oral wie im Methodenteil beschrieben.

Die Mehrheit der Patienten, bei denen sich eine verzögerte Hämolyse entwickelt hat, war mit intravenösem Artesunat behandelt worden. Es gibt aber auch Berichte über Hämolyse nach intramuskulärer und rektaler Gabe von Artesunat sowie nach oraler Gabe von Artemether/Lumefantrin (Corpolongo, De Nardo et al. 2012; De Nardo, Oliva et al. 2013; Rolling, Agbenyega et al. 2015). In dieser Studie wurde das Artesunat bei drei der betroffenen Kindern intramuskulär gegeben, bei einem intravenös.

In zwei beschriebenen Fällen aus Italien kam es zu Hämolyse nach der Anwendung von oralem Artemether. Einer dieser Patienten wurde mit intravenösem Chinin behandelt, bevor er Artemether/Lumefantrin als Anschlussmedikation erhielt (Corpolongo, De Nardo et al. 2012; De Nardo, Oliva et al. 2013; Rehman, Lotsch et al. 2014).

Es könnte ein Zusammenhang von Hämolyse und der oralen Einnahme von Artemether/Lumefantrin angenommen werden. Dagegen spricht, dass es Fallbeschreibungen aus Europa gibt, in denen die Betroffenen auch ohne

vorhergehende Therapie mit Artemether/Lumefantrin eine Hämolyse entwickelten. Der Verlauf der Hämolyse wurde so beschrieben wie in unserer Studie (Zoller, Junghanss et al. 2011; Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012; Rolling, Schmiedel et al. 2012). Somit ist Artemether/Lumefantrin als einzige Ursache unwahrscheinlich (Rolling, Agbenyega et al. 2014). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere Artemisinin-Derivate verzögerte Hämolysen auslösen (Rehman, Lotsch et al. 2014).

4.3.6 Art der Herstellung von Artesunat

In Europa wird Artesunat noch nicht nach zertifizierter *Good Manufacturing Practice (GMP)* hergestellt. Das genutzte Medikament stammt aus China. In den USA steht ein Präparat nach *GMP* zur Verfügung, das jedoch nur für die landesweite Nutzung produziert wird. Da die ersten Berichte über verzögerte Hämolyse nur aus Europa existierten, wurde zunächst ein Zusammenhang mit der Herstellungsart vermutet. Diese Vermutung wird als widerlegt angesehen, nachdem von zwei Fällen einer Hämolyse-Entwicklung in den USA berichtet wurde (Paczkowski, Landman et al. 2014; Rolling, Agbenyega et al. 2015).

4.4 Fehlende Berichte über therapieassoziierte Hämolyse bisher

In den großen multizentrischen Studien AMQUAMAT und SEMQUAMAT wurde von keinen Fällen einer verspäteten Hämolyse berichtet (Dondorp, Nosten et al. 2005; Dondorp, Fanello et al. 2010). Das kann einerseits daran liegen, dass die Patienten nicht lange genug nachuntersucht wurden. Die Studien waren nicht mit einem langen Nachverfolgungszeitraum konzipiert (Rolling, Wichmann et al. 2013). In der SEAQUAMAT-Studie dauerte das Follow-up nur so lange wie der Krankenhausaufenthalt der Probanden. In der AQUAMAT-Studie wurden nur die Kinder am Tag 28 noch einmal untersucht, die zum Zeitpunkt der Entlassung noch nicht genesen waren. Laborchemische Daten stehen für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung (Dondorp, Fanello et al. 2010; Kreeftmeijer-Vegter, van Genderen et al. 2012; Rolling, Agbenyega et al. 2015).

In der hiesigen Studie zeigte nur eines der Kinder klinische Auffälligkeiten am Tag 14 des Follow-up Zeitraums. Die Transfusion von Fremdblut war indiziert.

Die anderen Probanden stellten sich trotz des erneuten Hb-Abfalls ohne Beschwerden zum Kontrolltermin an Tag 14 vor.

Die Blutbildveränderungen wären unter anderen Bedingungen, bzw. ohne der gezielten Fragestellung, möglicherweise nicht aufgefallen. Es ist gut möglich, dass in den beiden großen Studien verspätete Hämolysen nur darum nicht beschrieben wurden, da sie nicht beobachtet werden konnten. Außerdem wurden in den beiden Studien insgesamt eher niedrige Parasitenwerte gemessen, der hiesige Ansatz zeigt jedoch einen Zusammenhang zu Hyperparasitämie.

4.5 Abgrenzung zu anderen Formen der hämolytischen Anämie und mögliche pathophysiologische Mechanismen

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die den hämolytischen Ereignissen nach Therapie mit Artesunat bzw. Artemisinin-Derivaten zugrundeliegen, sind noch unklar. Es werden verschiedene Ursachen diskutiert, einige von ihnen konnten bereits widerlegt werden.

4.5.1 Hämolyse bei akuter Malariainfektion

Die Hämolyse, die in dieser Studie gesehen wurde, muss von der Hämolyse bei einer akuten Malariainfektion abgegrenzt werden. Beim Auftreten der verspäteten Hämolyse waren in dieser Studie in keinem der Fälle *P. falciparum* Parasiten im Blutausschlag mehr nachweisbar. Die Mechanismen, die, soweit bekannt, zur Anämie bei einer akuten Infektion führen, sind in der Einleitung aufgeführt. Manche Patienten erholen sich nur langsam von der schweren Anämie einer akuten Malariainfektion. Die Hämoglobinwerte können dann auch mehrere Wochen nach einer schweren Malariainfektion anhaltend niedrig sein. Der Unterschied liegt dann aber in einem fehlenden Abfall bzw. Anstieg der Hämolyseparameter, da es sich um eine Bildungsstörung handelt und kein neuer Zellzerfall mehr auftritt. Auch eine Rekrudescenz der Malariaparasiten ist unwahrscheinlich (Rolling, Wichmann et al. 2013).

4.5.2 Hämolyse bei Schwarzwasserfieber

Das Schwarzwasserfieber bezeichnet einen Symptomkomplex, der sich aus intravasaler Hämolyse, Hämoglobinurie und akutem Nierenversagen zusammensetzt und mit Fieber einhergeht (Tran, Day et al. 1996; Bruneel, Gachot et al. 2001). Bei den beschriebenen Fällen, bei denen das Schwarzwasserfieber mit einer Antimalaria-Behandlung in Verbindung gebracht wird, handelt es sich meistens um

das Medikament Chinin. Außerdem ist der Zeitraum zwischen Therapiebeginn und Auftreten der Symptome viel kürzer als bei den verzögerten Hämolysen nach Artesunat-Therapie. In einer vietnamesischen Studie lag der Mittelwert bei 24 Stunden (2-96 Stunden), nicht bei ca. 14 Tagen (Tran, Day et al. 1996; Rolling, Agbenyega et al. 2015). Dazu kommt, dass das Schwarzwasserfieber eher mit niedrigen Parasitenwerten assoziiert wird, die Hämolysen nach Artesunat-Therapie aber mit Hyperparasitämie (Van den Ende, Coppens et al. 1998; Bruneel, Gachot et al. 2001; Rolling, Agbenyega et al. 2014).

4.5.3 Hämolyse durch Transfusionsreaktion

Zwei der betroffenen Kinder haben zu Beginn der Artesunat-Therapie Bluttransfusionen erhalten (H1 und H2). Bei ihnen könnte eine Transfusionsreaktion zu einer hämolytischen Anämie beigetragen haben. Eine akute Reaktion tritt unmittelbar nach der Blutübertragung auf. Die verzögerte hämolytische Reaktion kann Tage bis Wochen nach einer Transfusion auftreten. Sie ist aber durch einen milden Verlauf gekennzeichnet und würde einen schweren Verlauf, wie bei Patient H2, nicht erklären. Ebenso wenig wie die Hämolysen bei H3 und H4 (Rolling, Agbenyega et al. 2014).

4.5.4 Hämolyse durch direkte toxische Reaktion

Ein direkter toxischer Effekt des Artesunat scheint auch nicht wahrscheinlich. Zwar ist die Konzentration direkt nach Gabe von iv Artesunat sehr hoch, sinkt aber sehr schnell wieder ab. Die Halbwertszeit liegt unter zwei Stunden (Morris, Duparc et al. 2011; Rolling, Agbenyega et al. 2014). Da die Hämolyse-Episoden frühestens 7 Tage nach Erstgabe auftraten, ist ein direkter Zusammenhang unwahrscheinlich. Zu diesem Zeitpunkt ist das Medikament bereits eliminiert (Arguin 2014).

4.5.5 Autoimmun-vermittelte Hämolyse

Eder et al. berichten von einem Fall von verzögerter Hämolyse in England. 14 Tage nach Artesunat-Therapie kam es zur Wiedervorstellung des Patienten. Der Hb-Wert lag bei 6,4 g/dl, ein Coombs Test war positiv. Die immun-vermittelte Hämolyse wurde mit Bluttransfusionen und Kortikosteroiden behandelt, woraufhin sich die Blutwerte wieder normalisierten (Eder, Farne et al. 2012). In einer weiteren Fallbeschreibung aus Frankreich von Raffray et al. stellte sich eine Patientin 14 Tage nach Artesunat-

Therapie einer komplizierten Malaria durch *P. falciparum* mit Abfall des Hb-Werts auf 4,6 g/dl vor. Es konnten dabei keine Parasiten im Blutaussstrich nachgewiesen werden. Ein Coombs-Test ergab positive Ergebnisse. Eine Testung fünf Tage zuvor war negativ gewesen. Es wurde von einer medikamenten-induzierten Antikörper-Reaktion auf Artesunat ausgegangen und eine autoimmun-vermittelte hämolytische Anämie diagnostiziert. Eine Behandlung mit Kortikosteroiden folgte, weitere hämolytische Ereignisse traten nicht auf (Eder, Farne et al. 2012; Raffray, Receveur et al. 2014). Auch in anderen Fallberichten gab es positive Tests. In den meisten Fällen, in denen eine direkte Coombs-Testung durchgeführt worden war, fielen die Ergebnisse negativ aus. Daher scheint auch hier eine autoimmun-vermittelte Hämolyse als alleinige Ursache nicht wahrscheinlich (Rehman, Lotsch et al. 2014). In der hier durchgeführten Studie wurden keine Coombs-Tests gemacht, daher kann keine Aussage darüber getroffen werden.

4.5.6 Genetische Ursachen

Zusätzlich wurde auch die Beteiligung von angeborenen Mechanismen und Ursachen an der Entstehung der hämolytischen Anämie diskutiert (Rolling, Agbenyega et al. 2014).

Einerseits könnten individuelle Muster bei der Metabolisierung des Medikamentes einen Einfluss haben. Es gibt aber bisher nur wenige Informationen zur Pharmakogenetik von Artesunat (Rolling, Agbenyega et al. 2014).

Außerdem könnten angeborene Strukturveränderungen einen Einfluss ausüben. Hierbei ist der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-(G6PD)-Mangel zu nennen. Der Enzymdefekt kann bei oxidativem Stress zu hämolytischen Krisen führen. Die Prävalenz ist in Gebieten, in denen Malaria endemisch ist, erhöht. Heterozygote Träger sind weniger anfällig an schwerer Malaria zu erkranken als die Restbevölkerung.

Ähnliches gilt für die Sichelzellanämie, einer Hämoglobinopathie. Auch hier kommt es zu hämolytischen Krisen und auch hier besteht bei Heterozygotie ein gewisser Schutz vor schweren Malariainfektionen (Herold 2014).

Bei den beschriebenen Fällen konnten beide als prädisponierende Faktoren ausgeschlossen werden und es wird nicht angenommen, dass ein Zusammenhang zu den Hämolysen besteht (Zoller, Junghanss et al. 2011; Kreeftmeijer-Vegter, van

Genderen et al. 2012; Jaureguiberry, Ndour et al. 2014; Raffray, Receveur et al. 2014; Rolling, Agbenyega et al. 2014; Rolling, Agbenyega et al. 2015).

Informationen und weiterführende Untersuchungen zu anderen Hämoglobinopathien oder Enzymdefekten sind derzeit noch nicht bekannt (Rehman, Lotsch et al. 2014).

4.5.7 Pitting

Der Mechanismus, der als wahrscheinlichste Ursache für die verspätet auftretende Hämolyse diskutiert wird, ist das sog. pitting in der Milz. Dieser Mechanismus ist eine Besonderheit der Artemisinin-Derivate. Während der Antimalaria-Therapie mit Artesunat werden die abgetöteten Ringstadien der Parasiten in der Milz aus dem Erythrozyten entfernt, ohne dass dabei die Blutzelle zerstört wird. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zunächst nicht zum Abbau der Erythrozyten (Chotivanich, Udomsangpetch et al. 2000; Jaureguiberry, Ndour et al. 2014).

Die ehemals infizierten Zellen kehren in den Blutkreislauf zurück, haben aber eine verkürzte Lebenszeit von ca. 180 Stunden (7-21 Tage) gegenüber den 120 Tagen eines gesunden Erythrozyten. Nach einem Zeitraum von 28 Tagen sind die Zellen vollständig aus dem Organismus entfernt.

Bei der Therapie mit Chinin konnte eine Beobachtung zum ‚pitting‘ dagegen nicht gemacht werden (Rolling, Wichmann et al. 2013; WHO 2013; Arguin 2014; Raffray, Receveur et al. 2014).

Wenn die betroffenen Zellen nach ca. ein bis zwei Wochen ‚zeitlich abgestimmt‘ zugrunde gehen, würde dies eine messbare hämolytische Reaktion zur Folge haben (Raffray, Receveur et al. 2014), insbesondere bei initial hohen Parasitenwerten, bzw. Hyperparasitämie.

Diese zeitlichen Zusammenhänge decken sich mit denen der hiesigen Studie.

Jauréguiberry et al. konnten hierzu einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer verzögerten Hämolyse und dem Anteil der ehemals infizierten Erythrozyten nach Artesunat-Therapie feststellen. Bei den Patienten, die eine Hämolyse entwickelten, war die Konzentration der betroffenen roten Blutzellen höher. Zum Zeitpunkt der Hämolyse fiel die Konzentration dann wieder ab (Jaureguiberry, Ndour et al. 2014).

Das ‚pitting‘ kommt als mögliche Ursache in Frage. Noch ist allerdings nicht klar, warum nur ein Teil der Patienten mit Hyperparasitämie nach Artesunat-Therapie eine Hämolyse entwickeln (Rehman, Lotsch et al. 2014).

Die Patienten, die in dieser Studie von verspäteter Hämolyse betroffen waren, hatten alle eine Hyperparasitämie. Nicht alle Patienten mit einer Hyperparasitämie entwickelten jedoch eine Hämolyse.

Bei hohem Parasitenbefall und Artesunat-Therapie steigt der Anteil der Zellen, die vom ‚pitting‘ betroffen sind und früher aus dem Kreislauf entfernt werden. Und damit auch das Risiko für eine hämolytische Anämie (Rolling, Wichmann et al. 2013). In der Gesamtzusammenschau würde dies nicht nur die verzögert auftretenden hämolytischen Ereignisse erklären, sondern auch die signifikanten Ergebnisse zum Parameter Hyperparasitämie.

Ebenso scheint das Probandenalter ein Einflussfaktor beim ‚pitting‘ zu sein. Ein jüngeres Lebensalter war stärker mit dem Auftreten einer Hämolyse assoziiert. Gleichzeitig scheint es auch einen Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Vorgang des Pitting zu geben. Ältere Kinder scheinen weniger ehemals infizierte, d.h. ‚gepittete‘ Erythrozyten zu haben (Jaureguiberry, Ndour et al. 2014).

4.6 Erkenntnisse seit Abschluss der Studie

Nach der Publikation von Rolling et al wurden die Ergebnisse über verzögerte Hämolyse nach parenteraler Artesunat-Therapie in die Therapie-Leitlinien der WHO und der MMV aufgenommen (MMV 2013; March; WHO 2013; October).

Zudem wurde von der WHO die Empfehlung ausgesprochen, nach Möglichkeiten zu suchen, um möglichst früh Anzeichen einer verzögerten Hämolyse zu erkennen (WHO 2013; October). Hierzu wurden bereits Ansätze eines Schnelltest-Verfahrens veröffentlicht, das über einen Proteinnachweis in ehemals infizierten, ‚gepitteten‘ Erythrozyten nach Artesunat-Therapie eine Prognose über die Auftretenswahrscheinlichkeit der verzögerten Hämolyse machen soll (Ndour, Larreche et al. 2017).

In einer kürzlich veröffentlichten randomisierten Vergleichsstudie von Fanello et al. wurde in der Demokratischen Republik Kongo erneut die Relevanz verspäteter Hämolyse bei einheimischen Kindern untersucht. Ein Zusammenhang zu hohen Parasitenwerten und gehäuftem Auftreten von verzögerten Hämolysen wurde nicht gesehen. Es kristallisiert sich heraus, dass verzögerte Hämolysen in Afrika deutlich

seltener auftreten als in den Berichten von Reiserückkehrern in Europa beschrieben (Fanello, Onyamboko et al. 2017).

In den Studienzentren zeigen sich in bisher noch nicht veröffentlichten Nachfolgestudien kaum noch Hämolysen. Jedoch waren die rekrutierten Kinder deutlich weniger schwer erkrankt sind mit deutlich geringeren Parasitenzahlen.

Der aktuelle Konsens besteht darin, dass die Überlegenheit von Artesunat als Therapie der schweren Malaria gegenüber Chinin nicht geschmälert wird. Dennoch muss die verspätete Hämolyse als Nebenwirkung im Blick behalten und ernst genommen werden (Jaureguiberry, Thellier et al. 2015; Fanello, Onyamboko et al. 2017).

5 Zusammenfassung/ Summary

Malaria ist weiterhin eine der bedeutendsten parasitären Erkrankungen weltweit, an der 2015 laut Schätzungen der WHO 212 Millionen Menschen erkrankten. Bei 429 000, insbesondere Kindern unter fünf Jahren führte sie zum Tod. *P. falciparum* ist für den Großteil der schweren Verlaufsformen verantwortlich.

In den letzten Jahren hat sich das Medikament Artesunat bei der Therapie der schweren Malaria als Mittel der Wahl durchgesetzt, es fehlen allerdings noch Untersuchungen zu Langzeitfolgen. Seit 2011 wurde wiederholt von Fällen berichtet, bei denen es zu verzögert auftretenden Hämolysen etwa 14 Tage nach Artesunat-Therapie kam. Ihr Auftreten wurde im Rahmen einer Pilotstudie in der endemischen Region Ghana untersucht. Es wurden hierfür über sechs Monate Kinder zwischen 5 Monaten und 10 Jahren mit schwerer Malariainfektion rekrutiert, mit Artesunat therapiert und über vier Wochen nachverfolgt. Dabei lag der Fokus auf dem Auftreten einer hämolytischen Anämie. Es wurden insgesamt 53 Patienten rekrutiert, von denen vier an Tag 14 Anzeichen einer Hämolyse hatten. Probanden, die Hämolysen entwickelten, hatten höhere Parasitendichten und waren jünger. Insbesondere bei einem Patienten war die Blutbildveränderung therapiebedürftig. Alle Patienten, bei denen laut aktueller Studienlage bisher verzögerte hämolytische Episoden auftraten und beschrieben wurden, überlebten diese. Einige Patienten entwickelten schwere therapiebedürftige Anämien und benötigten Bluttransfusionen. Ohne Behandlung wären lebensbedrohliche Komplikationen aufgetreten. Ein solcher Fall ist auch in dieser Studie beschrieben.

Die genauen pathophysiologischen Ursachen, die für die verzögert auftretenden Hämolysen verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Unter anderem wird angenommen, dass das sog. ‚pitting‘ in der Milz eine entscheidende Rolle spielt. Dabei kehren ehemals infizierte Erythrozyten zunächst in den Blutkreislauf zurück, bevor sie dann mit verkürzter Lebenszeit mehr oder weniger synchron zugrunde gehen. Dadurch könnte eine verzögerte Hämolyse zumindest teilweise erklärt werden. Die Bedeutung von Artesunat als Therapie der schweren Malaria und seine nachgewiesene Überlegenheit gegenüber Chinin sollte dadurch nicht in Frage gestellt werden. Allerdings sollten alle Patienten in endemischen sowie nicht-endemischen Regionen innerhalb von vier Wochen nach der Therapie engmaschig nachkontrolliert werden.

Malaria still is one of the most significant parasitic infections worldwide. According to the WHO, an estimate of 212 million cases occurred in 2015. About 429 000 malaria deaths were reported, most of them concerning children aged 5 and under. Malaria infection due to *P. falciparum* is the most deadly.

Intravenous Artesunate is recommended as first-line therapy for severe malaria. Data on long-term treatment safety still is incomplete.

Cases of delayed haemolysis about 14 days after artesunate treatment have been reported repeatedly since 2011. A pilot study was conducted in the endemic region Ghana. Children between 5 months and 10 years of age with severe malaria infection were included, treated with parenteral Artesunate and followed up for 28 days. The primary outcome was the incidence of therapy-associated haemolytic anemia.

A total of 53 children were included. Four of them showed signs of haemolysis on day 14 after treatment. Probands developing hemolysis had higher parasite counts and were younger. One of them especially was in need of therapy.

All patients developing delayed haemolysis according to current research survived. Some patients however suffered severe anemia and required further treatment such as blood transfusions. Without treatment life-threatening complications would have occurred. One of these cases is described in this study.

The exact pathophysiological mechanisms causing delayed haemolysis aren't finally researched. Different mechanisms have been discussed. One of them is so called 'pitting' in the spleen. Once infected erythrocytes return to the blood circulation with a shortened lifespan until they are eliminated synchronously. This could explain delayed hemolysis at least partly.

The importance of Artesunate for treatment of severe malaria and its superiority over Quinine shouldn't be questioned. In conclusion prolonged follow-ups should be established for all patients receiving Artesunate.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AQUAMAT	Africa Quinine Artesunate Malaria Trail
BCS	Blantyre Coma Scale
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
DHA	Dihydroartemisinin
dl	Deziliter
et al	et alii/ et aliae/ et alia
g	Gramm
G6PD	Glokose-6-Phosphatdehydrogenase
GCS	Glasgow Coma Scale
GMP	Good Manufacturing Practice
Hb	Hämoglobin
HIV	Humaner Immunodefizienz Virus (englisch: human immunodeficiency virus)
im	intramuskulär
IQR	Interquartilrange, Interquartilbereich
iv	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	männlich
MCV	mean corpuscular/ cell volume
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
P.	Plasmodium
PfEMP1	P. falciparum erythrocyte membrane protein 1
pH	
RPI	Retikulozyten Produktions Index
SEMQUAMAT	South-East Asia Quinine Artesunate Malaria Trail
SMAC	Severe Malaria in African Children
sog.	sogenannt/e/es
Tab.	Tabelle
U-Stix	Urinstix; Urinteststreifen
vs.	versus
w	weiblich
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
Δ	Delta; Differenz
μ l	Mikroliter

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der schweren Malaria nach WHO- Kriterien (WHO 2014; WHO 2015)	10
Tabelle 2: Blantyre Coma Scale/ Glasgow Coma Scale (Mabeza, Moyo et al. 1995; Newton, Chokwe et al. 1997)	11
Tabelle 3: Referenzbereich von Hämoglobin (Angaben in mg/dl) (Thomas 2012)....	15
Tabelle 4: Laborchemische Veränderungen bei hämolytischer Anämie (Herold 2014)	17
Tabelle 5: Formel für Retikulozyten-Produktions-Index (RPI) (Herold 2014)	17
Tabelle 6: Studieneinschlusskriterien	23
Tabelle 7: Studienausschlusskriterien	23
Tabelle 8: Maßnahmen der Studie im zeitlichen Überblick nach Studienprotokoll....	24
Tabelle 9: Formel für die Berechnung der Parasitenzahl	27
Tabelle 10: Laborgeräte Ghana.....	28
Tabelle 11: Material Blutentnahme	28
Tabelle 12: Material Giemsa Färbung	29
Tabelle 13: Material Retikulozyten-Färbung	29
Tabelle 14: Öl für Mikroskop.....	29
Tabelle 15: Demografische und klinische Parameter der rekrutierten Kinder im Überblick. Angaben im Mittelwert (95%-Konfidenzintervall), soweit nicht anderweitig angegeben; Normwerte gemäß der Standards am Studienort	30
Tabelle 16: Übersicht wichtiger Daten bei Patienten mit verzögerter Hämolyse.....	32
Tabelle 17: Vergleich der Patientengruppen; Mittelwerte (95%- Konfidenzintervall), soweit nicht anderweitig angegeben	35
Tabelle 18: Klassifizierung der Häufigkeit unerwünschter Arzneimittelwirkungen (Höffler 2005)	36
Tabelle 19: Kohorten für die Behandlung nach SMAC-Studienprotokoll.....	43

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> (Rosenthal 2008)	7
Abbildung 2: Einteilung der hämolytischen Anämien (Arastéh and Baenkler 2013) .	16
Abbildung 3: Kriterien für schwere Malaria nach WHO: Häufigkeitsverteilung im Patientenkollektiv; Veranschaulichung der WHO-Kriterien im Balkendiagramm	31
Abbildung 4: Zeitliche Verläufe von Hb- und LDH-Werten	34

9 Literaturverzeichnis

Angus, B. J., K. Chotivanich, et al. (1997). "In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria." Blood **90**(5): 2037-2040.

Arastéh, K. and H.-W. Baenkler (2013). Innere Medizin. Duale Reihe. Stuttgart, Thieme.

Arguin, P. M. (2014). "Case definition: postartemisinin delayed hemolysis." Blood **124**(2): 157-158.

Askling, H. H., F. Bruneel, et al. (2012). "Management of imported malaria in Europe." Malar J **11**: 328.

Bruneel, F., B. Gachot, et al. (2001). "Resurgence of blackwater fever in long-term European expatriates in Africa: report of 21 cases and review." Clin Infect Dis **32**(8): 1133-1140.

Bruneel, F., F. Tubach, et al. (2010). "Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults." PLoS One **5**(10): e13236.

Bull, P. C., B. S. Lowe, et al. (1998). "Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria." Nat Med **4**(3): 358-360.

Burdam, F. H., M. Hakimi, et al. (2016). "Asymptomatic Vivax and Falciparum Parasitaemia with Helminth Co-Infection: Major Risk Factors for Anaemia in Early Life." PLoS One **11**(8): e0160917.

Burri, C., G. Ferrari, et al. (2014). "Delayed anemia after treatment with injectable artesunate in the Democratic Republic of the Congo: a manageable issue." Am J Trop Med Hyg **91**(4): 821-823.

Caramello, P., R. Balbiano, et al. (2012). "Severe malaria, artesunate and haemolysis." J Antimicrob Chemother **67**(8): 2053-2054.

Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, et al. (2000). "The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of Plasmodium falciparum malaria." J Infect Dis **182**(2): 629-633.

Corpolongo, A., P. De Nardo, et al. (2012). "Haemolytic anaemia in an HIV-infected patient with severe falciparum malaria after treatment with oral artemether-lumefantrine." Malar J **11**: 91.

Cramer, J. P., R. Lopez-Velez, et al. (2011). "Treatment of imported severe malaria with artesunate instead of quinine--more evidence needed?" Malar J **10**: 256.

Day, N. and A. M. Dondorp (2007). "The management of patients with severe malaria." Am J Trop Med Hyg **77**(6 Suppl): 29-35.

- De Nardo, P., A. Oliva, et al. (2013). "Haemolytic anaemia after oral artemether-lumefantrine treatment in a patient affected by severe imported falciparum malaria." Infection **41**(4): 863-865.
- Dhaliwal, G., P. A. Cornett, et al. (2004). "Hemolytic anemia." Am Fam Physician **69**(11): 2599-2606.
- Dondorp, A., F. Nosten, et al. (2005). "Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial." Lancet **366**(9487): 717-725.
- Dondorp, A. M., B. J. Angus, et al. (1999). "Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria." Am J Trop Med Hyg **60**(5): 733-737.
- Dondorp, A. M., C. I. Fanello, et al. (2010). "Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial." Lancet **376**(9753): 1647-1657.
- Dondorp, A. M., S. J. Lee, et al. (2008). "The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria." Clin Infect Dis **47**(2): 151-157.
- Dondorp, A. M., M. Nyanoti, et al. (2002). "The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(3): 282-286.
- Eder, M., H. Farne, et al. (2012). "Intravenous artesunate versus intravenous quinine in the treatment of severe falciparum malaria: a retrospective evaluation from a UK centre." Pathog Glob Health **106**(3): 181-187.
- Ehlkes, L., A. C. Krefis, et al. (2014). "Geographically weighted regression of land cover determinants of Plasmodium falciparum transmission in the Ashanti Region of Ghana." Int J Health Geogr **13**: 35.
- Ehrhardt, S., G. D. Burchard, et al. (2006). "Malaria, anemia, and malnutrition in african children--defining intervention priorities." J Infect Dis **194**(1): 108-114.
- Ekvall, H. (2003). "Malaria and anemia." Curr Opin Hematol **10**(2): 108-114.
- Fanello, C., M. Onyamboko, et al. (2017). "Post-treatment haemolysis in African children with hyperparasitaemic falciparum malaria; a randomized comparison of artesunate and quinine." BMC Infect Dis **17**(1): 575.
- Garratty, G. (2010). "Immune hemolytic anemia associated with drug therapy." Blood Rev **24**(4-5): 143-150.
- Greenwood, B. M., K. Bojang, et al. (2005). "Malaria." Lancet **365**(9469): 1487-1498.
- Haldar, K. and N. Mohandas (2009). "Malaria, erythrocytic infection, and anemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 87-93.

Heddi, A. (2002). "Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces." Int J Parasitol **32**(13): 1587-1598.

Herold, G. u. M. (2014). Innere Medizin. Köln.

Hien, T. T., T. M. Davis, et al. (2004). "Comparative pharmacokinetics of intramuscular artesunate and artemether in patients with severe falciparum malaria." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4234-4239.

Hien, T. T., D. T. Tam, et al. (1991). "Comparative effectiveness of artemisinin suppositories and oral quinine in children with acute falciparum malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg **85**(2): 210-211.

Höfler, D. L., R.; Berthold, H. K. (2005). "Pharmakovigilanz: Empfehlung zur Meldung unerwünschter Arzneimittelwirkungen durch die Ärzteschaft." Arzneiverordnung in der Praxis **1. Auflage**(Band 32, Sonderheft 1).

Jaureguierry, S., P. A. Ndour, et al. (2014). "Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins." Blood **124**(2): 167-175.

Jaureguierry, S., M. Thellier, et al. (2015). "Delayed-onset hemolytic anemia in patients with travel-associated severe malaria treated with artesunate, France, 2011-2013." Emerg Infect Dis **21**(5): 804-812.

Johnson, S. T. (2009). "Drug-induced immune hemolytic anemia." Transfus Apher Sci **40**(3): 205-207.

Kreeftmeijer-Vegter, A. R., P. J. van Genderen, et al. (2012). "Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium." Malar J **11**: 102.

Kurth, F., M. Develoux, et al. (2015). "Intravenous Artesunate Reduces Parasite Clearance Time, Duration of Intensive Care, and Hospital Treatment in Patients With Severe Malaria in Europe: The TropNet Severe Malaria Study." Clin Infect Dis **61**(9): 1441-1444.

Löcher, T., G.-D. Burchard, et al. (2010). Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin ; 287 Tabellen ; [mit Online-Zusatzmaterial]. Stuttgart [u.a.], Thieme.

Mabeza, G. F., V. M. Moyo, et al. (1995). "Predictors of severity of illness on presentation in children with cerebral malaria." Ann Trop Med Parasitol **89**(3): 221-228.

Mackintosh, C. L., J. G. Beeson, et al. (2004). "Clinical features and pathogenesis of severe malaria." Trends Parasitol **20**(12): 597-603.

McLean, E., M. Cogswell, et al. (2009). "Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005." Public Health Nutr **12**(4): 444-454.

Miller, L. H., D. I. Baruch, et al. (2002). "The pathogenic basis of malaria." Nature **415**(6872): 673-679.

MMV, M. f. M. V. (2013; March). "Experts Group Meeting on delayed haemolytic anaemia following treatment with injectable artesunate; Vienna, Austria."

Moody, A. (2002). "Rapid diagnostic tests for malaria parasites." Clin Microbiol Rev **15**(1): 66-78.

Morris, C. A., S. Duparc, et al. (2011). "Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration." Malar J **10**: 263.

Ndour, P. A., S. Larreche, et al. (2017). "Measuring the Plasmodium falciparum HRP2 protein in blood from artesunate-treated malaria patients predicts post-artesunate delayed hemolysis." Sci Transl Med **9**(397).

Newton, C. R., T. Chokwe, et al. (1997). "Coma scales for children with severe falciparum malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg **91**(2): 161-165.

Newton, C. R. and S. Krishna (1998). "Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment." Pharmacol Ther **79**(1): 1-53.

Newton, P. N., B. J. Angus, et al. (2003). "Randomized comparison of artesunate and quinine in the treatment of severe falciparum malaria." Clin Infect Dis **37**(1): 7-16.

Osei, L. and J. O. Commey (1994). "Drug compliance among parents and guardians of children in Accra, Ghana." East Afr Med J **71**(9): 591-595.

Paczkowski, M. M., K. L. Landman, et al. (2014). "Update on cases of delayed hemolysis after parenteral artesunate therapy for malaria - United States, 2008 and 2013." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **63**(34): 753-755.

Pasvol, G. (2005). "The treatment of complicated and severe malaria." Br Med Bull **75-76**: 29-47.

Perkins, D. J., T. Were, et al. (2011). "Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis." Int J Biol Sci **7**(9): 1427-1442.

Phiri, K., M. Esan, et al. (2012). "Intermittent preventive therapy for malaria with monthly artemether-lumefantrine for the post-discharge management of severe anaemia in children aged 4-59 months in southern Malawi: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial." Lancet Infect Dis **12**(3): 191-200.

Raffray, L., M. C. Receveur, et al. (2014). "Severe delayed autoimmune haemolytic anaemia following artesunate administration in severe malaria: a case report." Malar J **13**: 398.

Rehman, K., F. Lotsch, et al. (2014). "Haemolysis associated with the treatment of malaria with artemisinin derivatives: a systematic review of current evidence." Int J Infect Dis **29**: 268-273.

Rolling, T., T. Agbenyega, et al. (2014). "Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria--a double-center prospective study." J Infect Dis **209**(12): 1921-1928.

Rolling, T., T. Agbenyega, et al. (2015). "Delayed haemolysis after artesunate treatment of severe malaria - Review of the literature and perspective." Travel Med Infect Dis **13**(2): 143-149.

Rolling, T., S. Schmiedel, et al. (2012). "Post-treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report of three patients with hyperparasitaemia." Malar J **11**: 169.

Rolling, T., D. Wichmann, et al. (2013). "Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis." Malar J **12**: 241.

Rosenthal, P. J. (2008). "Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria." N Engl J Med **358**(17): 1829-1836.

Simpson, J. A., T. Agbenyega, et al. (2006). "Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin following intra-rectal dosing of artesunate in malaria patients." PLoS Med **3**(11): e444.

Singer, M., C. S. Deutschman, et al. (2016). "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." JAMA **315**(8): 801-810.

Thomas, L. (2012). Labor und Diagnose : Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik Bd. 1 [...]. Frankfurt/Main, TH-Books Verl.-Ges.

Tran, T. H., N. P. Day, et al. (1996). "Blackwater fever in southern Vietnam: a prospective descriptive study of 50 cases." Clin Infect Dis **23**(6): 1274-1281.

Van den Ende, J., G. Coppens, et al. (1998). "Recurrence of blackwater fever: triggering of relapses by different antimalarials." Trop Med Int Health **3**(8): 632-639.

Weatherall, D. J., L. H. Miller, et al. (2002). "Malaria and the red cell." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 35-57.

White, N. J. P., S.; Hien, T. T.; Faiz, M. A.; Mokuolu, O. A.; Dondorp, A. M. (2014). "Malaria." The Lancet **383**(9918): 723 - 735.

Whitty, C. J., P. L. Chiodini, et al. (2013). "Investigation and treatment of imported malaria in non-endemic countries." BMJ **346**: f2900.

WHO, W. H. O. (2000). "Severe falciparum malaria." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94, supplement 1.

WHO, W. H. O. (2006; April). "WHO briefing on Malaria Treatment Guidelines and artemisinin monotherapies; Geneva."

WHO, W. H. O. (2012). "Management of severe Malaria- a practical handbook third edition."

WHO, W. H. O. (2013). "WHO/GMP Information Note on Delayed Haemolytic Anaemia following Treatment with Artesunate."

WHO, W. H. O. (2013; October). "WHO/GMP Information Note on Delayed Haemolytic Anaemia following Treatment with Artesunate. ." 1-2.

WHO, W. H. O. (2014). "Severe malaria." Trop Med Int Health **19 Suppl 1**: 7-131.

WHO, W. H. O. (2015). "Guidelines for the treatment of severe Malaria - 3rd edition."

WHO, W. H. O. (2016). "World malaria report 2016."

Wirth, D. F. (2002). "Biological revelations." Nature **419**(6906): 495-496.

Woodrow, C. J., R. K. Haynes, et al. (2005). "Artemisinins." Postgrad Med J **81**(952): 71-78.

Yeboah-Antwi, K., J. O. Gyapong, et al. (2001). "Impact of prepackaging antimalarial drugs on cost to patients and compliance with treatment." Bull World Health Organ **79**(5): 394-399.

Zoller, T., T. Junghanss, et al. (2011). "Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe." Emerg Infect Dis **17**(5): 771-777.

10 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Burchard, Dr. Rolling und Dr. Cramer für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung, sowie hilfreiche Beratung während der Entstehung der Arbeit.

Dr. Rolling und Dr. Cramer danke ich auch für die Betreuung aus der Ferne während der Datenerhebung in Ghana und danach.

Außerdem danke ich dem Studienteam in Kumasi für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit und stetige Mithilfe.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: