

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRE GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Parvovirus B19 Infektionen bei pädiatrischen Patienten mit
hämatologischen und / oder onkologischen Erkrankungen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Regina Jitschin

2011

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRE GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Parvovirus B19 Infektionen bei pädiatrischen Patienten mit
hämatologischen und / oder onkologischen Erkrankungen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Regina Jitschin

2011

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Susanne Modrow

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Selim Corbacioglu

Tag der mündlichen Prüfung:

11. August 2011

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	7
A 1	Taxonomische Einordnung	8
A 2	Aufbau	10
A 2.1	<i>Viruspartikel und Genom</i>	10
A 2.2	<i>Virusproteine</i>	11
A 2.2.1	<i>Strukturproteine</i>	11
A 2.2.2	<i>Nichtstrukturproteine</i>	12
A 3	Krankheitsverlauf und Pathogenese	13
A 3.1	<i>Epidemiologie und klinisches Bild</i>	13
A 3.2	<i>Prävalenz und Transmissionswege</i>	14
A 3.2.1	<i>Übertragung durch Blut und Blutprodukte</i>	14
A 3.3	<i>Infektionszyklus (zellulär)</i>	15
A 3.3.1	<i>Bindung an die Zelle und Zellrezeptoren</i>	15
A 3.3.2	<i>Virale Aufnahme in die Zelle</i>	16
A 3.4	<i>Immunantwort</i>	17
A 3.4.1	<i>Immunantwort bei einer akuten Infektion</i>	17
A 3.4.1.1	<i>Phasen der akuten Infektion</i>	19
A 3.5	<i>Komplikationen bei einer Parvovirus B19 Infektion</i>	20
A 3.5.1	<i>Patienten mit Immunsuppression</i>	20
A 3.5.2	<i>Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen</i>	22
A 3.5.3	<i>Persistenz des Virus</i>	23
A 3.6	<i>Therapie und Prävention</i>	24
A 4	Zielsetzung	26

A 5	Vorbereitung und Material	26
	<i>A 5.1 Zusammensetzung der Studie</i>	26
	<i>A 5.2 Untersuchungsmaterial</i>	26
A 6	Experimentelle Methoden	27
	<i>A 6.1 Immunglobulinnachweis</i>	27
	<i>A 6.1.1 ELISA</i>	27
	<i>A 6.1.2 Western Blot</i>	28
	<i>A 6.2 DNA-Nachweis</i>	30
A 7	Verwendete Reagenzien und Geräte	31
	<i>A 7.1 Reagenzien</i>	31
	<i>A 7.2 Herstellung der Reagenzien für ELISA</i>	32
	<i>A 7.3 Herstellung der Reagenzien für Westernblot</i>	32
	<i>A 7.4 Herstellung der Reagenzien für PCR</i>	33
	<i>A 7.5 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	33
A 8	Statistische Analysen	33
B	Ergebnisse	34
B 1	Patienten der Studie	34
	<i>B 1.1 Gruppe A</i>	37
	<i>B 1.1.1 Patienten mit Autoimmunerkrankungen</i>	38
	<i>B 1.1.2 Patienten mit nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen</i>	39
	<i>B 1.2 Gruppe B</i>	41
	<i>B 1.2.1 Patienten mit Leukämie</i>	41
	<i>B 1.2.2 Patienten mit Lymphomen</i>	42
	<i>B 1.2.3 Patienten mit soliden Tumoren</i>	43
	<i>B 1.3 Gruppe C</i>	43

B 2	Verlaufskontrollen und Therapie der Grunderkrankung	44
	<i>B 2.1 Parvovirus B19-DNA-positive Patienten mit Leukämie (B1-B7)</i>	44
	<i>B 2.2. Parvovirus B19-DNA-negative Patienten mit Leukämie (b1-b11)</i>	46
	<i>B 2.3 Bedarf an Blutprodukten</i>	46
	<i>B 2.4 Antibiotikatherapie</i>	48
	<i>B 2.5 Krankheitsverlauf bei Patienten B2 und B5</i>	49
	<i>B 2.5.1 Patient B2</i>	49
	<i>B 2.5.2 Patientin B5</i>	53
C	Diskussion	56
D	Zusammenfassung	59
E	Anhang	62
	Abkürzungsverzeichnis	62
	Tabellenverzeichnis	63
	Abbildungsverzeichnis	64
	Literaturverzeichnis	65
	Danksagung	80
	Schriftliche Erklärung	81

A Einleitung

Parvovirus B19 (B19V) wurde 1975 durch Zufall von Yvonne Cossart und ihren Mitarbeitern bei der damals routinemäßig durchgeführten Überprüfung von Blutkonserven gesunder Spender auf das Hepatitis-B-Virus entdeckt (Cossart YE, 1975). Da das bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Virus in der Probe 19 auf der Platte B gefunden wurde und mit einem Durchmesser von 18-26 nm eines der kleinsten (lat. *parvus* = klein) bekannten humanpathogenen Viren ist, wurde es Parvovirus B19 genannt.

Bereits 1981 konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit B19V und einem spezifischen Pathophänomen festgestellt werden: den aplastischen Krisen bei Patienten mit Sichelzellanämie (Pattison JR, 1981). Doch erst 1983 gelang es der Arbeitsgruppe von Graham R. Serjeant, das neu entdeckte Virus als Verursacher von Ringelröteln/Erythema infectiosum zu identifizieren (Anderson MJ, 1983). Die Ringelröteln werden im Englischen auch als „fifth disease“ bezeichnet, da sie die fünfte Kinderkrankheit darstellen, die mit einem charakteristischen Hautausschlag einhergeht.

Infektionen mit B19V treten weltweit auf, sind sehr häufig und verlaufen bei immunkompetenten Personen meist harmlos. Das Virus kann jedoch gerade bei gestörter Hämatopoese und/oder bei vorhandener Beeinträchtigung des Immunsystems, sei es durch eine Krankheit oder iatrogenen Genese, eine Vielzahl von Komplikationen hervorrufen (Young NS, 2004). Insbesondere der ausgeprägte Tropismus von B19V zur Infektion von erythroiden Vorläuferzellen kann bei bereits gestörter Hämatopoese zu schwerwiegenden Symptomen bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen führen (Serjeant BE, 1993; Pattison JR, 1981).

Die Transmissionswege des Virus sind mannigfaltig. Der Großteil der Infektionen findet über den Respirationstrakt via Tröpfcheninfektion statt. B19V kann aber auch iatrogen im Rahmen von Transfusionen oder Organtransplantationen (Koppelman MH, 2004) oder während der Schwangerschaft transplazentar (Modrow S, 2003) übertragen werden.

Da das Virus auch bei infizierten, aber asymptomatischen Spendern im Blut prävalent ist und sich zudem als außerordentlich widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen sowie verschiedenen chemischen und physikalischen Inaktivierungsmethoden (Detergenzien, Hitze) erweist, kann es häufig in Blutkonserven, Gerinnungsfaktorenkonzentraten und verschiedenen anderen Blutprodukten nachgewiesen werden (Jordan J, 1998; Yunoki M, 2003; Yoto Y, 1995; Modrow S, 2010).

Die Anzucht von B19V in Zellkulturen gestaltet sich bis heute äußerst schwierig: B19V konnte mit Hilfe von im späten Entwicklungsstadium befindlichen erythroiden Vorläuferzellen (Mortimer PP, 1983), peripherem Blut, fetaler Leber und in seltenen erythro-megakaryoblastoiden Zelllinien (Shimomura S, 1992; Miyagawa E, 1999), angezüchtet werden. Keine dieser Methoden erwies sich aber für die Routinediagnostik als geeignet (Modrow S, 2000).

A 1 Taxonomische Einordnung

Das humane B19V gehört zu der Unterfamilie der Parvovirinae in der Virusfamilie der Parvoviridae. Die Klassifikation dieser Virusfamilie beruht auf morphologischen und funktionellen Merkmalen. Unterteilt man sie hinsichtlich ihrer Infektionspopulation, umfasst sie zwei Unterfamilien: die Parvovirinae und die Densovirinae. Letztere infizieren ausschließlich Insekten (Tabelle 1).

Die Parvovirinae lassen sich entsprechend ihres Replikationsmodus in drei Genera unterteilen: das sich autonom replizierende Parvovirus (1), das Dependovirus (2), welches zur Replikation einen Helfervirus (z. B. Adeno-, Vaccinia- oder Herpesvirus) benötigt, und das sich bevorzugt in erythroiden Zellen replizierende Erythrovirus (3) (Van Regenmortel MHV, 2000; Heegaard ED, 2002). Von den genannten Genera sind nur Dependoviren und Erythroviren humanpathogen.

Das B19V ist das einzige bekannte humanpathogene Virus, das dem Genus Parvovirus angehört. Auf Grund der Tatsache, dass das B19V einen ausgeprägten Tropismus für die Infektion von erythrozytären Vorläuferzellen besitzt, wurde es zur Gattung der Erythroviren gezählt, der noch einige Affen-Parvoviren und das „manchurian chipmunk parvovirus“ mit ähnlichen funktionellen Eigenschaften zugerechnet werden.

Unterfamilie	Gattung	Mensch	Tier
Parvovirinae	Parvovirus		Minute Virus of Mice, Chicken Parvovirus, Feline Panleukopenia Virus, HB Parvovirus, H-1 Parvovirus, Kilham Rat Virus, Lapine Parvovirus, LuIII Virus, Mouse Parvovirus 1, Porcine Parvovirus, RT Parvovirus, Tumor Virus X
	Bocavirus	Humanes Bocavirus	Canine minute Virus Bovines Parvovirus
	Amdovirus		Aleutian Mink Disease virus
	Erythrovirus	Parvovirus B19	Pig-tailed macaque parvovirus, Rhesus macaque parvovirus, Simian Parvovirus, Bovine Parvovirus Type 3, Chipmunk Parvovirus
	Dependovirus	Adenoassoziierte Viren (AAV-2, -3, -5)	AAV 1 - 5, Avian AAV, Bovine AAV, Canine AAV, Duck parvovirus, Equine AAV, Goose parvovirus, Ovine AAV, AAV 7, AAV 8, Bovine parvovirus 2
Densovirinae	Densovirus		Culex pipiens Densovirus
	Iterovirus		Bombyx mori Densovirus
	Brevidensovirus		Aedes aegypti Densovirus
	Pefudensovirus		Periplaneta fuliginosa densovirus

Tabelle 1: 8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses; C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (eds) Academic Press, 1162 pp.; Elsevier Publication Date: 27 May 2005

B19V wird in drei Genotypen subklassifiziert: Genotyp 1 für die klassischen B19 Stämme, Genotyp 2 (Prototyp K71- und A6-like Stämme) sowie Genotyp 3a (Prototyp V9 Virus) und Genotyp 3b (D91.1 strain) (Parsyan A, 2007; Servant A, 2002). Genotyp 1 galt bisher als prädominant, aber neuere Daten implizieren, dass Genotyp 3 weiter verbreitet sein könnte als bisher angenommen (Hübschen JM, 2009).

A 2 **Aufbau**

A 2.1 *Viruspartikel und Genom*

Die hüllenlose Viruskapside des B19V bestehen aus 60 Kapsomeren, die in einer ikosaedrischen Struktur angeordnet sind (Ozawa K, 1987) (Abbildung 1). Die Kapside besitzen je einen Durchmesser von 22-24 nm und haben ein Molekulargewicht von ca. 4200 kDa bzw. 5500 – 6200 kDa, wenn sie das lineare DNA-Virusgenom enthalten (Cotmore SF, 1984).

Der DNA-Einzelstrang mit einer Größe von 5596 Nukleotiden besteht zu gleichen Anteilen aus 5 x 4 – 5 x 6 kb großen positiven und negativen Strängen. Er setzt sich aus einer inneren, kodierenden Region von 4830 Nukleotiden und zwei jeweils aus 383 Basen bestehenden palindromischen Sequenzabschnitten an den Genomenden zusammen. Diese palindromischen Sequenzabschnitte bezeichnet man auch inverted terminal repeats/ITR. Sie können eine haarnadelartige, doppelsträngige Konfiguration ausbilden, welche für die Synthese des Komplementärstranges als Primer dient (Astell CR, 1990). Der funktionelle Promoter von B19V ist der p6-Promoter am 3'-Ende des kodierenden Stranges. Der kodierende Anteil des Virus ist auf den Minusstrang beschränkt, der wie die meisten tierpathogenen Parvoviren, auch bei B19V drei offene Leserahmen besitzt.

B19V kodiert für drei relativ große Proteine: zwei Strukturproteine VP1 (Nukleotide 2444-4786) und VP2 (Nukleotide 3125-4786) (Abbildung 1) und ein Nichtstrukturprotein NS1 (Nukleotide 436-2451) (Shade RO, 1986; Ozawa K, 1988).

VP2 (58 kDa) und VP1 (83 kDa) entstehen durch das Spleißen des gleichen RNA-Transkriptes. Das B19V-Kapsid setzt sich zu 90-96 % aus VP2 und 4-10 % VP1 zusammen.

In der 3'-Hälfte des Genoms wird das dritte große Polypeptid, das Nichtstrukturprotein (NS1) codiert. NS1 ist an der Replikation der viralen DNA und der Regulation der Genexpression beteiligt (Rosenfeld SJ, 1992; Deiss V, 1990; Ozawa K, 1987; Luo W, 1993).

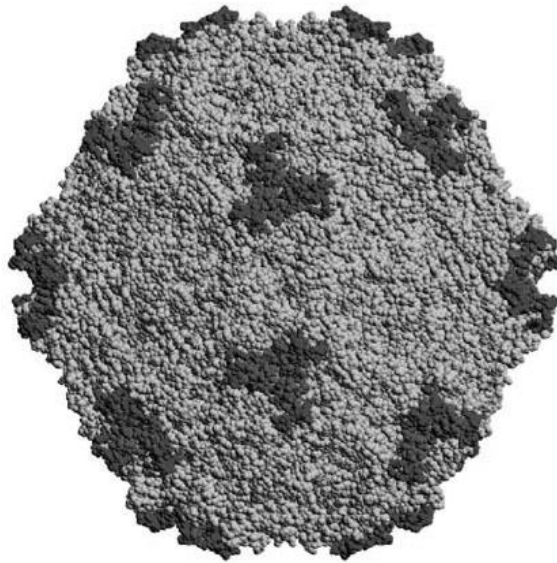


Abbildung 1: Aufbau eines B19V VP2-Partikels aus Bärbel Kaufmann et al, Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro, Virology, Volume 332, Issue 1, 5 February 2005, Pages 189-198.

Im Bereich des 5'-Endes des Genoms besteht ein kurzer, offener Leserahmen, der für das Nichtstrukturprotein NS2 (11kDa) codiert.

Die Basensequenz der Parvoviren ist im Vergleich zu anderen Viren weitgehend konstant. Sequenzunterschiede in verschiedenen Parvovirus-B19-Isolaten findet man gehäuft in den Bereichen, die für die VP1-unique region und die Übergangsregion zwischen der VP1-unique region und VP2 kodieren (Hemauer A, 1996). Eine Assoziation zwischen spezifischen Krankheitssymptomen und unterschiedlichen B19V-Sequenzen konnte bis jetzt nicht hergestellt werden (Hemauer A, 1996; Umene K, 1991).

A 2.2 Virusproteine

A 2.2.1 Strukturproteine

In den Kapsiden findet man die zwei Strukturproteine: VP1 und VP2. Sie sind sequenzidentisch und unterscheiden sich nur durch die 227 zusätzlichen Aminosäuren am aminoterminalen Ende von VP1, der sogenannten *VP1-unique region*. Die *VP1-unique region* wird durch gehäufte Variationen der Aminosäuresequenz im aminoterminalen Bereich charakterisiert und ist an der Oberfläche der Kapside lokalisiert (Abbildung 2). Die meisten der produzierten neutralisierenden Antikörper richten sich gegen Epitope in dieser Domäne (Ozawa K, 1987).

Der carboxyterminale Abschnitt der *VP1-unique region* besitzt zudem eine Phospholipase-A2 (PLA₂) ähnliche Enzymaktivität, die für die virale Infektiosität eine entscheidende Rolle spielt (Dorsch S, 2002): Sie ist für die Entlassung der Viren aus den Endosomen verantwortlich. PLA₂-Enzyme spalten Arachidonsäure von Phosphatidylcholin und anderen Phospholipiden in der Zellmembran ab. Aus der Arachidonsäure entstehen dann in einem mehrstufigen Prozess Prostaglandine und Leukotriene (Zádori Z, 2001).

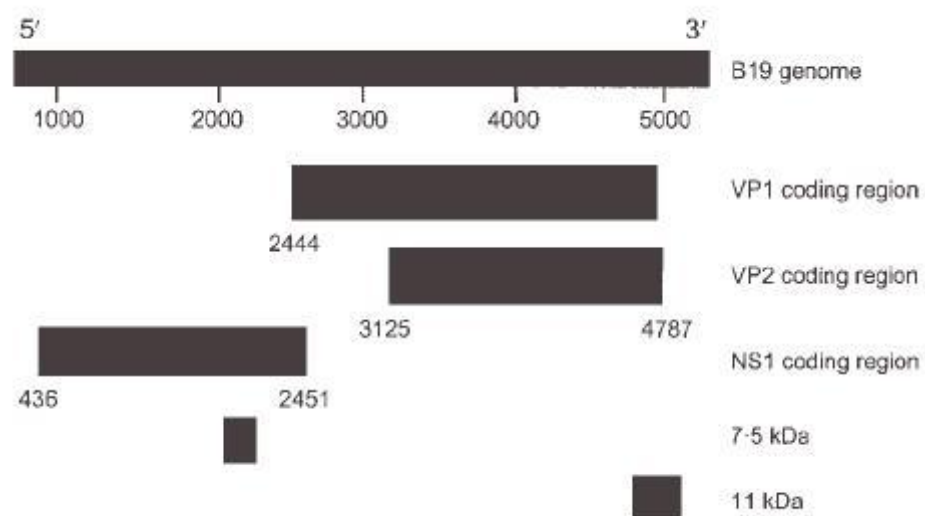


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Humanen Parvovirus B19 Genoms und dessen Transkriptionskarte aus Amanda Corcoran and Sean Doyle; *Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19*; Journal of Medical Microbiology 2004, 53: 459–475.

A 2.2.2 Nichtstrukturproteine

Neben den Strukturproteinen VP1 und VP2, werden mehrere Nichtstrukturproteine gebildet. Von diesen ist das NS1 mit einem Molekulargewicht von etwa 77 kDa am besten charakterisiert (Shade RO, 1986; Cotmore SF, 1986; Ozawa K, 1987). NS1 hat in der Regulation des viralen Lebenszyklus mehrere Funktionen inne, unter anderem in der Transkriptionskontrolle (Raab U, 2002), sowie der Replikation und Verpackung des Virus (Momoeda M, 1994). Das NS1 Protein weist einige Charakteristika auf, die für die Virus-Wirtszellen-Interaktion von Bedeutung sind. Es besitzt eine spezifische DNA-Bindungsfähigkeit als auch ATPase- und Helikaseaktivitäten, welche seine Zytotoxizität unter anderem über die Induktion von Apoptose erklären könnten (Mofatt S, 1998; Li X, 1990; Momoeda M, 1994; Chen Z, 2009).

Der dritte offene Leserahmen von B19V kodiert für das 11 kDa große NS2-Protein. Das NS2-Protein spielt eine wichtige Rolle für die Synthese der Strukturproteine und somit einer erfolgreichen Produktion infektiöser Viren (Zhi N, 2006). Es wird sehr hoch in erythroiden Vorläuferzellen exprimiert und ist dort für die Apoptoseinduktion mitverantwortlich (Chen AY, 2010).

A 3 Krankheitsverlauf und Pathogenese

A 3.1 Epidemiologie und klinisches Bild

B19V-Epidemien finden in einem etwa vierjährigen Zyklus statt (zwei Jahre einer Epidemie gefolgt von zwei Jahren einer Endemie). In Epidemiezeiten werden Infektionen besonders häufig im Zeitraum von Januar bis Juni in Schulen und Kindergärten registriert (Anderson MJ, 1987).

In der durchschnittlich ein- bis zweiwöchigen Inkubationszeit ist der Infizierte bereits virämisch und scheidet infektiöses Virus im Speichel und anderen Sekreten aus (Rice PS, 1996; Chorba T, 1986). Das Prodromalstadium ist durch grippeähnliche Symptome wie leichtem Fieber, Krankheitsgefühl und Myalgien gekennzeichnet. Eine infektionsbedingte, alterierte Hämatopoese ist für einen Zeitraum von 7-10 Tagen, ein kompletter Ausfall der Blutbildung für 3-7 Tage zu beobachten (Wildig J, 2006).

Das phänotypische Korrelat der Infektion erythroider Vorläuferzellen zeigt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Form von Pronormoblasten. Diese Zellen wurden erstmalig 1948 im Knochenmark von Menschen mit aplastischer Krise beschrieben (Owren, PA 1948). Pronormoblasten finden sich bei jedem B19V-Infizierten, selbst wenn die Infektion klinisch inapparent verläuft.

Die Virämie nimmt in der zweiten Woche *post infectionem* ab und B19V-spezifische IgM-Antikörper werden im Blut nachweisbar. Eine zweite Phase mit klinischen Symptomen schließt sich in der dritten Woche, begleitet von einem Titer-Anstieg B19V-spezifischer IgG-Antikörper, an. Es können sich Arthralgien und auch das mit einer B19V-Infektion assoziierte Erkrankungsbild Erythema infectiosum, im englischen Sprachgebrauch wegen seiner charakteristischen Morphologie auch als „slapped cheek disease“ bezeichnet, manifestieren. Dieser makulopapulöse Ausschlag tritt meist zunächst auf die Wangen beschränkt auf und breitet sich im weiteren Verlauf an den Innenseiten der Extremitäten aus, um schließlich nach 1-5 Tagen abzuklingen. Der Großteil der

Infektionen, insbesondere im Kindesalter verlaufen asymptomatisch (Woolf AD, 1989; Cartter ML, 1991; Modrow, 2001).

Findet eine B19V-Infektion während der Schwangerschaft statt, so kann das Virus transplazentar auf den Fetus übertragen werden und abhängig vom Zeitpunkt der Schwangerschaft Aborte oder Hydrops fetalis (Sarfraz AA, 2009; Beigl RH, 2008; Tolfvenstam T, 2009) verursachen.

A 3.2 Prävalenz und Transmissionswege

Infektionen mit dem B19V treten weltweit auf und finden zu 50 % in der Kindheit statt. Bei Immunkompetenz besteht nach einer abgelaufenen Infektion mit B19V eine lebenslange Immunität. Die Seroprävalenz von IgG-Antikörpern steigt von 2–15 % in der Altersgruppe 1-5 Jahre, auf 15-60 % bei 6-19 Jährigen und schließlich 30–60 % bei Erwachsenen an. Da auch eine Infektion im Erwachsenenalter möglich ist, finden sich bei der geriatrischen Bevölkerung Durchseuchungsraten von bis zu 85 % (Heegaard ED, 2002; Kelley HA, 2000; Tsujimura M, 1995; Röhrer C, 2008).

Meist gelangt das Virus oral über den Respirationstrakt via Tröpfcheninfektion in den Organismus. Das Risiko einer potentiellen, iatrogenen Transmission ist bei Transfusionen von kontaminierten Blutprodukten und Knochenmark sowie Organtransplantationen gegeben (Heegaard ED, 2000; Koenigbauer UF, 2000; Parsyam A, 2007; Broliden, 2001).

A 3.2.1 Übertragung durch Blut und Blutprodukte

B19V-DNA konnte in vielen Blutprodukten nachgewiesen werden: unter anderem in Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten (Cohen BJ, 1997), Immunglobulinen (Erdman DD, 1997), Fibrinpräparaten (Hino M, 2000), plasmatischen Gerinnungsfaktorpräparaten (Fryer JF, 2007) und Albumin. Das Transmissionsrisiko wurde u.a. in einer Langzeitstudie bei Patienten mit einem angeborenen Gerinnungsdefekt, welche vielfach mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren behandelt wurde, evaluiert. Die Patienten zeigten eine deutlich höhere Seropositivität für B19V als gleichaltrige Gesunde. (Azzi A, 1999; Peerlinck K, 1995; Eis-Hubinger AM, 1996; Mauser Bunschoten EP, 1998).

Bei hämatologischen und onkologischen Patienten besteht aufgrund des erhöhten Bedarfs an diesen Produkten eine gesteigerte Expositionsgefahr. Zudem ist bei diesen Menschen, aufgrund der zugrunde liegenden hämatologischen Erkrankung bzw. der therapeutischen

Immunsuppression, ein schwererer bis lebensbedrohlicher Verlauf einer B19-Infektion zu erwarten (Evans JP, 1984).

Eine komplette Virusneutralisierung bei diesen Produkten konnte wegen seiner Resistenz gegenüber verschiedensten physikalischen und chemischen Inaktivierungsmethoden bisher nicht bewerkstelligt werden (Santagostino E, 1994).

Selbst im Plasma gesunder Menschen liegt nach einer B19V-Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit, wenn auch auf einem sehr geringen Niveau, eine langanhaltende Virämie vor. Daher muss die Frage einer Transmissionsgefahr durch Einzelpräparate gerade bei Patienten mit Immunsuppression neu gestellt werden (Llewellyn C, 2004).

Trotz der heutigen Studienlage ist ein Routinescreening auf B19V-DNA in Blutprodukten abgesehen von den nachfolgenden zwei Ausnahmen noch nicht gesetzlich vorgeschrieben. Seit dem 1. Juni 2007 ist für Anti-D Immunglobuline und gepooltes, virusinaktiviertes Plasma eine Höchstgrenze von 1×10^4 IU/ml von der europäischen Arzneimittelkommission (European Medicines Agency, EMEA) festgesetzt worden.

Einige Hersteller von Plasmaderivaten testen jedoch ihre Produkte mittels quantitativer Polymerase Chain Reaction (PCR) (Aberham C, 2001). Die nordamerikanische FDA (Food and Drug Administration) schlug vor, dass die nachweisbare B19V-DNA-Kopienzahl in Herstellerplasmapools, unabhängig von dem verwendeten Testsystem, einen Richtwert von 1×10^4 geq/ml nicht überschreiten sollte (Brown KE, 2001). In den Niederlanden wurde vorgeschlagen, dass Konzentrate von Spendern mit hohen anti-B19V-IgG Titern für Hochrisikopatienten verwendet werden sollten (Groeneveld K, 2003). Die zugrundeliegende Rationale dafür war, dass die spezifischen neutralisierenden IgG im Produkt eine transfusionsassoziierte Infektion potentiell verhindern könnten.

A 3.3 Infektionszyklus (zellulär)

A 3.3.1 Bindung an die Zelle und Zellrezeptoren

Das Virus interagiert über die Oberflächenstrukturen des Kapsidproteins VP2 mit dem Blutgruppenantigen P. Dieses wird auch als Globoside 4 (Gb4) bezeichnet und ist ein Glycosphingolipid, das auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Brown KE, 1993). Dieser Rezeptor wird auf erythroiden Zellen aber auch auf vielen anderen Zellen, wie Synoviozyten, Thrombozyten, Megakaryozyten, Endothelzellen und fetalen Myozyten gefunden (Cooling LL, 1995; Rouger P, 1987). Diese werden jedoch im Gegensatz zu den erythroiden Vorläufern nicht infiziert.

Personen, die kein Blutgruppenantigen P₀ besitzen, resistent gegen B19V (Brown KE, 1994). In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an löslichem Blutgruppenantigen P oder ein dagegen gerichteter monoklonaler Antikörper erythroide Vorläuferzellen vor einer Infektion schützt (Brown KE, 1993). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das Blutgruppenantigen P obligatorisch für eine B19V-Infektion ist. Diese Interaktion allein kann dem Virus jedoch nicht den Eintritt in die Zelle ermöglichen (Weigel-Kelley KA, 2001). Das B19V benötigt einen weiteren Co-Rezeptor auf der Zelloberfläche für eine erfolgreiche Infektion (Weigel-Kelley KA, 2003).

Das $\alpha 5\beta 1$ Integrin wurde als ein potentieller Rezeptor identifiziert. Seine Co-Expression als Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion könnte eine Erklärung für die ausschließlich in erythroiden Vorläuferzellen stattfindende Virusreplikation sein. Im Gegensatz zu einigen der infektionsresistenten Zellen, die das Blutgruppenantigen P besitzen, exprimieren die sensiblen, erythroiden Vorläuferzellen auch gleichzeitig hohe Level von $\alpha 5\beta 1$ Integrin.

Erythroide Vorläuferzellen scheinen einen Pool von vulnerablen Zellen zu bilden, deren Anfälligkeit für eine Infektion im Laufe ihrer Differenzierung weiter zunimmt. Eine B19V-Replikation und auch die Bildung von infektiösen Produkten konnte in hämatopoetischen Vorläuferzellen von Blutspendern (Schwarz TF, 1992), in primären humanen Nabelschnurblutzellen (Srivastava CH, 1992) und in erythroiden Zelllinien der fetalen Leber (Yaegashi N, 1989) nachgewiesen werden.

Als weiterer Co-Rezeptor, der den Eintritt des Virus in die Zelle ermöglichen soll, wurde das Ku80 Autoantigen vorgestellt (Munakata Y, 2005).

A 3.3.2 Virale Aufnahme in die Zelle

Nach der Bindung an die zellulären Rezeptoren gelangen Parvoviren wahrscheinlich durch eine rezeptorgesteuerte, Clathrin-abhängige Endozytose in die Zielzellen. Der Infektionsmechanismus auf zellulärer Ebene, einschließlich des viralen Eintrittsmechanismus in die Zelle, das Uncoating, den Transport in den Zellkern und den Wiederaustritt aus der Zelle ist noch nicht im Detail geklärt.

Für die intrazellulären Infektionswege von B19V scheint die virale PLA₂-Aktivität eine große Rolle zu spielen (Suikkanen S, 2003; Dorsch S, 2002).

A 3.4 Immunantwort

A 3.4.1 Immunantwort bei einer akuten Infektion

Die B19V-Virämie kann etwa eine Woche nach Infektion im Blut und in nasotrachealen Sekreten nachgewiesen werden. Bei einer immunkompetenten Person sind virale Serومتiter bis zu 10^{12} geq/ml möglich (Prowse C, 1997).

Mit Beginn der humoralen Immunantwort und der klinischen Symptome zeigt sich charakteristischerweise eine Abnahme der Menge an B19V-DNA (Cassinotti P, 2000). Niedrige Titer von 10^3 bis 10^5 geq/ml bleiben über Monate und teilweise sogar Jahre nach der Infektion nachweisbar (Lindblom A, 2005; Lefrère JJ, 2005; Musiani M, 1995). Ob es sich dabei um ein Virus mit erhaltener Gesamtlänge, intakten Vironen oder überhaupt potentiell erhaltener Virulenz handelt, ist bisher unbekannt.

Die humorale Immunantwort spielt für die Pathogenese und die Eliminierung des Virus eine entscheidende Rolle (McMichael AJ, 1983). Sieben bis zehn Tage nach der Infektion, zeigt sich mit dem Rückgang der Virämie in etwa 90 % der Fälle eine IgM-Reaktivität, die nach ca. 10 - 12 Tagen ihren Höhepunkt erreicht. Sie ist zuerst sowohl gegen lineare als auch Konformationsepitope von VP2 und im Anschluss auch von VP1 gerichtet (Schwarz TF, 1988). In Untersuchungen mit Immunoblotting zeigte sich, dass IgM-Antworten gegen die linearen VP1 relativ häufiger und langwieriger sind als die gegen VP2 (Palmer P, 1996). Die prädominante IgM-Immunantwort scheint sich gegen konformationelle VP-Epitope zu richten (Manaresi E, 2001).

Nach dem Auftreten der ersten Symptome fällt die Produktion der IgM-Antikörper über einen Zeitraum von ein bis zwei Monaten wieder ab (Anderson LJ, 1986). Niedrige IgM-Titer können jedoch teilweise bis zu vier Monate nach der Infektion (Shneerson JM, 1980) und bis zu 20 Wochen nach einer Virämie mit Hilfe eines ELISA detektiert werden (Schwarz TF, 1988).

Mit dem Abklingen der IgM-Immunantwort treten IgG-Antikörper gegen VP1 und VP2 in den Vordergrund und können durch IFA, Western-Blot und ELISA nachgewiesen werden (Pfrepper KI, 2005; Anderson LJ, 1986). Ähnlich wie bei der IgM-Antwort richten sich die IgG-Antikörper gegen konformationelle und sequentielle VP1- und VP2-Determinanten. Diese Antikörper besitzen eine hohe Avidität und sind für die lebenslange Immunität verantwortlich. Die Titer nehmen nur sehr langsam ab und werden immer wieder durch den erneuten Kontakt mit B19V verstärkt.

Die virusspezifischen, schleimhautprotektiven IgA-Antikörper erreichen etwa eine Woche nach Auftreten der spezifischen Symptome ihren Höhepunkt und besitzen eine potentielle Bedeutung für den Respirationstrakt (Erdman DD, 1991). Sie können unter Umständen für Monate persistieren (Bluth MH, 2005). Die Funktion der langlebigen spezifischen IgE-Antikörper ist noch ungeklärt (Bluth MH, 2003).

Im Vergleich zur humoralen Reaktion ist über die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen B19V weniger bekannt (Tolvenstam T, 2001). Einige Zeit ging man davon aus, dass bei einer B19V-Infektion keine zelluläre Immunantwort stattfindet. Mittlerweile wurde gezeigt, dass B19V eine starke, vielseitige und spezifische CD8-T-Zell-Antwort in der akuten Phase der Infektion auslöst, die über einen langen Zeitraum aufrechterhalten wird (Badovinac VP, 2002; Hou S, 1994). Die andauernde Immunantwort erreicht in der Mehrzahl der beobachteten Fälle nach etwa einem Jahr ihren Höchststand, konnte aber teilweise nach einem Zeitraum von zwei Jahren nachgewiesen werden. Dieses Phänomen könnte unter Umständen eine Rolle in der dauerhaften Pathogenkontrolle spielen (Isa A, 2005).

Anders als die humorale Antwort gegen B19V, deren neutralisierende Epitope sich vor allem gegen strukturelle Proteine richten, steht bei der zellulären Antwort das NS1-Protein bei akut infizierten Personen im Vordergrund (Saikawa T, 1993; Keer S, 1999; Manaresi E, 1999).

A 3.4.1.1 Phasen der akuten Infektion

Die verschiedenen Phasen der akuten Infektion sind durch spezifische Antikörperkonstellationen charakterisiert (Abbildung 3). Die Untersuchung der IgG-Reaktivität gegen native und denaturierte (lineare) VP2-Kapsidproteine (Söderlund M, 1995) zeigte, dass die Reaktivität gegen lineare VP2-Epitope mit einer aktiven B19V-Infektion korreliert. Diese nimmt innerhalb von sechs Monaten ab und fehlt gänzlich bei Patienten mit bestehender Immunität. Die konformationelle VP2-Antikörper hingegen persistieren.

Bei einer kürzlich stattgefundenen Infektion ist eine gemischte IgG-Zusammensetzung gegen lineare VP1- und gegen konformationelle VP2-Epitope charakteristisch. Diese Antikörper persistieren meist über Monate oder sogar Jahre (Manaresi E, 1999).

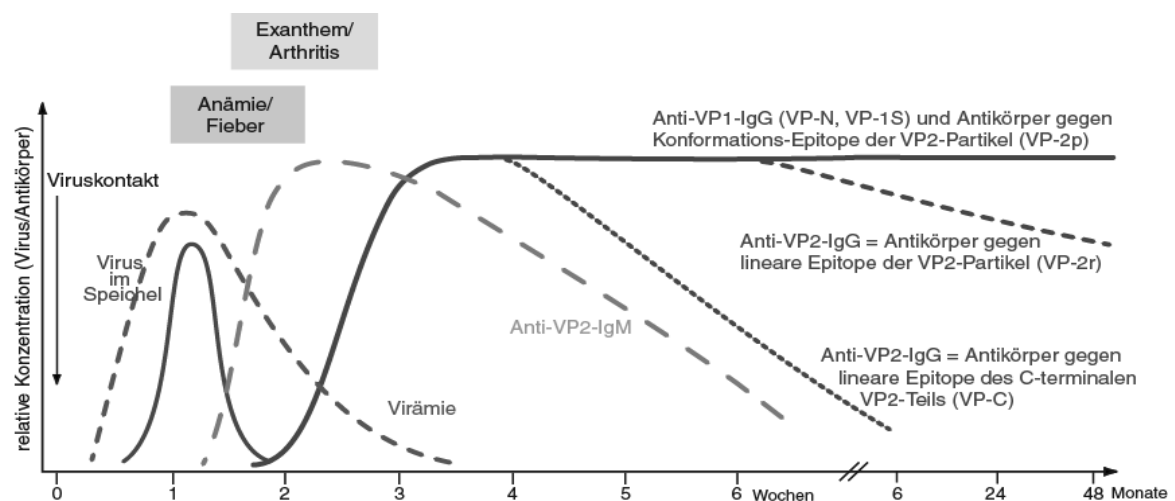


Abbildung 3: Serologischer Verlauf einer akuten Parvovirus B19 Infektion aus Modrow Susanne: Parvovirus B19: Ein Infektionserreger mit vielen Erkrankungsbildern Deutsches Ärzteblatt 2001; 98(24): A-1620 / B-1390 / C-1293

IgG gegen lineare Antigene von VP2 können primär während einer aktiven oder gerade abgelaufenen Infektion bzw. in der Konvaleszenzphase nachgewiesen werden. Der verlässlichste Indikator für eine abgelaufene Infektion ist der Nachweis von IgG gegen konformationelle VP2-Epitope durch EIA (Jordan JA, 2000; Butchko AR, 2004).

Nur ein Teil der neu oder ehemals infizierten Personen, bei denen IgG gegen Strukturproteine nachgewiesen werden können, besitzen auch Antikörper gegen Nicht-Strukturproteine (Searle K, 1998; Ennis O, 2001). Ob diese Konstellation auch bei einer akuten oder persistierenden Infektion Gültigkeit besitzt, konnte nicht abschließend geklärt werden (von Poblitzki A, 1995; Hemauer A, 2000; Jones LP, 1999, Searle K, 1998, Anderson LJ, 1986).

Bei immunsupprimierten Menschen ist auf Grund der fehlenden adäquaten Immunantwort, u.a. in Form der Antikörperproduktion, und der gegebenenfalls therapeutisch indizierten Applikation von Blutprodukten oder Immunglobulinen eine serologische Diagnostik erschwert.

A 3.5 Komplikationen bei einer Parvovirus B19 Infektion

In den letzten Jahren zeigte sich zusehends, dass B19V-Infektionen nicht nur mit dem Auftreten des harmlosen Erythema infectiosum sondern, gerade bei bereits bestehender Beeinträchtigung des Immunsystems bzw. der Hämatopoese, mit einer Reihe von schweren bis lebensbedrohlichen Krankheitsbildern assoziiert sein können. Abgesehen von der häufig beschriebenen aplastischen Krise, traten auch das gloves-and-socks-Syndrom, schwere Thrombozyto- und Neutropenien (Hanada T, 1989; Klepfish A, 2006), Hepatiden (Eid AJ, 2006) und Myokarditiden (Modrow, 2006) auf, selbst Enzephalitiden (Erol I, 2006) wurden beobachtet.

A 3.5.1 Patienten mit Immunsuppression

Das klinische Bild einer B19V-Infektion bei immunsupprimierten Patienten unterscheidet sich signifikant von dem eines immunkompetenten Menschen (Tabelle 2). Durch das Fehlen einer effizienten humoralen und/oder zellulären Immunantwort, kann die Infektion eine persistierende Knochenmarksuppression bedingen, die sich etwa in einer chronischen Anämie äußert, jedoch eher ohne zu den typischen, immunvermittelten Symptomen wie Exanthem und Arthralgien zu führen (Koch WC, 1990). Diese Beobachtung wurde im Zusammenhang mit Immundefizienzen verschiedenster Genesen gemacht. Diese umfassen kongenitale und hämato-onkologische Erkrankungen (Leukämien, Lymphome, MDS, etc.), die iatrogene Immunsuppression wie bei Autoimmunerkrankungen und Organtransplantationen, Nebenwirkungen einer Chemotherapie oder immunkompro-

mittierende Infektionen (Broliden, 2001; Egbuna O, 2006; Koch WC, 1990; Heegard ED, 1997; Nour B, 1993; Shen Q, 2010).

Da die Symptome bei diesen Patienten relativ unspezifisch sind, führt dies zu Fehldiagnosen. Diese reichen von vermeintlichen Krankheitsrezidiven, mikrobiellen Infektionen, Transplantatversagen bis hin zu toxischen Medikamentennebenwirkungen. Tatsächlich werden etwa 1 - 2 % der lebensbedrohlichen Komplikationen bei Patienten nach einer Organ- oder Stammzelltransplantation durch B19V hervorgerufen (Broliden, 2001). Nicht zuletzt da sich die für eine adäquate Therapie essentielle frühzeitige Diagnose oft schwierig gestaltet.

Abgesehen von der B19V-typischen Tröpfcheninfektion über den Respirationstrakt, scheint im Rahmen einer iatrogenen Immunsuppression wie zum Beispiel nach Transplantation auch die Reinfektion bzw. die virale Reaktivierung aus einem persistierenden Stadium eine wichtige Rolle zu spielen (Broliden, 2001; Heegaard ED, 2002; Gallinella G, 1999). Die Unterscheidung einer viralen Reaktivierung und einer transfusions- oder transplantationsbezogenen B19V-Infektion ist jedoch schwierig bis unmöglich.

Wahrscheinlichkeit	Erkrankung
Immunkompetente Personen – häufig	Ringelröteln (Erythema infectiosum), transiente Anämie, transiente Thrombozytopenie, transiente Granulozytopenie, Arthralgien/Arthritis
Immunkompetente Personen – selten	Persistierende Thrombozytopenie, persistierende Granulozytopenie, Purpura Schönlein-Henoch, idiopathische thrombozytopenische Purpura, Panzytopenie, virusassoziiertes hämophagozytäres Syndrom (VAHS), akutes Leberversagen/Hepatitis, Myokarditis, Glomerulonephritis, Enzephalitis, Myelitis transversa
Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen	Schwere Anämie, aplastische Krise
Immunsupprimierte Patienten	Chronische Anämie, chronische Arthritis, chronische Thrombozytopenie, chronische Granulozytopenie, chronische Panzytopenie, Erythroblastopenie (pure red cell aplasia), Myokarditis/Perikarditis/ akutes Herzversagen, akutes Leberversagen/ Hepatitis, Meningitis/Enzephalitis
Ungeborene	Spontanabort, Hydrops fetalis, intrauteriner Kindstod

Tabelle 2: Erkrankungen, die in Zusammenhang mit Parvovirus B19-Infektionen auftreten aus: Modrow Susanne: Parvovirus B19: Ein Infektionserreger mit vielen Erkrankungsbildern Dt Ärztebl 2001; 98: A 1620–1624 [Heft 24]

A 3.5.2 Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen

Bei Menschen mit hämatologischen Vorerkrankungen kommt es häufig zu einem schwerwiegenderen Verlauf einer B19V-Infektion. Dies ist auch, weil das Risiko eine aplastische Krise zu entwickeln zusätzlich erhöht ist (Serjeant BE, 2001; Kudoh T, 1994). Bei einer aplastischen Krise, welche erstmals bei Patienten mit hämolytischen Anämien beschrieben wurde, kann es infolge einer Knochenmarkaplasie zu einer Panzytopenie kommen. In Zusammenhang mit B19V-Infektionen wurde dieses Krankheitsbild bei vielen Störungen des hämatologischen Systems beobachtet: bei Anämien unterschiedlicher Ätiologie (Serjeant BE, 1993; Saarinen UM, 1986; Fu Y, 2002; Rao SP, 1996), bei der hereditären Sphärozytose (Oh SE, 2005), bei Enzymanomalien wie der Pyruvatkinasedefizienz (Duncan JR, 1983), als auch bei Patienten mit Evans-Syndrom (Uike N, 1993). Zu lebensbedrohlichen Zuständen können in diesen Fällen sowohl ein drastischer Abfall des Hämoglobinwertes infolge der virusbedingten Knochenmarksuppression, als auch die mit einer aplastischen Krise assoziierte zerebrovaskulären Symptomatik, ein Herz- oder akutes Nierenversagen führen (Smith-Whitley K, 2004).

Eine B19V-Infektion kann jedoch nicht nur zur Exazerbation bis hin zur aplastischen Krise bei einer Vorerkrankung führen, sondern auch eine autoimmunologische oder hämatologische Grunderkrankung demaskieren bzw. auslösen. Sowohl das Auftreten des Kawasaki-Syndroms als auch das des Evans-Syndroms werden mit einer B19V-Infektion in Verbindung gebracht (Nigro G, 1994; Toyokawa Y, 2007; Uike N, 1993)

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen einer B19V-Infektionen und der erneuten Aktivierung einer hämatologischen Grunderkrankung bei bis dahin indolenten Verläufen. So wurde das Auftreten einer akuten Thrombozytopenie bei Patienten mit einer idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) (Aktepe OC, 2004) bzw. das Wiederauftreten einer Fanconi-Anämie im Zusammenhang mit einer B19V-Infektion registriert (Tchernia G, 1993).

Auf der anderen Seite kann eine akute B19V-Infektion einer (malignen) Erkrankung täuschend ähneln. Es wird von pädiatrischen Patienten mit einer diagnostizierten myelomonozytären Leukämie bzw. MDS berichtet, welche sich als akute B19V-Infektionen entpuppten (Ozdemir N, 2010; Yetgin S, 2000).

An gesunden Testpersonen konnte gezeigt werden, dass das Virus nicht nur die Bildung der Erythrozyten, sondern auch die der Myelozyten und der Thrombozyten beeinträchtigt (Anderson MJ, 1985) (Tabelle 2). Diese Beobachtung konnte in der Klinik durch nachgewiesene B19V-assoziierte Thrombozytopenien, Neutropenien und Panzytopenien bei Patienten bestätigt werden (Hanada T, 1988; Rao SP, 1996; Saarinen UM, 1986; Klepfish A, 2006).

A 3.5.3 Persistenz des Virus

Eine persistierende B19V-Infektion ist häufig mit einem gewissen Grad an Immundefizienz oder Anomalien in der Immunantwort assoziiert (Moudgil A, 1997; Fattet S, 2004; Blaeser F, 2005). Diese können sich als quantitative als auch qualitative Defekte in der humoralen Antwort präsentieren (Kurtzmann GJ, 1989). So kann die globale Bildung von Antikörpern beeinträchtigt sein bzw. B19V-spezifische Antikörper gebildet werden, die das Virus nicht neutralisieren können.

Welch große Rolle die humorale Immunantwort bei viraler Persistenz spielen könnte, wurde im Fall eines an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankten Kindes gezeigt. Eine erfolgreiche Viruselimination ging mit dem Anstieg der VP2-spezifischen

B-Gedächtniszellen (memory cells) und der gleichzeitigen Abnahme der Immunantwort gegen NS1 einher (Corcoran A, 2006). Die zuvor erfolgte intravenöse Therapie mit Immunglobulinen war frustriert verlaufen.

Neuere Studiendaten, die unter Verwendung von hochsensitiven, molekularen Nachweismethoden erhoben wurden, deuten jedoch daraufhin, dass virale DNA auch in Immunkompetenten persistieren kann (Cassinotti P, 2000; LaMonte AC, 2004; Lefrère JJ, 2005). Das Virus kann regelmäßig in den unterschiedlichsten Geweben des Körpers wie Knochenmark, Synovia, Synovialmembranen, Haut, Leber und Herzmuskel nachgewiesen werden (Cassinotti P, 1998; Hokynar K, 2002; Zakrzewska K, 2001; Kueth F, 2009; Corcioli F, 2010).

Abgesehen von der Immunantwort werden weitere entscheidende Mechanismen diskutiert, wie das Konzept eines sogenannten „Bioportfolios“, welches das B19V ein Leben lang speichert (Norja P, 2006). So scheint das Virus, ohne sich nach der akuten Infektionsphase zu replizieren, in bestimmten Nischen des Körpers zu verbleiben (Woollf AD, 1995; Cassinotti P, 2000). In Knochenmark und Synovia wird das B19V-Genom häufiger als im peripheren Blut nachgewiesen (Heegaard ED, 2002; Cassinotti P, 1998). Es ist in 2 % der Knochenmarkproben gesunder Spender zu finden (Heegaard ED, 2002). Man geht davon aus, dass fast alle Menschen, die in Kontakt mit B19V kommen, das funktionsfähige Virus ein Leben lang auf einem sehr niedrigen Niveau und unter der Kontrolle des Immunsystems im Körper behalten.

So ein stabiles, jedoch sensibles Equilibrium von Virus und Immunkontrolle kann sich dramatisch verändern, wenn das Immunsystem seine Effektivität verliert, sei es als Folge einer onkologischen Erkrankung, einer iatrogen verursachten Immundefizienz durch Chemotherapie oder im Rahmen einer induzierten Immunsuppression bei Knochenmark- oder Organtransplantation. Diese Umstände scheinen eine Reaktivierung des Virus zu ermöglichen, welche durch einen Viruslastanstieg gekennzeichnet ist.

A 3.6 Therapie und Prävention

Im Gegensatz zu immunkompetenten Menschen, die meist keinerlei Therapie bedürfen, ist im Falle einer Viruspersistenz, bei einer schwerwiegenden Anämie oder bei der Infektion von immunsupprimierten Patienten eine Behandlung indiziert. Da es keine

spezifische antivirale Therapie gibt, kommen je nach Immunstatus und Vorgeschichte des Patienten verschiedene Behandlungsmethoden zum Einsatz.

Als einziges Mittel einer spezifischen antiinfektiösen Therapie steht die Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) zur Verfügung. Der Anteil an Anti-B19-IgG positiven Spendern ist hoch und somit enthalten gepoolte IVIG ausreichend hohe Titer, um therapeutisch wirksam zu sein. Selbst durch die Gabe von Anti-B19V-IgG enthaltenden Vollblutprodukten konnte bei akut infizierten, anämischen Kindern die wirtsspezifische B19V-Immunantwort herunterreguliert werden (Parsyan A, 2006).

Bei immunsupprimierten Patienten mit einem Mangel an neutralisierenden Antikörpern hat sich die intravenöse Gabe von Immunglobulinen in einer Dosis von 0,4g/kg für 1-5 Tage bzw. 1g/kg über einen Zeitraum von 13 Tagen bewährt. In vielen Fällen ist die Gabe der Immunglobuline kurativ und B19V wird vollständig aus dem Körper eliminiert (Kurtzman G 1989; Frickhofen N, 1994; Koduri PR, 1999).

Manchmal führt die Gabe von IVIG trotz eines Abklingens der Symptome nicht zur Elimination des Virus, so dass dieser im Organismus persistiert (Blaeser F, 2005). Eine persistierende B19V-Infektion spricht, selbst bei offensichtlich immunkompetenten Menschen, die neutralisierende Antikörper besitzen, nicht besonders gut auf eine Therapie mit IVIG an. Sie kann aber unter Umständen eine transiente Remission induzieren (Lundqvist A, 1999). Bei Patienten, die eine Chemotherapie erhalten oder auf eine andere Weise iatrogen immunsupprimiert sind, verschwindet eine persistierende B19V-Infektion meist mit dem Therapieende (Carstensen H, 1989; Smith MA, 1988).

Der aus viralen, rekombinanten VP1/2-Kapsiden mit Hilfe eines Baculovirus-Systems entwickelte aktive Impfstoff induzierte, wie in präklinischen Studien an Versuchstieren gezeigt wurde, die Produktion neutralisierender Antikörper (Bansal GP, 1993). In den anschließenden randomisierten, klinischen Phase-I-Studien wurden die Sicherheit und Immunogenität dieses rekombinanten Impfstoffes getestet (Ballou WR, 2003). Das Vakzin führt zur Produktion neutralisierender Antikörper für einen nachgewiesenen Mindestzeitraum von einem Jahr ohne schwerwiegende Nebenwirkungen zu verursachen (Ballou WR, 2003). Eine Weiterentwicklung des Impfstoffes gegen B19V wird durch das mangelnde kommerzielle Interesse nicht jedoch durch einen Mangel an Wirksamkeit oder Sicherheit gebremst (Young NS, 2004).

A 4 Zielsetzung

B19V-Infektionen sind im Kindesalter häufig und verlaufen bei gesunden Kindern meist harmlos. Bei Kindern mit hämatologischen Grunderkrankungen oder Tumoren haben B19V-Infektionen wesentlich schwerere Verläufe. Wie häufig diese zu beobachten sind, ist jedoch unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte bei pädiatrischen Patienten mit hämatologischen oder onkologischer Erkrankungen sowohl das Vorkommen einer B19V-Infektion, das Infektionsstadium und die Aktivität der Infektion sowie deren etwaige Auswirkungen auf Verlauf und Therapie über einen längeren Zeitraum evaluiert werden. Die Beobachtungen aus den erhobenen Daten sollen dabei helfen, (A.) Infektionsrisiken zu minimieren (B.) und Komplikationen möglichst frühzeitig zu erkennen. Eine verbesserte individuelle Risikoeinschätzung im untersuchten Patientenkollektiv innerhalb des Konzepts der personalized medicine könnte die präemptive Behandlung oder sogar Vorbeugung infektionsassoziiertter Komplikationen ermöglichen. Damit ist im Idealfall eine bessere Lebensqualität bei gleichzeitiger höherer Kosteneffizienz zu erreichen.

A 5 Vorbereitung und Material

A 5.1 Zusammensetzung der Studie

In diese Studie wurden 110 Kinder und Jugendliche eingeschlossen, die wegen hämatologischer oder onkologischer Erkrankungen verschiedener Entität und Dignität in stationärer Behandlung in der Kinderklinik St. Hedwig waren. Jedes der in die Studie aufgenommenen Kinder war im Zeitraum von 12.2004 - 07.2007 stationärer Patient der hämato-onkologischen Abteilung. Von 25 der Patienten waren Serum- und Knochenmarkproben vorhanden, welche bereits März/April 2004 abgenommen worden waren und somit retrospektiv untersucht wurden.

Im Verlauf der Therapie konnten von 60/110 Patienten (54.5 %) zusätzlich zur initialen Knochenmark- und Blutuntersuchung zu späteren Zeitpunkten weitere Serum- und Knochenmarkproben gesammelt werden. Bei dieser Gruppe von Patienten mit Verlaufsproben betrug die durchschnittliche Beobachtungszeit 12 (2-44) Monate.

A 5.2 Untersuchungsmaterial

Es wurden jeweils 200 µl Serum- und Knochenmarkproben in EDTA-beschichteten Röhrchen abgenommen. Eine unterschriebene Einwilligungserklärung der Erziehungs-

berechtigten zur Teilnahme an dieser Studie lag konform zur Deklaration von Helsinki vor jedweder Entnahme vor.

A 6 Experimentelle Methoden zum Nachweis einer Parvovirus B19 Infektion

Eine B19V-Infektion kann entweder direkt über den Nachweis der viralen aus dem Blut oder anderen Gewebeproben diagnostiziert werden bzw. indirekt über den Nachweis im peripheren Blut zirkulierender virusspezifischer IgG- und IgM-Antikörper. Für den Nachweis von Immunglobulinen wurden standardmäßig Western-Blot- oder ELISA-Verfahren verwendet (Pfrepper KI, 2005; Anderson LJ, 1986; Butchko AR, 2004). Der direkte Nachweis der DNA mittels PCR ist hoch sensitiv und wird zur Diagnostik akuter oder persistierender Infektionen eingesetzt (Aberham C, 2001; Koppelman MH, 2004).

A 6.1. Immunglobulinnachweis

Alle Serumproben wurden mittels RecombWell-ELISA-Test (Mikrogen GmbH, Neuried, Deutschland) auf das Vorhandensein von IgG- und IgM-Antikörpern gegen VP1 bzw. VP2 getestet. Serumproben, die positiv für IgG und/oder IgM waren, wurden mit WesternLine Assay (Recomline, Mikrogen GmbH, Pfrepper KI, 2005) hinsichtlich IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen konformationelle und lineare VP2-virus-like, lineare VP1/VP2- und gegen NS1- Epitope untersucht.

A 6.1.1. ELISA

Das Testverfahren ist ein indirekter Sandwich-Test, bei dem die rekombinanten Antigene an die Festphase gebunden sind. Da B19V nicht in Zellkulturen wächst, werden rekombinante B19V-Kapsidproteine als Antigenquelle in serologischen Tests verwendet. Expressionssysteme sind zum Beispiel der eukaryotische Baculovirus und ein genetisch verändertes bakterielles System (Kajigaya S, 1991; Brown CS, 1990; Morinet F, 1989).

Bei dem Verfahren wurden alle Reagenzien bei Raumtemperaturwärme eingesetzt. Im ersten Schritt der Inkubation wurden je 100 µl der 1:101 verdünnten Patientenproben, der analog verdünnten Negativ-, der Positiv- und der Cut-off-Kontrollen in je mindestens eine Kavität (die Cutoff Kontrolle wurde immer im Duplikat angelegt) zugegeben, mit Abdeckfolie abgeklebt und für eine Stunde bei 37° C inkubiert.

Nach der vollständigen Entleerung der Kavitäten wurden die Zellen viermal mit je 300 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer per Kavität gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte auf einem Papiertuch ausgeschlagen um sicherzustellen, dass die letzten Flüssigkeitsreste entfernt wurden.

Daraufhin erfolgte die Zugabe von je 100 µl der verdünnten Peroxidase-konjugierten anti-human IgG- bzw. IgM-Antikörper pro Kavität. Die Platte wurde mit Abdeckfolie abgeklebt und für 30 min bei 37°C erneut inkubiert.

Nach erneutem viermaligen Waschen mit je 300 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer per Kavität wurde zum Einleiten der Farbreaktion 100 µl verdünnte Konjugatlösung zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratreaktion wurde mit 100 µl H₃PO₄ gestoppt und im Anschluss ihre Extinktion bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Der Nullabgleich erfolgte gegen Luft.

A 6.1.2 Western Blot

Dieser Test wurde bei Raumtemperatur mit Reagenzien, die vorher auf Raumtemperatur erwärmt wurden, durchgeführt. Es wurden immer parallel zwei mit B19V-Antigenen beladene Teststreifen mit der verdünnten Serumprobe für eine Stunde in je einer Inkubationsschale inkubiert.

Dazu wurden für jeden Testansatz 2 ml des gebrauchsfertigen Waschpuffers A in die jeweilige Schale pipettiert und der Teststreifen mit der Streifennummerierung nach oben vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette hineingelegt. Es wurde darauf geachtet, dass der Streifen vollkommen benetzt und von Flüssigkeit bedeckt war. In die Inkubationsschalen wurden je Inkubationsansatz 20 µl einer unverdünnten Probe (Humanserum) pipettiert (Verdünnung 1:101), abgedeckt und unter leichtem Schütteln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser ersten Inkubation binden die Antikörper in der Probe an ihre auf dem Teststreifen gebundenen spezifischen Antigene.

Nach der Inkubation wurde die Reaktionslösung vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt und 2 ml Waschpuffer A zugegeben und unter leichtem Schütteln für fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Nach der Inkubation wurde der Waschpuffer A abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Dem einen Ansatz wurde Wasch- und Verdünnungspuffer und dem zweiten Ansatz wurden 2 ml der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung zugegeben und für exakt drei Minuten inkubiert. Bei diesem Schritt diffundieren die niedrig aviden Antikörper ab, während hoch avide Antikörper an ihre spezifischen Antigene gebunden bleiben. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Streifen dreimal hintereinander mit je 2 ml Waschpuffer und nach einer Inkubation von fünf Minuten unter leichtem Schütteln gewaschen.

Nach dem Waschen der Streifen wurden in jede Inkubationsschale 2 ml der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösungen (Peroxidase konjugierte anti-human Antikörper (IgG- bzw. IgM- spezifisch) gegeben und 45 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Absaugen der Lösungen wurden die Streifen erneut dreimal mit je 2 ml Waschpuffer für je fünf Minuten unter leichtem Schütteln gewaschen. Als nächster Schritt wurde in jede Vertiefung je 1,5 ml Substratlösung gegeben, welche die Antigen-Antikörper-Komplexe durch das Auftreten von Banden auf den Teststreifen sichtbar machte und für 5–15 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Absaugen des Substrats wurden die Streifen dreimal mit deionisiertem Wasser abgespült, anschließend mit einer Pinzette aus dem Wasserbad entnommen und zum Trocknen zwei Stunden auf saugfähiges Papier gelegt.

Die relative Position der gefärbten Banden weist auf die Spezifität der reagierenden Antikörper hin. Durch den Vergleich der beiden entsprechenden Teststreifen lässt sich eine Aussage über die Avidität bzw. Spezifität der Antikörper machen, die wiederum eine Zuordnung des Infektionsstadiums ermöglicht.

Verwendete rekombinante Antigene waren VP-2p (Hauptkapsidantigen und Konformationsepitope), VP-N (N-terminale Hälfte der Strukturproteine VP-1 und VP-2), VP-1S (VP-1 spezifisches Segment, ermöglicht die Unterscheidung zu VP-2), VP-2r (Hauptkapsidantigen und lineare Epitope), VP-C (C-terminale Hälfte der Strukturproteine VP-1 und VP-2) und NS-1 (Nicht-Strukturprotein NS-1).

A 6.2 DNA-Nachweis

Die DNA wurden aus je 200 µl EDTA-haltigen Serum- bzw. Knochenmarkproben mit Hilfe eines QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Jedes Isolat mit einem Endvolumen von 100 µl wurde entweder sofort prozessiert oder bei -20°C eingefroren. Die B19V-DNA wurde mit dem real-time PCR-Verfahren nachgewiesen, das zur die Amplifikation des B19V-Genoms (Genotypen 1-3) gemäß der Literatur (Liefeldt L, 2005) und der Herstelleranweisung, wie in der Folge beschrieben, verwendet wurde.

Je 200 µl frisch abgenommenes EDTA-haltiges Blut bzw. Knochenmark wurden zunächst zur Erythrozytolyse mit dem EL-Puffer 1:5 verdünnt und für 10-15 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Probe zweimal mit Hilfe eines Vortexers homogenisiert. Es erfolgte anschließend eine Zentrifugation für 10 min bei 400 x g und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem Leukozytenpellet wurden 400 µl vom EL-Puffer zugegeben und die Zellen durch Mischen auf dem Vortexer resuspendiert. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 400x g und 4°C. Der Überstand wurde wieder sorgfältig abgenommen und verworfen. Zur Freisetzung der Nukleinsäuren wurden 350 µl RLT Puffer zu den pelletierten Leukozyten pipettiert und dieses erneut kräftig resuspendiert. Das Lysat wurde dann direkt auf eine QIAshredder Spinsäule überführt und anschließend zur Homogenisation in einer Ultra-Zentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Danach wurde ein Volumen (350 µl) 70 %-iges Ethanol zum homogenisierten Lysat gegeben und sorgfältig durchmischt. Die QIAamp Spinsäule wurde dann auf ein neues 2-ml-Tube transferiert und vorsichtig 700 µl RW1-Puffer zugefügt. Der Waschschriff erfolgte durch Zentrifugation für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). Danach wurde die QIAamp Spinsäule erneut auf ein neues 2-ml-Collection-Tube überführt und vorsichtig 500 µl RPE-Puffer in die Spinsäule pipettiert und für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) zentrifugiert. Danach wurde nach vorsichtigem Öffnen erneut 500 µl RPE-Puffer in die QIAamp Spinsäule hineinpipettiert. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation für drei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit ($20.000 \times g$ bzw. 14.000 rpm). Die QIAamp Spinsäule wurde dann in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 30–50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die QIAamp Membran in der Spinsäule pipettiert. Die anschließende Zentrifugation zum Eluieren der DNA erfolgte für eine Minute bei $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm).

Primer PA-1	5'TCC CTG GAA TTA ATG CAG ATG C3'
Primer PA-2	5'CAC TGC TGC TGA TAC TGG TGT CT3'
Sonde PA-So1	5'ACC TCC AAA CCA CCC CAA TTG TCA CA3'
Sonde PA-So1	5'ACC TCC AAA CCG TCC CCA TTG TCG CA3'
Sonde PA-So1	5'ATC TCC AAA CCA CCC CCA TTG TCC CA3'

Tabelle 3: Für Taqman PCR verwendete Primer

A 7 Verwendete Reagenzien und Geräte

A 7.1 Reagenzien

1. Waschpuffer (Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,01 %) und Oxypyron (0,1 %))
2. Verdünnungspuffer (Protein, Detergenz und blauer Farbstoff, Konservierungsmittel: MIT (0,01 %) und Oxypyron (0,1 %))
3. Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)
4. Stopplösung (24,9 % Phosphorsäure (H₃PO₄))
5. 96-well Mikrotiterplatte beschichtet mit rekombinanten Parvovirus B19 Antigenen
6. Positiv Kontrolle (0,1 % MIT und Oxypyron 0,1 %)
7. Cutoff Kontrolle (0,1 % MIT und Oxypyron 0,1 %)
8. Negative Kontrolle (0,1 % MIT und Oxypyron 0,1 %)
9. Anti-human IgG bzw. IgM Konjugat enthält NaN₃ (<0,1 %), MIT(<0,01 %) und Chlorazetamid (<0,1 %)
10. Waschpuffer A (Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,1 %) und Oxypyron (0,2 %))
11. Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)
12. Magermilchpulver
13. Kaninchen anti-human IgG Konjugat (100-fach konzentriert), enthält NaN₃ (<0,1 %), MIT (<0,1 %) und Chlorazetamid (<0,1 %)
14. Aviditätsreagenz Art. 11010
15. Kaninchen Anti-human IgM Konjugat (100-fach konzentriert), enthält NaN₃ (<0,1 %) MIT (<0,1%) und Chlorazetamid (<0,1 %)
16. Deionisiertes Wasser

17. Das Qiagen DNA Blood Mini Kit umfasst:

- a. QIAamp Spinsäulen
- b. 2-ml-Collection-Tubes
- c. Buffer AL*
- d. Buffer AW1* (Konzentrat)
- e. Buffer AW2† (Konzentrat)
- f. Buffer AE
- g. QIAGEN Protease
- h. Protease Solvent

18. Ethanol (96–100 %)

19. 14,5 M β -Mercaptoethanol (β -ME)

20. PBS (Phosphate-buffered saline)

A 7.2 Herstellung der Reagenzien für ELISA

Waschpuffer: Für jeweils 8 Kavitäten: Waschpufferkonzentrat wurde 1:11 mit deionisiertem H₂O verdünnt.

Konjugatlösung: Für jeweils 8 Kavitäten wurden je 10 μ l anti-human IgG bzw. IgM Peroxidase-Konjugat mit 1 ml Verdünnungspuffer vermischt.

Herstellung der Proben und Kontrollen: In je 1 ml Verdünnungspuffer wurden jeweils 10 μ l Probe bzw. Kontrolle pipettiert und gut vermischt. Bei jedem Testansatz wurden eine Negativ-, eine Cut-off- und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt, die analog verdünnt wurden.

A 7.3 Herstellung der Reagenzien für Westernblot

Waschpuffer A: Pro Teststreifen wurde 0,1g Magermilchpulver in 2 ml Waschpuffer A-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung 1:9).

Konjugatlösungen: Pro Teststreifen wurden je 20 μ l des IgG-bzw. IgM-Konjugat-Konzentrates mit 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A verdünnt (1:101).

A 7.4 Herstellung der Reagenzien für PCR

Gebrauchsfertiger Puffer RPE: Zu dem im Kit gelieferten Buffer RPE-Konzentrat wird vor dem erstmaligen Gebrauch das 4fache Volumen an Ethanol (96–100 %) hinzugegeben.

Gebrauchsfertiger Puffer RLT: pro ml RLT Puffer wurden 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) vor Verwendung addiert.

A 7.5 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

1. 1,5 ml Tubes
2. Reaktionsgefäße für die Erythrozytolyse
3. Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen
4. Mikrozentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
5. Vortex
6. Wasserbad 56°C
7. Brutschrank Inkubator Heraeus Instruments Hanau Deutschland
8. Photometer SLT Spectra Tecan Crailsheim Deutschland
9. Pipetten Reference Eppendorf Hamburg Deutschland
10. Messzylinder mit Graduierung für 50 ml, Stoppuhr
11. Mikropipetten
12. Plastikpinzette
13. Laborwaage
14. Inkubationsschalen
15. Teströhrchen

A 8 Statistische Analysen

Unterschiede in Mittelwerten und Korrelationsanalysen wurden mit parametrischen (two tailed student bzw. paired t-test und Pearson's test) und nicht-parametrischen (Mann-Whitney U oder Wilcoxon und Spearman's r test) Tests berechnet. Alle Analysen wurden bei einem Signifikanzlevel von 5 % ($p < 0.05$, indiziert mit * in Diagrammen) mit Hilfe von Statistica Version 7.0 (Statsoft Inc., OK, USA) und SPSS Version 16.0 (SPSS Inc., IL, USA) durchgeführt.

B Ergebnisse

B 1 Patienten der Studie

Untersucht wurden Serum- und Knochenmarkproben von 110 Patienten im Kindes- und Jugendalter der Abteilung für Hämatonkologie der Kinderklinik St. Hedwig. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 93.6 (4-235) Monate. 65 Kinder (59 %) waren männlichen und 45 Kinder (41 %) weiblichen Geschlechts.

Bei 60/110 Patienten (54.5 %) konnten zusätzlich zur initialen Abnahme weitere Proben analysiert werden, die im Rahmen der Behandlung zu diagnostischen Zwecken gewonnen wurden. Die durchschnittliche Beobachtungszeit bei diesen Kindern betrug 12 (2-44) Monate. Von 25 Patienten standen Serum- und Knochenmarkproben aus dem Zeitraum von März bis April 2004 zur Verfügung, welche retrospektiv in die Studie einbezogen wurden.

Die Grunderkrankungen der Patienten umfassten ein weites Spektrum hämatologischer und onkologischer Krankheitsbilder (Tabelle 3). Die Kinder wurden entsprechend in drei Gruppen (A-C) unterteilt (Tabellen 4, 5). Patienten mit Folgeproben wurden mit arabischen Ziffern (1, 2, 3, etc.) nummeriert und Patienten mit nur einer Probe mit lateinischen Ziffern (I, II, etc.).

Die Gruppe A (27/110; 24.5 %) umfasste Kinder, die an autoimmunologischen (14/110; 12.7 %) und nicht-malignen, hämatologischen Erkrankungen (13/110; 11.8 %) litten. Der Gruppe B sind die 68 der 110 Patienten (61.8 %) mit malignen Erkrankungen zugeordnet. Die Gruppe B wurde ferner untergegliedert in Kinder mit Leukämien (31/110; 28 %), Lymphomen (12/110; 11 %) und soliden Tumoren (25/110; 22 %). Patienten, die weder der Gruppe A noch der Gruppe B zugeordnet werden konnten, sind als Gruppe C (15/110, 14 %) aufgeführt. Das waren Kinder, die auf Grund anderer Krankheiten oder unspezifischer Symptomaten zur Abklärung etwaiger maligner Erkrankungen stationär aufgenommen wurden (Tabelle 4). Die Geschlechterverteilung war abgesehen von Gruppe C mit 68 % männlicher Patienten nahezu ausgeglichen.

Patientengruppe/ Diagnose	Patients				IgG(%)				IgM(%)				Parvovirus B19 DNA (%)			
	Alter/Monate (Durchschnitt)	Total	Mit Folgeproben	VP1/VP2 part*	VP2 den*	NS1	VP1/VP2	Total Serum oder KM	Serum	Serum	KM	KM	Total Serum oder KM	Serum	Serum	KM und KM
Total	93.6	110	60	43.6	26.4	15.5	4.5	20.0	14.5	15.5	10.0					
Gruppe A (non-maligne Erkrankungen)	89	27	8	40.7	33.3	22.2	7.4	29.6	18.5	29.6	18.5					
<i>Autoimmunerkrankungen</i>																
Evan's Syndrom	94	14	3	42.9	35.7	28.6	7.1	28.6	14.3	28.6	14.3					
ITP	152	2	2	100.0	100.0	100.0	0	50.0	50.0	50.0	50.0					
Andere	79	9	0	33.3	33.3	22.2	11.1	22.2	11.1	22.2	11.1					
<i>Hämatologische Erkrankungen</i>																
Fanconi Anämie	131	3	1	33.3	0	0	0	33.3	0	33.3	0					
Anämie	77	13	5	38.5	30.8	15.4	7.2	30.8	23.1	30.8	23.1					
Thrombozytopenie	82	2	2	100.0	100.0	100	0	100.0	50.0	100	50.0					
Panzytopenie	63	3	1	33.3	33.3	0	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3					
Agranulozytose	69	4	0	50.0	25.0	0	0	25.0	25.0	25.0	25.0					
Thrombozytose	104	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
Gruppe B (maligne Erkrankungen)	16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0					
<i>Leukämie</i>																
ALL	145	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0					
AML	101	68	50	45.6	26.5	14.7	4.4	19.1	14.7	11.8	7.4					
CML	92	31	24	41.9	22.6	9.7	6.5	16.1	16.1	6.5	6.5					
MDS	93	24	19	41.6	16.7	4.2	4.2	16.7	16.7	4.2	4.2					
<i>Malignes Lymphom</i>																
Hodgkin	84	3	3	33.3	66.7	33.3	33.3	0	0	0	0					
Non-Hodgkin	120	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0					
<i>Solide Tumore</i>																
Neuroblastom	63	2	0	100.0	50.0	50.0	0	50.0	50.0	50.0	50.0					
Nephroblastom	119	12	8	41.7	33.3	16.7	0	16.7	0	16.7	0					
Rhabdomyosarkom	132	3	3	33.3	66.7	33.3	0	0	0	0	0					
Gelintumor	113	9	5	44.4	22.2	11.1	0	22.2	0	22.2	0					
Andere Tumoren	103	25	18	52.0	28.0	20.0	4.0	24.0	20.0	16.0	12.0					
Gruppe C (andere Erkrankungen)	62	6	5	50.0	16.7	0	0	16.7	0	16.7	0					
	50	2	1	50.0	50.0	50.0	0	50.0	50.0	0	0					
	131	3	2	100.0	33.3	33.3	33.3	66.7	66.7	66.7	66.7					
	154	7	6	71.4	57.1	42.9	0	28.6	28.6	14.3	14.3					
	91	7	4	14.3	0	0	0	0	0	0	0					
	70	15	2	40.0	13.3	6.7	0	6.7	6.7	6.7	6.7					

Tabelle 4: Gesamtübersicht der Studienteilnehmer in den Untergruppen A, B, C bei Erstabnahme

Bei Aufnahme wurden alle Patientensera auf B19V-spezifische IgG- und IgM-Antikörper untersucht. Bei 48/110 (43.6 %) der Patienten waren IgG-Antikörper gegen VP1- und partikuläre VP2-Proteine (VP1/2part) zu finden, welche auf eine abgelaufene B19-Infektion hinweisen (Tabelle 4). Diese Seroprävalenz lag in dem gemäß der Literatur für diesen Altersbereich zu erwartenden Bereich: die Seroprävalenz von IgG-Antikörpern steigt von 2–15 % in der Altersgruppe 1-5 Jahre, auf 15-60 % bei 6-19 Jährigen (Koch WC, 2000; Cohen BJ, 1988). VP1/2-spezifisches IgG war in allen Patientengruppen zu finden (Tabelle 4). Keine der Haupt- oder Untergruppen war mit einer erhöhten Seroprävalenz assoziiert ($p=0.795$) (Tabelle 5).

Bei 22 (20 %) der 110 untersuchten Kinder konnte bei initialer Aufnahme virale DNA in Serum und/oder Knochenmark nachgewiesen werden. Patienten der Gruppe A zeigten mit 72.7 % das höchste DNA-Vorkommen gefolgt von der Gruppe B mit 41.9 % (Tabelle 5). In fünf dieser Fälle war als Hinweis für eine akute B19V-Infektion spezifisches IgM nachweisbar. Die verschiedenen Gruppen zeigten einen signifikanten Unterschied in der Prävalenz von viraler DNA ($p=0.011$).

IgG, das gegen Epitope von denaturierten VP2-Proteinen gerichtet ist, kann vor allem in einem Zeitraum von 6 Monaten nach akuter Infektion nachgewiesen werden (Pfrepper KI, 2005, Söderlund M, 1995). Bei 29/110 Kindern (26 %) wurden diese serologischen Marker einer kürzlich stattgefunden Infektion festgestellt. NS1-spezifisches IgG war bei 17/110 Kinder (15 %) nachweisbar (Tabelle 4). Diese Antikörper wurden im Rahmen einer lang anhaltenden Virämie nach akuter Infektion oder bei Patienten mit persistierender B19V-Produktion beschrieben (von Poblitzki A, 1995; Kerr, JR 2000, Lehmann HW, 2003).

	B19 V Seroprävalenz <i>VP1/VP2part*-spezifisches IgG</i>		B19V-DNA Prävalenz <i>B19V-DNA in IgG-positiven Patienten</i>	
	Anzahl	%	Anzahl	%
Total	48/110	43.6	22/48	45.8
Gruppe A	11/27	40.7	8/11	72.7
Autoimmunerkrankungen	6/14	42.9	4/6	66.7
Hämatologische Erkrankungen	5/13	38.5	4/5	80.0
Gruppe B	31/68	45.6	13/31	41.9
Leukämie	13/31	41.9	5/13	38.5
Lymphoma	5/12	41.7	2/5	40.0
Solide Tumoren	13/25	52.0	6/13	46.2
Gruppe C	6/15	40.0	1/6	16.7

Tabelle 5: Prävalenz von Parvovirus B19-IgG bzw. Parvovirus B19-DNA bei IgG-positiven Patienten

B 1.1 Gruppe A

Die Patienten mit nicht-malignen, hämatologischen Erkrankungen (Gruppe A) zeigten eine B19V-Seroprävalenz von 40.7 % (11/27 Patienten) (Tabelle 4). Bei 9/11 seropositiven Kindern (81.8 %) wurde IgG mit Spezifität gegen Epitope von denaturiertem, linearem VP2 gefunden. Fünf der Patienten litten an autoimmunologischen und vier an hämatologischen Erkrankungen. NS1-spezifisches IgG war in 6/11 Patienten (54.4 %) nachweisbar.

Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme war bei 8/11 seropositiven Kindern B19V-DNA in Serum und/oder Knochenmark (72.2 %; Patienten AI–AIV, A1–A4) (Tabelle 6, Tabelle 7) nachweisbar. Die DNA-Menge betrug zwischen 10^2 – 10^3 geq/ml bis hin zu 7.6×10^6 geq/ml in einer Serumprobe des Patienten A4 mit einer aplastischen Anämie (Tabelle 7).

Patient	Erkrankung	IgG VP1/VP2 part den		NS1	IgM VP1/VP2	Serum	KM	Parvovirus B19 - Status
AI	ITP	+	+	+	-	-	10^2 - 10^3	kürzlich stattgefunden
AII	ITP	+	+	+	+	1.4×10^3	4.1×10^4	akut/kürzlich stattgefunden
AIII	Kawasaki- Krankheit	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.6×10^3	kürzlich stattgefunden
AIV	Thrombozyto- penie	+	+	-	-	1.9×10^3	3.4×10^3	akut/kürzlich stattgefunden.
BI	ALL	+	+	-	-	10^2 - 10^3	-	kürzlich stattgefunden
BII	MDS	+	+	+	-	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	akut/kürzlich stattgefunden.
BIII	NHL	+	+	-	-	-	1.8×10^3	kürzlich stattgefunden
BIV	NHL	+	+	-	-	-	10^2 - 10^3	kürzlich stattgefunden
BV	Neuroblastom	-	-	-	-	n.a.	10^2 - 10^3	unklar
BVI	Nephroblastom	+	+	+	-	2.1×10^3	n.a.	kürzlich stattgef./persist.
BVII	Rhabdomyo- sarkom	+	+	+	-	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	kürzlich stattgef./persist.
BVIII	Gehirntumor	+	+	-	-	-	10^2 - 10^3	kürzlich stattgefunden
CI	Fieber	-	-	-	-	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	unklar

Tabelle 6: Serologische und klinische Parameter der B19V-DNA-positiven Patienten ohne Folgeproben

Von acht Patienten konnten im Verlauf weitere Proben gesammelt und getestet werden. Bei drei der Patienten (A2-A4) wurden Virusgenome nachgewiesen.

Während der Beobachtungsdauer von durchschnittlich 21 Monaten zeigte keines der zu Beginn Antikörper- und DNA-negativen Kinder (16/27; 59.3 %) Marker einer akuten Infektion bzw. eine Serokonversion.

B 1.1.1 Patienten mit Autoimmunerkrankungen

VP1/VP2-spezifische IgG wurde bei 42.9 % (6/14 Patienten) festgestellt (Tabelle 5). Bei Aufnahme zeigten alle seropositiven Patienten zusätzliche Marker für eine akute und/oder kürzlich abgelaufene B19V-Infektion: bei dem Patienten A1 mit einem Evans-Syndrom (Tabelle 7), sowie bei den zwei ITP-Patienten (Patienten AI, AII) und Patient AIV (Thrombozytopenie) ließen sich sowohl VP2-spezifisches IgG gegen denaturierte, lineare Epitope als auch virale DNA detektieren (Tabelle 6). Bei ITP-Patient AII konnte

VP1/VP2-spezifisches IgM und zudem virale DNA in Serum und Knochenmark nachgewiesen werden (Tabelle 6).

B 1.1.2 Patienten mit nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen

Bei 5/13 (38.5 %) Patienten wurde VP1/VP2-spezifisches IgG nachgewiesen (Tabelle 4). Vier (80 %) der fünf Patienten hatten eine akute Infektion (Tabelle 4).

Der Patient A4 war initial IgM positiv und wies eine hohe Viruslast in Serum (1.2×10^5 geq/ml) und Knochenmark (7.6×10^6 geq/ml) auf. In dem Beobachtungszeitraum von sechs Monaten sank die Viruslast auf 10^2 - 10^3 geq/ml Blut ab. Ein solcher Abfall deutet normalerweise auf die einsetzende Kontrolle durch das Immunsystem hin. Ein anhaltender Nachweis viraler DNA bei einigen Patienten zeigte jedoch, dass dies trotz der hohen spezifischen Antikörper-Titer nicht immer gelang. Das ist zum Beispiel bei den Infektionsverläufen der Patienten A2 und A3 (Fanconi-Anämie) (Tabelle 7) zu beobachten. Über einen Zeitraum von elf bis 14 Monaten wurden die Folgeproben gesammelt. Bei diesen beiden Patienten war auch NS1-spezifisches IgG, als weiterer Surrogatmarker für eine verlangsamte Viruselimination und damit persistierenden B19V-Infektion, nachweisbar. In Serum und Knochenmark des Patienten AIV (Thrombozytopenie) zeigte sich eine aktive B19V-Infektion. Verlaufspuren waren nicht vorhanden (Tabelle 6).

Der Nachweis von B19V-DNA (in Serum oder Knochenmark) und B19V-spezifischen Antikörpern (VP1, VP2 und IgM) ist nicht signifikant mit einer Untergruppe assoziiert.

Patient	Erkrankung	Datum (M/J)	IgG VP1/VP2 part den		NS1	IgM VP1/ VP2	virale DNA (geq/ml) Serum KM		Infektionsstadium
A1/1	Evans Syndrom	04/05	+	+	+	-	10 ² -10 ³	5.4 x 10 ³	akut/kürzlich stattgefunden
A1/2		02/06	+	-	-	-	-	n.a.	
A2/1	Fanconi Anämie	04/05	+	+	+	-	-	10 ² -10 ³	kürzlich stattgefunden/ persistierend
A2/2		03/06	+	+	+	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	
A3/1	Fanconi Anämie	11/04	+	+	+	-	10 ² -10 ³	2.6x10 ⁴	akut/verzögerte B19V Elimination
A3/2		05/05	+	+	-	-	-	2.3x10 ⁴	
A3/3		03/06	+	+	-	-	-	-	
A4/1	Aplastische Anämie	08/05	-	+	-	+	1.2x10 ⁵	7.6x10 ⁶	akut/verzögerte B19V Elimination
A4/2		09/06	+	+	+	-	10 ² -10 ³	n.a.	
B1/1	ALL	08/06	+	-	-	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	kürzlich stattgefunden
B1/2		09/06	+	+	-	-	-	10 ² -10 ³	
B1/3		06/07	+	+	-	-	n.a.	n.a.	
B2/1	ALL	10/05	+	-	-	-	-	-	persistierend
B2/2		10/05	+	+	+	-	10 ² -10 ³	1.5 x 10 ³	
B2/3		11/05	+	+	+	+	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	
B2/4		12/05	+	-	+	-	-	-	
B2/5		01/06	+	+	+	-	-	10 ² -10 ³	
B2/6		02/06	+	+	+	-	10 ² -10 ³	-	
B3/1	ALL	01/05	+	-	-	-	10 ² -10 ³	-	abgelaufen/ unklar
B3/2		03/06	+	-	-	-	-	-	
B4/1	ALL	02/05	+	-	-	-	-	-	abgelaufen/ unklar
B4/2		07/05	+	-	-	-	-	10 ² -10 ³	
B4/3		12/05	+	-	-	-	-	-	
B4/4		01/06	+		-	-	-	-	
B5/1	ALL	04/04	+	-	-	-	-	-	abgelaufen/ unklar
B5/2		09/05	+	-	-	-	-	-	
B5/3		10/05	+	+	+	+	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	
B5/4		12/05	+	-	-	-	-	-	
B5/5		03/06	+	-	-	-	-	-	
B6/1	ALL	12/05	-	-	-	+	6.9 ₀ x	n.a.	akut/verzögerte B19V Elimination
B6/2		03/06	+	+	-	+	10 ² -10 ³	n.a.	
B6/3		06/06	+	+	+	-	1.2 ₄ x	n.a.	
B7/1	AML	06/06	-	+	-	+	-	-	unklar
B7/2		07/06	+	+	-	+	-	10 ² -10 ³	
B8/1	Gehirn- tumor	05/07	+	+	+	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	unklar/kürzlich abgelaufen?
B8/2		06/07	+	+	+	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	
B9/1	Rhabdo- myosarkom	05/05	+	+	+	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	akut/verzögerte B19V Elimination
B9/2		03/06	+	+	+	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	

Tabelle 7: Serologische Parameter von B19V-DNA-positiven Kindern mit Folgeproben (M/J = Monat/Jahr, part = partikulär; den=denaturiert; KM = Knochenmark)

B 1.2 Gruppe B

Bei Patienten mit malignen Erkrankungen verschiedener Entitäten zeigte sich eine B19V-Gesamtseroprävalenz von 45.6 % (31/68 Patienten) (Tabelle 4).

Bei 18/68 (26.5 %) dieser Patienten war IgG gegen denaturierte, lineare VP2-Proteine und bei 10/68 (14.7 %) spezifisches IgG gegen NS1-Proteine nachweisbar.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war bei 13 Kindern virale DNA (13/68; 19.1 %) in Serum und/oder Knochenmark feststellbar (Tabelle 4). Fünf dieser Patienten litten an einer Leukämie (5/31; 16.1 %), zwei an Lymphomen (2/12; 16.6 %) und sechs an soliden Tumoren (6/25; 24 %). Anti-NS1-IgG wurde bei vier der DNA-positiven-Kinder positiv (30.7 %) getestet: bei einem Kind mit MDS und drei Kindern mit soliden Tumoren (Rhabdomyosarkom, Nephroblastom und Gehirntumor).

Bei 50 Patienten (73.5 %) der Gruppe B war es möglich Verlaufspuben zu evaluieren. Während des durchschnittlichen Beobachtungszeitraums von zehn Monaten wurde bei vier ausschließlich an Leukämie erkrankten Patienten (B2, B4, B5, B7) (Tabelle 7), die initial negativ für B19V-DNA waren, eine Serokonversion mit Nachweis von viralen Genomen in Serum und/oder Knochenmark festgestellt.

Der Nachweis von B19V-DNA in Serum und/oder Knochenmark war nicht signifikant mit einer Subform der malignen Entitäten assoziiert ($p=0.262$) bzw. ($p=0.46$). Weiterhin bestand auch kein signifikanter Unterschied für VP1/VP2-spezifisches IgG und IgM.

B 1.2.1 Patienten mit Leukämie

Zum Zeitpunkt der Aufnahme wiesen 13/31 (41.9 %) der Patienten die für eine abgelaufene Infektion typischen VP1/VP2-spezifischen IgG auf. In Serumproben von sieben (22.6 %) der Patienten war IgG gegen denaturierte, lineare VP2 und bei drei (9.7 %) Patienten gegen NS1-Proteine zu detektieren (Tabelle 4). Eine Virämie war bei einem Patienten mit MDS (Patient BII, Tabelle 6), einem prä-leukämischen Krankheitsbild, zusammen mit spezifischem IgG für lineares VP2-Protein nachweisbar. Diese Konstellation weist auf eine kürzlich abgelaufene Infektion hin. Folgeproben waren nicht vorhanden. Vier der ALL-Patienten (4/24, 16.6 %; Patient BI, B1, B3, B6 (Tabelle 6, Tabelle 7) waren virämisch im Serum. Bei Patient B1 wurde auch die Knochenmarkprobe positiv für virale DNA getestet (Tabelle 7).

Zusätzlich zur Virämie als Hauptindikator einer aktiven Virusreplikation und damit Erkrankung wurde bei dem Patienten B6 B19V-spezifisches IgM in Kombination mit spezifischem IgG gegen denaturiertes, lineares VP2 nachgewiesen. Insgesamt konnte bei 3/24 Patienten (BI, B1 und B6; 12.5 %) IgG gegen lineares VP2, das ein Indiz einer akuten oder kürzlich abgelaufenen Infektion ist, detektiert werden (Tabelle 6, Tabelle 7). Auch in den Verlaufskontrollen dieser Patienten konnten über Monate hinweg geringe Mengen viraler DNA in Serum- und Knochenmarkproben nachgewiesen werden. In Zusammenschau dieser Befunde kann man davon ausgehen, dass zum Zeitpunkt der Studienaufnahme zeitgleich mit der Erstdiagnose einer ALL eine kurz zuvor stattgefundene B19V-Infektion vorgelegen hatte. Die Patienten B1 und B6, für welche weitere Verlaufspuren vorlagen, konnten die Infektion in den darauffolgenden Monaten unter Chemotherapie nicht vollständig kontrollieren.

Abgesehen von den Patienten BI, B1, B3 und B6 konnte B19V-DNA auch in den Verlaufspuren von drei weiteren ALL-Patienten (B2, B4, B5; Tabelle 7) nachgewiesen werden. Diese drei Patienten wiesen initial eine für abgelaufene Infektionen typische IgG-Konstellation auf. Bei der Diagnosestellung waren sie sowohl im Knochenmark als auch im Serum negativ für virale DNA und wurden erst im Verlauf virämisch. Der Patient B2 zeigte eine langanhaltende, persistierende Infektion (Tabelle 7). Eine ähnliche Entwicklung wie bei dem ALL-Patienten B2 konnte bei einem der drei AML-Patienten beobachtet werden. Bei Patient B7 konnte erstmals 32 Tage nach der Erstdiagnose virale DNA im Knochenmark nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Von 22/27 (81.5 %) der eingeschlossenen ALL- und AML-Patienten waren Serum- und Knochenmarkfolgeproben verfügbar. Bei 7/22 (32 %) Kindern wurde bei Studienaufnahme eine persistierende Infektion festgestellt. Weitere 8/22 Patienten (36.4 %) (BI, B1-B7 (Tabelle 6, Tabelle 7) zeigten die charakteristischen Konstellation einer aktiven Infektion. Bei vier von diesen Patienten (B2, B4, B5, B7; 4/22, 22.2 %) wurde zum Zeitpunkt der Aufnahme ausschließlich B19V spezifisches IgG festgestellt. Eine Virämie trat erst in der Beobachtungszeit auf. Bei BI, B1, und B3 korrelierte die Diagnose einer aktiven B19V-Infektion mit der Erstmanifestation der akuten Leukämie.

B 1.2.2 Patienten mit Lymphomen

Bei Aufnahme lagen bei 5/12 Lymphompatienten (41.6 %) serologische Marker einer bereits abgelaufenen Infektion vor (Tabelle 4). In Serumproben von vier (80 %) dieser

Patienten war IgG gegen denaturiertes VP2 und bei zwei weiteren Patienten (40 %) anti-NS1-IgG nachzuweisen (Tabelle 4).

Bei den Patienten BIII und BIV (2/12; 16.6 %), die beide an einem Non-Hodgkin Lymphom erkrankt waren, fand sich bei Studienaufnahme virale DNA im Knochenmark. Von diesen Patienten waren keine weiteren Proben verfügbar (Tabelle 6).

Während der klinischen Beobachtungszeit von durchschnittlich acht Monaten wurden von 8/12 (67 %) der Lymphompatienten weitere Serum- und auch Knochenmarkproben entnommen. Es gab keine Hinweise auf eine aktive Infektion bzw. eine Serokonversion.

B 1.2.3 Patienten mit soliden Tumoren

13/25 (52 %) Patienten zeigten bei Aufnahme serologische Marker einer abgelaufenen B19V-Infektion. In den Serumproben von sieben (28 %) bzw. fünf (20 %) dieser Patienten waren IgG gegen denaturierte VP2- bzw. NS1-Proteine (Tabelle 6) nachzuweisen. Bei 6/25 (24 %) Patienten (BV-BVIII, B8, B9) gelang der positive virale DNA-Nachweis in Serum- und Knochenmarkproben (Tabelle 6, Tabelle 7).

Von 20/25 Patienten (80 %) waren Folgeproben erhältlich. Im Verlauf zeigte keiner der zu Beginn seronegativen Patienten eine Serokonversion oder Zeichen einer aktiven Virusreplikation. Der Nachweis viraler DNA änderte sich in einem Beobachtungszeitraum von bis zu acht Monaten bei keinem der Patienten (Tabelle 7).

B 1.3 Gruppe C

Die Patienten der Gruppe C, bei welchen weder eine maligne noch hämatologische Erkrankung diagnostiziert wurde, zeigten zum Zeitpunkt der Aufnahme eine B19V-Gesamtseroprävalenz von 40.0 % (6/15 Patienten) (Tabelle 4, Tabelle 6). Bei zwei Patienten waren Antikörper gegen denaturierte VP2-Proteine (2/15; 13.3 %) vorhanden. Diese beiden Kinder litten an Arthritis bzw. einem hämolytischen urämisches Syndrom (HUS). Das Kind mit HUS war zudem positiv für Antikörper gegen NS1-Protein. Virale DNA als Indiz einer akuten oder kürzlich stattgefundenen Infektion war in Serum und Knochenmark von Patient CI (1/15; 6.6 %; Tabelle 6) nachweisbar. Dieser Patient wurde zur Abklärung von unklarem Fieber aufgenommen. Verlaufskontrollen lagen nicht vor. Von zwei Patienten der Gruppe C konnten Folgeproben analysiert werden, ohne dass irgendein Hinweis auf eine akute Infektion oder einer Virämie vorgelegen hätte.

B 2 Verlaufskontrollen und Therapie der Grunderkrankung

Die Auswirkungen einer B19V-Infektion auf die Therapien der Patienten mit Leukämien wurden im Detail untersucht. Diese Gruppe von Patienten wurde auf Grund der höheren Fallzahl in der Studie ausgewählt.

Um mögliche Beeinträchtigungen während der Beobachtungszeit zu beurteilen, wurde der Bedarf an Antibiotika als Surrogat für die Infektanfälligkeit der Patienten, die Art und Menge der verabreichten Blutprodukte als Hämatopoeseindikator evaluiert. Der Bedarf an Antibiotika und Blutprodukten der Gruppe der Patienten mit aktiver Infektion (B1-B9; 7/18; 39 %) wurde mit dem der Patienten ohne Nachweis viraler DNA (b1-b11; 11/18; 61 %) in Serum oder Knochenmark verglichen. Die Patienten, die negativ für virale DNA waren, wurden desweiteren ihrem IgG-Status entsprechend in zwei Untergruppen eingeteilt: A. Patienten, die negativ für B19V-spezifisches IgG (b1, b3, b5, b6; 4/18; 22 %) waren und B. Patienten, die positiv für B19V-spezifisches IgG getestet wurden (b2, b4, b7-b11; 7/18; 39 %).

B 2.1. Parvovirus B19-DNA-positive Patienten mit Leukämie (B1-B7)

Von sieben Kindern mit Leukämie wurden in einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 14.5 Monaten 46 Serum- und 22 Knochenmarkproben gesammelt. In 44/46 (95.7 %) der Serumproben waren B19V-spezifisches IgG und in 8/46 (17.4 %) spezifisches IgM nachzuweisen. Ein positiver DNA-Nachweis gelang in 10/28 (35.7 %) der Serum- und 9/22 (40.9 %) Knochenmarkproben.

Patient	Erkrankung	Monat / Jahr	IgG VP1/VP2 part*.den*		NS1	IgM VP1/ VP2	virale DNA (geq/ml) Serum KM		Infektionsstadium
B1/1	ALL	08/06	+	-	-	-	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	Kürzlich stattgefunden
B1/2		09/06	+	+	-	-	-	10 ² -10 ³	
B1/3		06/07	+	+	-	-	n.a.	n.a.	
B2/1	ALL	10/05	+	-	-	-	-	-	persistierend
B2/2		10/05	+	+	+	-	10 ² -10 ³	1.5 x 10 ³	
B2/3		11/05	+	+	+	+	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	
B2/4		12/05	+	-	+	-	-	-	
B2/5		01/06	+	+	+	-	-	10 ² -10 ³	
B2/6		02/06	+	+	+	-	10 ² -10 ³	-	
B3/1	ALL	01/05	+	-	-	-	10 ² -10 ³	-	abgelaufen / unklar
B3/2		03/06	+	-	-	-	-	-	
B4/1	ALL	02/05	+	-	-	-	-	-	abgelaufen / unklar
B4/2		07/05	+	-	-	-	-	10 ² -10 ³	
B4/3		12/05	+	-	-	-	-	-	
B4/4		01/06	+	-	-	-	-	-	
B 5/1	ALL	04/04	+	-	-	-	-	-	abgelaufen / unklar
B 5/2		09/05	+	-	-	-	-	-	
B 5/3		10/05	+	+	+	+	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	
B 5/4		12/05	+	-	-	-	-	-	
B 5/5		03/06	+	-	-	-	-	-	
B 6/1	ALL	12/05	-	-	-	+	6.9 x	n.a.	akut/persistierend
B 6/2		03/06	+	+	-	+	10 ² -10 ³	n.a.	
B 6/3		06/06	+	+	+	-	1.2 x	n.a.	
B 7/1	AML	06/06	-	+	-	+	-	-	Unklar
B 7/2		07/06	+	+	-	+	-	10 ² -10 ³	

Tabelle 8: Serologie und DNA-Nachweis der Leukämiekinder (B1 – B7) (part*=partikulär, den*=denaturiert, KM= Knochenmark)

B 2.2. Parvovirus B19-DNA-negative Patienten mit Leukämie (b1-b11)

Bei elf Kindern konnten in einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 15.3 Monaten in 57 Serum- sowie 18 Knochenmarkproben keine viralen Genome und auch kein B19V-spezifisches IgM nachgewiesen werden. 18/57 (31.6 %) Serumproben waren positiv für B19V-spezifisches IgG. Vier der elf Patienten (b1, b3, b5 und b6) wiesen in einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 21 Monaten zu keinem Zeitpunkt serologische Marker für eine akute, abgelaufene oder reaktivierte B19V-Infektion auf.

Patient	Erkrankung	Beobachtungszeitraum	Infektionsstadium
b1	ALL	11/04-01/07	negativ
b2	ALL	02/05-12/05	IgG positiv
b3	ALL	04/03-06/05	negativ
b4	ALL	10/05-11/06	IgG positiv
b5	ALL	12/04-09/06	negativ
b6	ALL	10/04-08/05	negativ
b7	ALL	12/05-04/06	IgG positiv
b8	ALL	06/05-05/06	IgG positiv
b9	ALL	12/04-10/06	IgG positiv
b10	ALL	06/06-06/07	IgG positiv
b11	ALL	02/06-09/06	IgG positiv

Tabelle 9: Leukämiekinder mit negativem Parvovirus B19-DNA-Nachweis

B 2.3 Bedarf an Blutprodukten

Während des Beobachtungszeitraumes benötigten 16 der 18 (88.9 %) Leukämiekinder mit Folgeproben eines oder mehrere Blutprodukte. Es ist anzumerken, dass pädiatrischen Patienten mit einem Bedarf von 15 ml pro Kilogramm Körpergewicht nur ein Teil des Gesamterthrozytenkonzentrates gegeben wird. Um die Anzahl der erhaltenen Blutprodukte in Anbetracht der variierenden Beobachtungsdauer zu standardisieren, wurde der durchschnittliche Verbrauch für je 100 Beobachtungstage berechnet.

Sechs von sieben Kindern mit einem positiven B19V-DNA-Nachweis (85.7 %; B1-B5, B7) erhielten in 100 Beobachtungstagen insgesamt 23.8 Erythrozytenkonzentrate (durchschnittlich vier Erythrozytenkonzentrate (range 0.46-6.7)). Fünf Kinder (71.7 %; B1, B2, B4, B5, B7) wurden mit 15.1 Thrombozytenkonzentraten (durchschnittlich 3.1 Thrombozytenkonzentrate (range 1.31-4.48)) in 100 Beobachtungstagen therapiert.

Im Vergleich dazu benötigten zehn (90.9 %) der elf Patienten ohne Nachweis viraler DNA (b1-b4; b6-b11) in 100 Tagen 19.34 Erythrozytenkonzentrate (im Durchschnitt 1.9 Erythrozytenkonzentrate (range 0.61-4.83). Bei zehn der elf Kinder war in 100 Tagen die Gabe von 0.78 Thrombozytenkonzentraten pro Kind (range 0.31-2.14) indiziert.

Von den vier Kindern, die weder IgG gegen B19V noch virale DNA aufzeigten (b1, b3, b5, b6) benötigten drei Kinder (b1, b3, b6) durchschnittlich 0.9 Erythrozytenkonzentrate (range 0.64-1.15). Bei ihnen war weiterhin die Gabe von 0.44 Thrombozytenkonzentraten (range 0.31-0.64) indiziert.

Die sieben Kinder, die IgG positiv aber frei von B19V-DNA waren (b2, b4, b7-b11), benötigten im Durchschnitt 2.4 Erythrozytenkonzentrate (range 0.47-4.83). Sie erhielten zudem in 100 Beobachtungstagen durchschnittlich 0.9 Thrombozytenkonzentrate (range 0.31-2.14). Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Untergruppen vor.

Der Unterschied bei dem Erythrozytenbedarf war nicht signifikant, zeigte jedoch eine starke Tendenz ($p=0.13$). Hingegen war der Bedarf an Thrombozytenkonzentraten bei Kindern mit einem positiven DNA-Nachweis signifikant erhöht ($p=0.026$). (Abbildung 4)

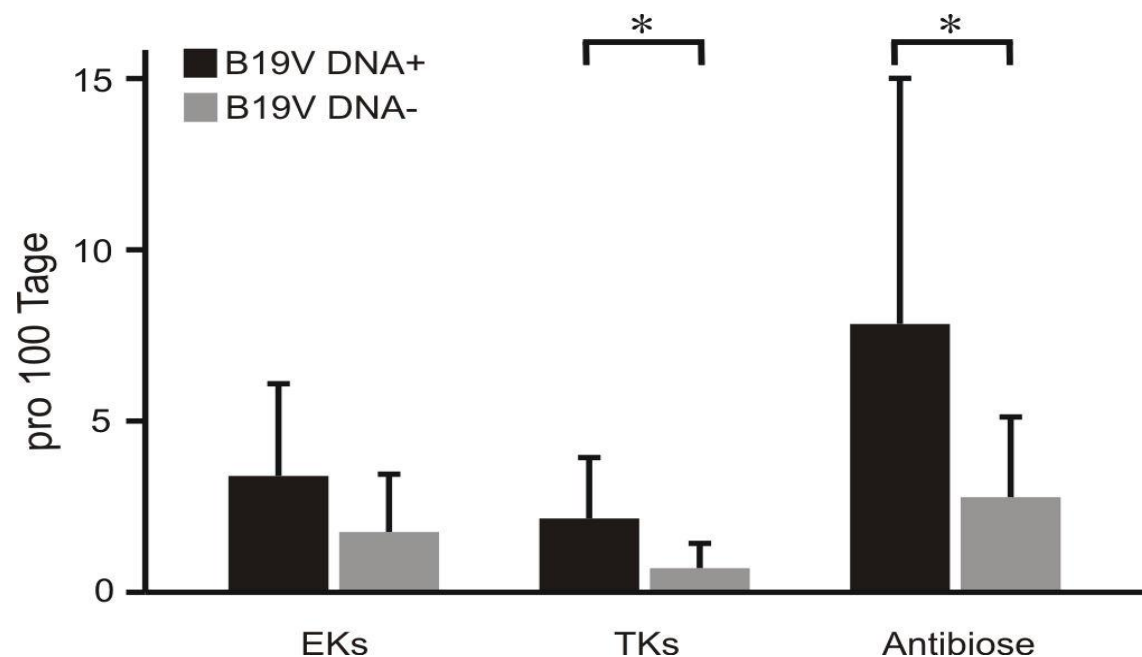


Abbildung 4: Unterschiede beim Erythrozyten- bzw. Thrombozytenbedarf sowie den verabreichten Antibiotikatherapien bei Patienten mit positivem bzw. negativem Nachweis für Parvovirus B19-DNA (EKs = Erythrozytenkonzentrate, TKs = Thrombozytenkonzentrate)

B 2.4 Antibiotikatherapie

Art und Dosierung der Medikamentengabe ergaben sich aus den Leitlinien und Empfehlungen des Herstellers. Sie waren abhängig von der jeweiligen Indikation und der subjektiven klinischen Beurteilung und unterlagen einer sehr starken Varianz. Daher wurden diese beiden Parameter nicht berücksichtigt. Von den sieben Kindern mit Leukämie, bei welchen im Beobachtungszeitraum virale DNA nachgewiesen wurde, erhielten sechs (85.7 %) während des Beobachtungszeitraumes Antibiotika. Auf einen Zeitraum von 100 Beobachtungstagen berechnet waren dies insgesamt 25.4 Antibiotika (im Durchschnitt 9.1 Antibiotika (range 0.14-20.5)).

Zehn (90.9 %) der elf Leukämiepatienten, die in der Beobachtungszeit frei von virale DNA waren, wurden in einem Zeitraum von 100 Beobachtungstagen mit 30.5 Antibiotika (Durchschnitt 3.05 (range 0.32-6.43)) therapiert.

Bei der Gruppe der B19V-DNA-positiven Kinder zeigte sich ein signifikant höherer Bedarf an Antibiotikatherapien ($p=0.043$)(Abbildung 4).

B 2.5 Krankheitsverlauf bei Patienten B2 und B5

B 2.5.1 Patient B2

Der vier Jahre alte Junge (Patient B2) wurde mit seit einer Woche bestehendem Fieber und zunehmender Schlappeheit bei hämorrhagischem Verlauf einer Varizellenerkrankung vom Hausarzt zur weiteren Abklärung an die Kinderonkologie der Kinderklinik St. Hedwig in Regensburg überwiesen. Bei der Aufnahme zeigten sich in den Laboruntersuchungen auffällige Werte für Hämoglobin (5.9 g/dl), Lactatdehydrogenase (500U/l), sowie eine Thrombozytopenie (50.000/ μ l) und Leukozytose (44.000/ μ l). Bei der körperlichen Untersuchung wurden eine zervikale und supraklavikuläre Lymphadenopathie, sowie eine Hepatosplenomegalie festgestellt. In der mikroskopischen Blutbilddifferenzierung wurden atypische Blasten, vereinbar mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL), nachgewiesen. Diese Diagnose konnte durch die durchflusszytometrische Untersuchung des peripheren Bluts untermauert und in Zusammenschau mit den Befunden aus der Knochenmarkuntersuchung als ALL der T-Zellreihe gestellt werden. Aufgrund des mit diesem ALL-Subtyp verbundenen erhöhten Rezidivrisikos wurde der Patient B2 dem Hochrisikoarm der COALL-Studie (HR Standard) zugeteilt und die Chemotherapie eingeleitet. Dem Patienten wurden wegen der bestehenden Anämie und Thrombozytopenie initial insgesamt zwei Thrombozyten- und ein Erythrozytenkonzentrat gegeben. Zu diesem Zeitpunkt war B19V-DNA weder in Serum noch Knochenmark nachzuweisen. Es konnten partikuläre B19V-spezifisches IgG Proteine bestimmt werden.

Der Patient B2 wurde hinsichtlich seiner Varizellenerkrankung virostatisch mit Aciclovir und bei vorbestehendem Fieber und pathologischem CRP-Wert zusätzlich antibiotisch mit Ceftazidim behandelt. Gemäß den Protokollrichtlinien der COALL-Studie wurde das Kind regelmäßig bestrahlt und erhielt wöchentlich Daunorubicin und Vincristin intravenös. Eine initial hohe Leukozytenzahl und die Befunde der Lumbalpunktion (2 Zellen/ μ l) bedeuteten ein relativ hohes Risiko für ein ZNS-Rezidiv. Nach Randomisierung mit 40 mg Daunorubicin pro qm Körperoberfläche wurde dementsprechend eine zusätzliche intrathekale Therapie mit Methotrexat 12 mg eingeleitet.

Am Tag 1 der Therapie zeigten sich 55% pathologische Blasten in der Peripherie.

Am Tag 5 kam es zu einer febrilen Episode mit mäßig erhöhten CRP-Werten und eine antibiotische Therapie mit Ceftazidim und Tobramycin wurde eingeleitet. Die an diesem Tag abgenommenen Serum und Knochenmarkproben waren erstmals positiv für B19V-DNA. Im Serum wurde eine Kopienzahl von 10^2 - 10^3 geq/ml nachgewiesen und im Knochenmark 1.5×10^3 geq/ml. Im Serum fand sich zudem spezifisches IgG gegen partikuläre und denaturierte VP2- sowie gegen NS1-Proteine. B19V-spezifische IgM waren nicht nachweisbar. Eine Anämie wurde festgestellt (6.9 g/dl). Der Patient erhielt am Tag 8 ein Erythrozytenkonzentrat.

In der Knochenmarkpunktion am Tag 15 waren mehr als 25% Blasten. Im Blut zeigten sich erniedrigte Werte für Hämoglobin (7.1 g/dl), sowie eine Thrombozytose 418.000/ μ l.

Am Tag 29 wurden bei unzureichendem Therapieansprechen in der Knochenmarkpunktion erneut mehr als 25% Blasten (M3-Mark) festgestellt. Die Serum und Knochenmarkproben waren weiterhin positiv für B19V-Genome (10^2 - 10^3 geq/ml). Es konnten IgG gegen partikuläre und denaturierte B19V-Proteine sowie gegen NS1-Proteine nachgewiesen werden. Bei der Blutabnahme wurden folgende Werte gemessen: Erythrozytenzahl 3.10×10^6 / μ l, Hämoglobin 9.0 g/dl, Thrombozytenzahl 484.000/ μ l.

Am Tag 31 erfolgte die stationäre Wiederaufnahme bei Fieber in der Leukopenie, und eine antibiotische Behandlung mit Ceftazidim und Gernebcin wurde eingeleitet. Der Patient erhielt ein Erythrozytenpräparat.

Dem Patient wurde am Tag 41 bei erneuter Anämie (Hämoglobinwert 7.5 g/dl) ein Erythrozytenkonzentrat transfundiert. In der Knochenmarkpunktion am Tag 43 zeigte sich ein M2 Mark (weniger als 25% Blasten) und somit ein erneut unzureichendes Ansprechen auf die Chemotherapie. Die an diesem Tag entnommenen Proben wiesen bei einem sonst zu Tag 29 identischen Befund auch einmalig B19V-spezifisches IgM auf. Der Hämoglobinwert lag bei 11.7 g/dl, Thrombozytenzahl war im Normbereich und die Erythrozytenzahl unauffällig.

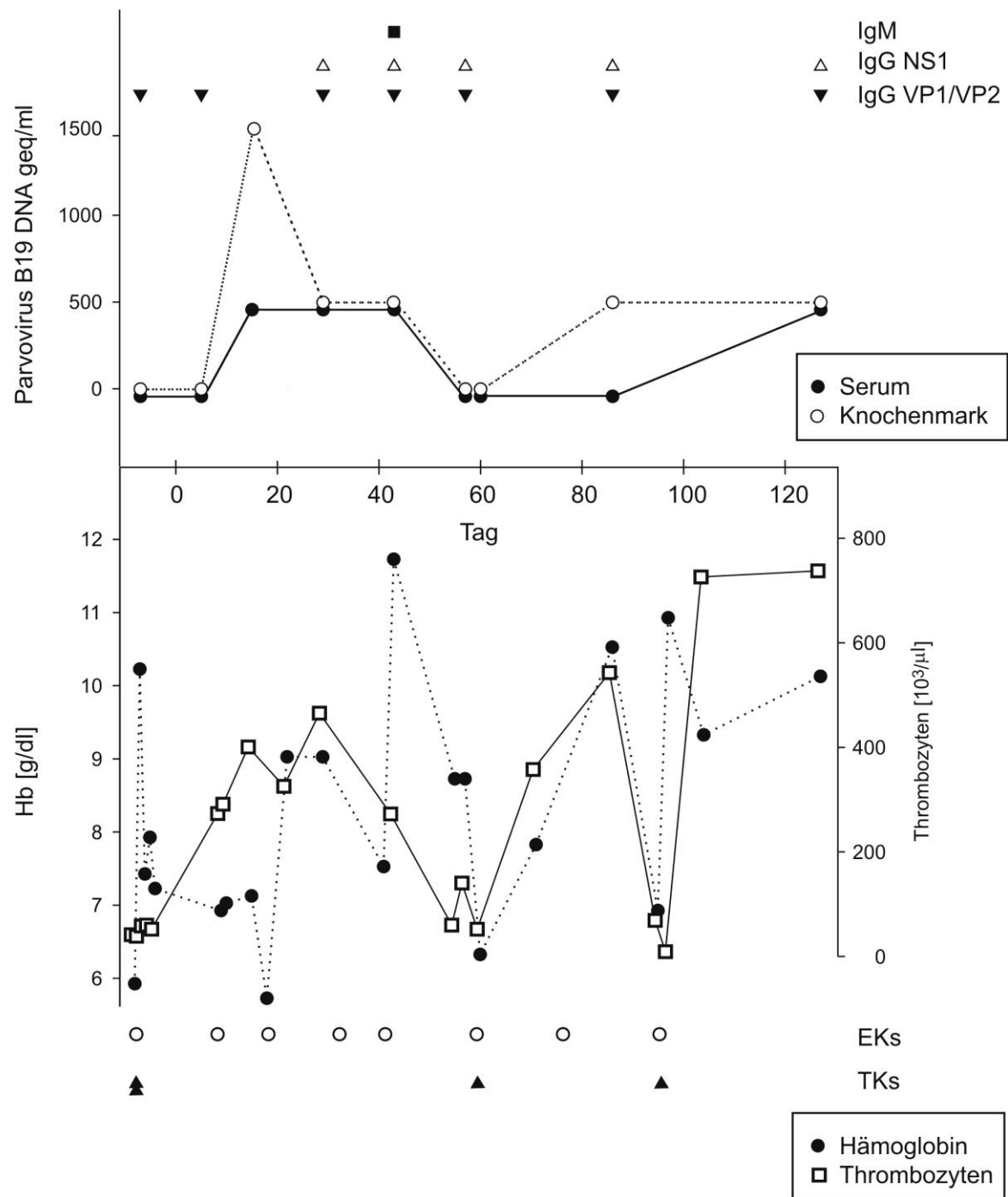


Abbildung 5: Verlauf der B19V-Infektion bei Patient B2. Oberer Teil: B19V-spezifische DNA in Serum und Knochenmark (Symbol ● für Genome copies/ ml Serum und Symbol ○ Genome copies/ ml Knochenmark). Positiver Nachweis von B19V-spezifischen Antikörper (IgM (Symbol ■), IgG (Symbol ▼) und NS1 (Symbol △)). Unterer Teil: Hämoglobinwerte (g/dl) (Symbol ●) und Thrombozytenwerte ($10^3/\mu\text{l}$) (Symbol □). Transfusionen von Erythrozytenkonzentrate (Symbol ○) und Thrombozytenkonzentrate (Symbol ▲)

Es konnte im Verlauf keine Remission der ALL erreicht werden. Erstmals am Tag 57 wurde ein Blastenanteil von unter 5 % im Knochenmark erreicht (M1 Mark). Hieraus (Untersuchungsergebnisse von Tag 29 und Tag 43) wurde die Indikation zur Knochenmarktransplantation gestellt, die nach stabiler Remission vorgesehen wurde.

Die B19V-Diagnostik von den am Tag 57 abgenommenen Knochenmark- und Serumproben wies virale Genome im Knochenmark nach. Es wurden VP1/VP2- und NS1-spezifische IgG festgestellt. Im peripheren Blut wurden folgende Werte gemessen: Hämoglobin (8.7 g/dl), Thrombozytenwerte und LDH normal. Die für den Therapietag 85 geplante Behandlung mit hochdosiertem Cytosinarabinosid wurde auf den Tag 57 vorgezogen. Der letzte Chemotherapieblock wurde am Tag 58 gestartet. Hier wurde auf Grund des mangelnden Therapieansprechens eine modifizierte Chemotherapie mit 2 Amsacrine/VP-16 Blöcken und einem modifizierten HR1-Block mit PEG-Asparaginase verabreicht. Der Patient erhielt am Tag 59 ein Erythrozytenkonzentrat bei einem Hämoglobinwert von 6.3 g/dl sowie am Tag 64 ein Thrombozytenkonzentrat (Thrombozytenzahl 8.000/ μ l).

Der erste Block Amsacrine/VP-16 erfolgte am Tag 72. An diesem Tag wurden VP1/VP2 und NS1-spezifische IgG im Serum nachgewiesen, sowie eine geringe Menge viraler DNA im Knochenmark. Am Tag 77 wurde dem Patient ein Erythrozytenkonzentrat gegeben. Am Tag 86 erfolgte der 2. Block mit Amsacrine/VP16. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich erneut spezifische IgG gegen partikuläre und denaturierte VP1/VP2- sowie gegen NS1-Proteine. Im Knochenmark konnte B19V-DNA nachgewiesen werden. (Hämoglobin 10.5 g/dl, Erythrozyten 3.84 Mill/ μ l, Thrombozytose 563.000/ μ l). Am Tag 95 erhielt der Patient ein Erythrozytenkonzentrat (Hämoglobinwert 6.9 g/dl) und am Tag 97 ein Thrombozytenkonzentrat (Thrombozyten 18.000/ μ l).

Am Tag 127 konnte erneut spezifische IgG gegen partikuläre als auch denaturierte VP1/VP2 sowie gegen NS1-Proteine detektiert werden. Im Serum war zudem B19V-DNA vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt wurden folgende Werte gemessen: Hämoglobin 10.1 g/dl, Erythrozyten 3.73 Mill/ μ l, Thrombozyten 762.000/ μ l.

Das Kind wurde an den Tagen 147 und 149 ganzkörperbestrahlt. Anschließend erfolgte die fremd-allogene Knochenmarktransplantation.

B 2.5.2 Patientin B5

Die siebenjährige Patientin B5 wurde aufgrund auffälliger Blutbefunde an die Kinderonkologie der Kinderklinik St. Hedwig mit dem Verdacht auf eine hämatologische Systemerkrankung überwiesen. In der daraufhin eingeleiteten Diagnostik wurde eine akute lymphoblastische Leukämie der B-Zell-Reihe (common-ALL) diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt fand sich im Serum B19V-spezifisches IgG gegen partikuläre Proteine. In Knochenmark und Serum waren keine B19V-Genome nachweisbar. Am Tag -6 der Therapie wurde der Patientin ein Erythrozytenkonzentrat verabreicht.

Es wurde eine Chemotherapie nach dem Therapieprotokoll COALL-07-03 eingeleitet. Hierbei wurde die Patientin nach Protokoll für den Therapiearm Adriamycin 30 mg/qm Körperoberfläche randomisiert und aufgrund der vorliegenden Befunde in die low-risk-Therapiegruppe eingeordnet. In der Lumbalpunktion zeigte sich kein Hinweis auf eine ZNS-Beteiligung. Es wurde am Tag 1 eine Chemotherapie mit Vincristin Bolus und Daunorubicin durchgeführt. Die Blutaussstriche am Tag 15 zeigten nur noch 1 % Blasten im peripheren Blut. Im Zeitraum von Therapiebeginn bis Ende der Re-Induktionstherapie erhielt die Patientin insgesamt sieben Erythrozyten- und drei Thrombozytenkonzentrate.

Ab dem Tag 182 der Therapie wurde die Erhaltungstherapie mit Methotrexat und Purinethol durchgeführt. Für diesen Zeitraum standen keine weiteren Serum- oder Knochenmarkproben zur Verfügung. In der Nachkontrolle waren stetig abfallende Thrombozytenzahlen zu beobachten.

Siebzehn Monate nach Erstdiagnose (Tag 515) wurde die Patientin mit multiplen, seit einigen Tagen progredienten Hämatomen mit Verdacht auf ein Rezidiv stationär aufgenommen. Im peripheren Blutaussstrich fanden sich bis zu 30 % Blasten. Eine ZNS-Beteiligung konnte ausgeschlossen werden. Durchflusszytometrisch ergab sich die gleiche Morphologie wie bei der Erstdiagnose. Die abgenommenen Serum- und Knochenmarkproben waren B19V-DNA negativ. Im Serum ließen sich spezifische IgG gegen partikuläre VP1/VP2 Proteine nachweisen.

Die Rezidivdiagnose wurde am Tag 516 durch eine Knochenmarkpunktion bestätigt. Daraufhin wurde die Vorlaufphase nach Protokoll ALL-Rezidiv BFM 2002 und eine intrathekale Dreifach-Therapie (Methotrexat, Cytarabin und Prednison) durchgeführt. Wiederholt wurden in den Tagen der Vorlaufphase Thrombozytenkonzentrate bei neu

aufgetretenen Hämatomen und rezidivierenden Thrombozytopenien von bis zu 9000/ μ l verabreicht. Insgesamt wurden fünfmal Thrombozyten substituiert.

Am Tag 520 wurde mit dem ALL-Rezidiv BFM 2002-Protokoll mit dem Block F1 begonnen. In den folgenden Wochen litt die Patientin wiederholt an der Reaktivierung von Herpes simplex Viren sowie Mukositiden (Grad III-IV). Hinzu kam eine Sepsis bei Neutropenie mit einem DIC-Syndrom (Dissoziierte intravasale Koagulation). Die Patientin benötigte im Verlauf fünf weitere Thrombozyten- sowie vier Erythrozytenkonzentrate.

Am Tag 538 wurde ein Fieber unklarer Ursache diagnostiziert, welches am ehesten medikamentös induziert war. Am Tag 542 wurde mit dem Beginn von Block F2 der Chemotherapie begonnen. Sowohl in den Serum- als auch Knochenmarkproben waren zu diesem Zeitpunkt virale Genome (10^2 - 10^3 geq/ μ l) nachzuweisen. Im Serum ließen sich B19V-spezifisches und spezifisches IgG gegen partikuläre und denaturierte B19V-Proteine nachweisen. Auch das NS1-Protein war vorhanden.

In den folgenden zehn Tagen entwickelte die Patienten erneut Fieber in der Neutropenie, was im Verlauf auf eine Pneumokokken-Bakteriämie zurückgeführt werden konnte. Am Tag 520 sowie am Tag 525 wurde die Patientin erneut mit je einem Thrombozytenkonzentrat behandelt.

Am Tag 528 wurde mit dem Block-R2 begonnen. In den darauffolgenden Tagen entwickelte die Patientin erneut Fieber in der Neutropenie sowie eine Mukositis Grad III. Die Patientin benötigte am Tag 568 zwei Erythrozyten- und ein Thrombozytenkonzentrat.

Am Tag 578 wurde die Therapie mit dem Block-R1 fortgesetzt. Die zu diesem Zeitpunkt abgenommenen Serum- und Knochenmarkproben waren B19V-DNA-negativ. Im Serum ließen sich spezifische IgG gegen partikuläre B19V-Proteine nachweisen. In den darauffolgenden Wochen entwickelte der Patient B5 erneut Fieber in der Neutropenie, eine Mukositis Grad II und Herpes labialis (Tag 591). Einen Tag später wurde die Patientin mit einem Erythrozytenpräparat therapiert.

In der am Tag 603 entnommenen Knochenmarkprobe zeigte sich ein hypoplastisches Knochenmark mit 4 % pathologischen Blasten. B19V-DNA konnte weder in der Serum- noch in der Knochenmarkprobe nachgewiesen werden. Im Serum fanden sich spezifische IgG gegen partikuläre VP1/VP2.

Aufgrund der wiederholten Herpes-Reaktivierung wurde eine Aciclovir-Dauertherapie zur Prophylaxe in der Neutropenie eingeleitet.

Eine geplante Knochenmarkpunktion konnte bei Krankheitsprogression mit hypoplastischem Knochenmark und 15 % Blasten (M2 Mark) nicht durchgeführt werden.

Nach Rücksprache mit der Studienleitung für COALL 07/03 wurde eine individuelle Chemotherapie mit dem Protokoll AMSA/VP 16 begonnen. Im Verlauf entwickelte die Patientin erneut Fieber in der Neutropenie mit Temperaturen bis 39.6°C und Mukositis Grad III. Die prophylaktische antivirale Therapie wurde hinsichtlich der Gefahr einer Herpesreaktivierung auf Aciclovir intravenös umgestellt. Im Verlauf benötigte die Patientin sechs Erythro- und acht Thrombozytenkonzentrate.

Die letzten Serum- und Knochenmarkproben von dieser Patientin standen am Tag 710 zur Verfügung. Zu diesem Zeitpunkt war sie frei von B19V-DNA. Im Serum ließen sich spezifische IgG gegen partikuläre B19V-Proteine nachweisen.

C Diskussion

Für diese Studie wurden 291 Serum- und 112 Knochenmarkproben von 110 pädiatrischen Patienten auf das Vorhandensein von B19V-spezifischen Antikörpern und viraler DNA untersucht. Diese Kinder befanden sich in einem Beobachtungszeitraum von bis zu 44 Monaten wegen hämatologischer und/oder onkologischer Erkrankungen bzw. zu deren Ausschluss in stationärer Behandlung.

Zum Zeitpunkt ihrer Aufnahme waren 43.6 % der Patienten seropositiv. Die niedrigste Seroprävalenz mit 38.5 % wurde bei Kindern mit nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen und einem Durchschnittsalter von 76.8 Monaten beobachtet. Die höchste Seropositivität mit 52 % wurde bei Patienten mit malignen Lymphomen (Durchschnittsalter 119 Monate) festgestellt. Beide Werte entsprechen denjenigen gesunder Kinder gleichen Alters. So findet sich im Alter von drei bis sechs Jahren in Deutschland, wie auch in anderen europäischen Ländern, eine Seroprävalenz von 35.0 %. Diese steigt mit zunehmendem Lebensalter an und beträgt bei Kindern im Alter von sechs bis zehn Jahren bis 50 % und bis zu 60% bei den 15 - 18 Jährigen (Röhler C, 2008; Koch WC, 2000).

Auch die Prävalenz viraler DNA in der Gruppe C, welche Patienten umfasst, die weder an hämatologischen noch onkologischen Erkrankungen litten, stimmt mit den in früheren Studien erhobenen Werten überein. Bei 2.7 % Prozent von gesunden Kinder und 7.0 % von pädiatrischen Patienten mit nicht-infektiösen Erkrankungen (Lehmann HW, 2003; Lehmann HW, 2008) wurde B19V-DNA nachgewiesen. Bei einem einzigen Kind der Gruppe C war diese geringfügig in Serum und Knochenmark detektierbar (6.6 %). Dies spiegelt die Inzidenz von akuten B19V-Infektionen bei Kindern wider. Vergleicht man jedoch diese Ergebnisse mit der DNA-Prävalenz bei hämatologischen (Gruppe A (8/11; 72.2 %) und onkologischen Patienten (Gruppe B (17/31; 54.8 %) dieser Studie, weisen beide Gruppen signifikant höhere Werte für das Vorkommen von DNA auf ($p < 0.001$) (Tabelle 5). Am häufigsten wurde B19V-DNA bei Kindern nachgewiesen, die an nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen litten.

Personen mit einer hämatologischen Grunderkrankung sind durch B19V-Infektionen häufig besonders schwer betroffen. Bei diesen Patienten liegt oft eine verkürzte erythrozytäre Lebensdauer vor; da es während einer produktiven B19V-Infektion zur

Zerstörung erythroider Vorläuferzellen kommt, kann dies zur Exazerbation der Grunderkrankung führen. Es besteht ein hohes Risiko, schwere Anämien, Retikulozytopenien und transiente, aplastische Krisen zu entwickeln. Die viral bedingte gestörte Hämatopoese kann aber auch zur Erstmanifestation, zu einem erneuten Schub bzw. dem Wiederauftreten einer hämatologischen Erkrankung führen. Dies war bei den Patienten A2, A3 und A4 zu beobachten. Bei den Patienten A2 und A3 wurde eine Fanconi-Anämie im Rahmen der akuten B19V-Infektion offensichtlich. Der Patient A4 entwickelte in Folge einer B19V-Infektion eine klinisch manifeste aplastische Anämie, ohne dass eine weitere zu Grunde liegende Erkrankung bekannt gewesen wäre bzw. diagnostiziert wurde.

In mehreren Studien wurde bei Kindern ein kausaler Zusammenhang zwischen B19V-Infektionen und dem Auftreten von Thrombozytopenien und Autoimmunerkrankungen gezeigt (Lehmann HW, 2003; Oguz F; Heegaard ED, 1999; Hida M, 2000; Lehmann HW, 2008; Gonzalez B, 2007; Aktepe OC, 2004). In der vorliegenden Studie wurde bei fünf Patienten, die serologische Marker für eine akute oder kürzlich abgelaufene B19V-Infektion zeigten, die Manifestation einer Autoimmunerkrankung registriert: Bei den Patienten AI und AII wurde eine idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP) beobachtet, bei Patient AIII wurde das Kawasaki-Syndrom diagnostiziert, der Patient AIV entwickelte eine Thrombozytopenie und Patient A1 ein Evans-Syndrom. Auch das Kawasaki-Syndrom und das Evans-Syndrom wurden bereits mit einer B19V-Infektion in Verbindung gebracht. Diese Beobachtungen zeigen, welche Rolle, die B19V als potentieller Auslöser einer Autoimmunerkrankung spielt (Toyokawa Y, 2007; Uike N, 1993).

Abgesehen von den benignen hämatologischen und autoimmunologischen Erkrankungen wurde B19V-DNA bei 19.1 % der Patienten mit malignen Erkrankungen (Gruppe B) gefunden. Bei Kind B5, das zunächst erfolgreich therapiert worden war, trat eine akute B19V-Infektion zum Zeitpunkt des ALL-Rezidiv auf. Da es bekannt ist, dass es nach B19V-Infektionen zu ALL-Manifestation kommen kann, könnte man die Infektion als potentiellen Auslöser eines ALL-Rezidivs in Betracht ziehen. Bei der Replikation des B19V in erythroiden Vorläuferzellen wird eine massive Proliferation von Knochenmarkzellen induziert, die sich auf das Teilungsverhalten etwaiger residualer Tumorzellen auswirken könnte.

Bei den ALL-Patienten B1, B3 und BI wurde eine niedrige Virämie in Kombination mit serologischen Markern einer abgelaufenen B19V-Infektion festgestellt. Die Patienten B1 und B3 hatten einen Tag bzw. drei Monate vor der ALL-Erstdiagnose / der Serumprobenabnahme für die Studie Erythrozytenkonzentrate erhalten. Da Proben von Zeitpunkten vor den Transfusionen nicht erhältlich waren, ist unklar, ob die Infektion iatrogen mittels Erythrozytenkonzentrate oder über den ‚gewöhnlichen‘ Weg, über Aerosole, erfolgt ist. Auch eine kürzlich stattgefundene oder reaktivierte B19V-Infektion ist als Möglichkeit in Betracht zu ziehen.

Bei den Patienten B4, B5 (ALL) und B7 (AML) wurde B19V-DNA ausschließlich nach der Induktionschemotherapie nachgewiesen. Diese Patienten wurden mit Erythrozyten- und / oder Thrombozytenkonzentraten, aber auch mit anderen Blutprodukten wie Albumin und Immunglobulinen behandelt. Da bekannt ist, dass B19V häufig in Blut und Blutprodukten nachgewiesen wird, besteht der Verdacht, dass das Virus iatrogen übertragen wurde.

B19V-DNA konnte abgesehen von den oben genannten Leukämiepatienten bei Patienten mit soliden Tumoren nachgewiesen werden. Serologische Marker bei diesen Patienten weisen auf eine akute oder kürzlich stattgefundene Infektion zum Zeitpunkt der Tumordiagnose hin. Eine potentielle transiente Immunsuppression im Rahmen einer akuten B19V-Infektion und einer somit reduzierten Immunkontrolle könnte das Auftreten einer malignen Erkrankung begünstigen.

Bei den Leukämiepatienten mit einem positiven B19V-DNA Nachweis waren mehr Rezidive und ein schwerer Krankheitsverlauf zu beobachten als in der Gruppe ohne B19V-DNA (unter dem Vorbehalt der geringen Fallzahlen). So war die Zahl der im Rahmen der Supportivtherapie benötigten Erythrozyten- und Thrombozytentransfusionen bei den B19V-DNA positiv getesteten Kindern im Vergleich zu den B19V-DNA-negativen Kindern erhöht, im Falle der Thrombozytenkonzentrate sogar signifikant. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten von Zaki und Mitarbeitern überein, die Neutropenien und Lymphozytosen in Zusammenhang mit reduzierten Hämoglobin- und Erythrozytenwerten bei B19V-positiven pädiatrischen Leukämiepatienten feststellten (Zaki Mel S, 2006). Neuere Studien zeigen, dass B19V-DNA-positive ALL-Patienten mehr Bluttransfusionen als B19V-DNA-negative ALL-Patienten benötigen (Lindblom A, 2008; Soliman Oel-S, 2009).

Dies könnte auf eine persistierende Produktion von B19V bei den häufig immunsupprimierten Tumorpatienten zurückzuführen sein. Sie ist mit einer vermehrten Zerstörung von erythroiden Vorläufer- und Knochenmarkzellen assoziiert und kann sowohl Anämien als auch Zytopenien verursachen.

Die in dieser Studie erhobenen Daten indizieren, dass B19V ein wichtiger Verursacher für Anämien und Zytopenien bei Kindern mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen ist. Bei Kindern, die an Leukämie und an soliden Tumoren erkrankt waren, war eine B19V-Infektion vermehrt mit Komplikationen assoziiert, was sich in einem deutlich erhöhten Bedarf an Blutprodukten und Antibiotika widerspiegelt.

Hinsichtlich dieser offensichtlich assoziierten Komplikationen muss versucht werden, einerseits sowohl die iatrogene als auch die nosokomiale Transmission des Virus zu limitieren, vor allem aber auch die Infektion frühzeitig zu diagnostizieren. Bei Patienten mit einer ungeklärten Zytopenie sollte immer an eine B19V-Infektion gedacht werden und diese sollte durch serologische Untersuchungen und PCR ausgeschlossen bzw. diagnostiziert werden.

D Zusammenfassung

Parvovirus B19 (B19V)-Infektionen verlaufen bei Personen mit hämatologischen oder onkologischen Grunderkrankungen wesentlich schwerer als bei gesunden. Um die Häufigkeit und die Auswirkungen einer B19V-Infektion bei pädiatrischen Patienten auf den Verlauf und die Therapie von hämatologischen und / oder onkologischen Erkrankungen zu bestimmen, wurden von 110 Kindern jeweils Serum und Knochenmarkproben auf Marker einer akuten, abgelaufenen oder persistierenden B19V-Infektion mittels qPCR, ELISA und WesternLine untersucht. 27/110 (24.5%) der Kinder litten an nicht malignen Erkrankungen (Anämie, Panzytopenie, Autoimmunerkrankungen). 68/110 (61.8%) Patienten waren an Leukämien, Lymphomen oder soliden, malignen Tumoren erkrankt. 15/110 Patienten (13.6%) wurden zunächst mit Verdacht auf eine maligne oder hämatologische Erkrankung aufgenommen, die jedoch im Verlauf ausgeschlossen wurde.

Zum Zeitpunkt der Aufnahme wurden B19V-spezifisches IgM und IgG als Indikatoren einer akuten oder stattgefundenen B19V-Infektion bei fünf (4.5%) bzw. 48 Patienten (43.6%) festgestellt. B19V-DNA (10^3 - 10^9 geq/ml) wurde im Serum und / oder Knochenmark von 22 Patienten (20.0%) nachgewiesen. Davon litten fünf Kinder an Leukämien, zwei an einem Non-Hodgkin Lymphom, sechs Kinder an soliden Tumoren, vier an Autoimmunerkrankungen und vier an hämatologischen Erkrankungen und ein Kind an Fieber unklarer Genese. Während der klinischen Beobachtung entwickelten vier weitere Leukämiepatienten eine Virämie. Eine persistierende B19V-Infektion wurde bei 13/22 DNA-positiven Patienten beobachtet. Die Therapie von B19V-DNA positiven Krebspatienten war mit einer erhöhten Supportivtherapie (Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentraten und/oder Antibiotikatherapie) assoziiert. Eine akute B19V-Infektion wurde häufig bei Patienten mit hämatologischen und/oder onkologischen Erkrankungen beobachtet. Bei Patienten mit nicht malignen Erkrankungen wurden Anämien oder Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit einer B19V-Infektion diagnostiziert. Weiterhin zeigte eine signifikante Anzahl von Krebspatienten Marker für eine akute, abgelaufene oder persistierende B19V-Infektion. Dies könnte durch die häufigen Therapien mit Blutprodukten in der Kombination mit einer therapeutischen Immunsuppression begünstigt werden. Bei B19V infizierten Krebspatienten war eine komplexere Supportivtherapie erforderlich.

E Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Parvus = klein

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
Bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Elisa	enzyme-linked immuno sorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
G	Gramm
Geq	Genome equivalents
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HR	High risk
IFA	immunofluorescent assay
IgM, IgG, IgE	Immunglobulin M, G, E
ITP	Idiopathische thrombozytopenische Purpura
ITR	Inverted terminal repeats
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
Kb	Kilo Byte
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramm
MDS	Myelodysplastisches Syndrom

Min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
n.a.	nicht abgenommen
NaN ₃	Natriumazid
NAT	Nucleic acid Amplification
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Nm	Nanometer
NS1, 2	Non-structural Protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	polyethylenglykolisiert
Persist.	Persistierend
PLA ₂	Phospholipase A2
PRCA	Pure red cell aplasia
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	revolutions per minute
S	Sekunde
Stattegef.	stattgefunden
TMB	Tetramethylbenzidin
u.a.	unter anderem
VP1, 2	Virus like particle 1, 2
VP16	Etoposid
z. B.	zum Beispiel
β-ME	β-Mercaptoethanol
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses; C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (eds) Academic Press, 1162 pp.; Elsevier Publication Date: 27 May 2005	9
Tabelle 2: Erkrankungen, die in Zusammenhang mit Parvovirus B19-Infektionen auftreten aus: Modrow Susanne: Parvovirus B19: Ein Infektionserreger mit vielen Erkrankungsbildern Dt Ärztebl 2001; 98: A 1620–1624 [Heft 24].....	22
Tabelle 3: Für Taqman PCR verwendete Primer	31
Tabelle 4: Gesamtübersicht der Studienteilnehmer in den Untergruppen A, B, C bei Erstabnahme.....	35
Tabelle 5: Prävalenz von Parvovirus B19-IgG bzw. Parvovirus B19-DNA bei IgG-positiven Patienten.....	37
Tabelle 6: Serologische und klinische Parameter der B19V-DNA-positiven Patienten ohne Folgeproben.....	38
Tabelle 7: Serologische Parameter von B19V-DNA-positiven Kindern mit Folgeproben (M/J = Monat/Jahr, part = partikulär; den=denaturiert; KM = Knochenmark)	40
Tabelle 8: Serologie und DNA-Nachweis der Leukämiekinder (B1 – B7) (part*=partikulär, den*= denaturiert, KM= Knochenmark)	45
Tabelle 9: Leukämiekinder mit negativem Parvovirus B19-DNA-Nachweis	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines B19V VP2-Partikels aus Bärbel Kaufmann et al, Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro, Virology, Volume 332, Issue 1, 5 February 2005, Pages 189-198.	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Humanen Parvovirus B19 Genoms und dessen Transskriptionskarte aus Amanda Corcoran and Sean Doyle; Advances in the biology, diagnosis and host–pathogen interactions of parvovirus B19; Journal of Medical Microbiology 2004, 53: 459–475.	12
Abbildung 3: Serologischer Verlauf einer akuten Parvovirus B19 Infektion aus Modrow Susanne: Parvovirus B19: Ein Infektionserreger mit vielen Erkrankungsbildern Deutsches Ärzteblatt 2001; 98(24): A-1620 / B-1390 / C-1293	19
Abbildung 4: Unterschiede beim Erythrozyten- bzw. Thrombozytenbedarf sowie den verabreichten Antibiotikatherapien bei Patienten mit positivem bzw. negativem Nachweis für Parvovirus B19-DNA (EKs = Erythrozytenkonzentrate, TKs = Thrombozytenkonzentrate)	47
Abbildung 5: Verlauf der B19V-Infektion bei Patient B2. Oberer Teil: B19V-spezifische DNA in Serum und Knochenmark (Symbol ● für Genome copies/ ml Serum und Symbol ○ Genome copies/ ml Knochenmark). Positiver Nachweis von B19V-spezifischen Antikörper (IgM (Symbol ■), IgG (Symbol ▼) und NS1 (Symbol Δ). Unterer Teil: Hämoglobinwerte (g/dl) (Symbol ●) und Thrombozytenwerte (103/μl) (Symbol □). Transfusionen von Erythrozytenkonzentrate (Symbol ○) und Thrombozytenkonzentrate (Symbol ▲)	51

Literaturverzeichnis

- Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. 2001.** A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods*. 2001, 92, S. 183-91.
- Aktepe OC, Yetgin S, Olcay L, Ozbek N. 2004.** Human parvovirus B19 associated with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Hematol Oncol*. 2004, Bd. 21 (5), S. 421-6.
- Anderson LJ, Tsou C, Parker RA, Chorba TL, Wulff H, Tattersall P, Mortimer PP. 1986.** Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986, 24, S. 522-26.
- Anderson MJ, Cohen BJ. 1987.** Human parvovirus B19 infections in United Kingdom. *Lancet*. 1987, 1, S. 738-9.
- Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, William JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrell DA. 1985.** Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis*. 1985, 152(2), S. 257-65.
- Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CL, Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS. 1983.** Human parvovirus the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet*. 1983, 1 (8338), S. 1378.
- Astell, CR. 1990.** Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication. 1990.
- Azzi A, Morfini M, Mannucci PM. 1999.** The transfusion associated transmission of parvovirus B19. *Transfusion Medicine Reviews*. 1999, 13, S. 194-204.
- Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. 2002.** Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol*. 2002, 3, S. 619-26.
- Ballou WR, Reed JL, Noble W, Young NS, Koenig S. 2003.** Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *Journal of Infectious Diseases*. 2003, 187, S. 675-8.
- Bansal GP, Hatfield JA, Dunn FE, Kramer AA, Brady F, Riggin CH, Collett MS, Yoshimoto K, Kajigaya S, Young NS. 1993.** Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *Journal of Infectious Diseases*. 1993, 167, S. 1034-44.
- Beigl RH, Wiesenfeld HC, Landers DV, Simhan HN. 2008.** High rate of severe fatal outcomes associated with maternal parvovirus b19 infection in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2008.
- Blaeser F, Kelly M, Siegrist K, Storch GA, Buller RS, Whitlock J, Truong N, Chatila TA. 2005.** Critical function of the CD40 pathway in parvovirus B19 infection revealed by a hypomorphic CD40 ligand mutation. *Clinical Immunology*. 2005, 117, S. 231-7.
- Bluth MH, Norowitz KB, Chice S, Shah VN, Nowakowski M, Durkin HG, Smith-Norowitz, TA. 2005.** IgE, CD8(1)CD601 T cells and IFN-alpha in human immunity to parvovirus B19 in selective IgA deficiency. *Human Immunology*. 2005, 66, S. 1029-38.

- Bluth MH, Norowitz KB, Chice S, Shah VN, Nowakowski M, Josephson AS, Durkin HG, Smith-Norowitz TA. 2003.** Detection of IgE antiparvovirus B19 and increased CD23+ B cells in parvovirus B19 infection: relation to Th2 cytokines. *Clin Immunol* 2003. 2003, 108, S. 152-8.
- Broliden K, Tolfenstam T, Ohlsson S, Henter JI. 1998.** Persistent B19 parvovirus infection in pediatric malignancies. *Med Pediatr Oncol*. 1998, 31, S. 66-72.
- Broliden, K. 2001.** Parvovirus B19 infection in pediatric solid-organ and bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant*. 2001, 5, S. 320-30.
- Brown CS, Salimans MM, Noteborn MHM, Weiland HT. 1990.** Antigenic Parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in a large quantities in a baculovirus expression system. *Virus Res*. 1990, 15, S. 197-212.
- Brown KE, Anderson SM, Young NS. 1993.** Erythrocyte P antigen; Cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*. 1993, 262, S. 114-7.
- Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, Young NS. 1994.** Resistance of parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med*. 1994, 330, S. 1192-6.
- Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH. 2001.** Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. summary of a workshop. *Transfusion*. 2001, 41, S. 130-5.
- Brown KE, Young NS, Liu JM. 1994.** Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994, 16, S. 1-31.
- Butchko AR, Jordan JA. 2004.** Comparison of three commercially available serological assays used to detect human Parvovirus B19 specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. *J Clin Microbiol*. 2004, 42, S. 3191-5.
- Carstensen H, Ornvold K, Cohen BJ. 1989.** Human parvovirus B19 infection associated with prolonged erythroblastopenia in leukemic child. *Pediatr Infect Dis J*. 1989, 8, S. 56.
- Cartter ML, Farley TA, Rosengren S, Quinn DL, Gillespie SM, Gary GW, Hadler JL. 1991.** Occupational risk factors for infection with parvovirus B19 among pregnant women. *J Infect Dis*. 1991, 163, S. 282-5.
- Cassinotti P, Siegl G. 2000.** Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2000, 19, S. 886-7.
- Cassinotti P, Siegl G, Michel BA, Bruhlmann P. 1998.** Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *Journal of Medical Virology*. 1998, 56, S. 199-204.
- Chen AY, Zhang EY, Guan W, Cheng F, Kleiboeker S, Yankee TM, Qiu J. 2010.** The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood*. 115(5), 2010, S. 1070-80.
- Chen Z, Guan W, Cheng F, Chen AY, and Qiu J. 2009.** Molecular characterization of human parvovirus B19 genotypes 2 and 3. *Virology*. 2009, Bd. 394, S. 276-85.

- Cohen BJ, Beard S, Knowles WA, Ellis JS, Joske D, Goldman JM, Hewitt P, Ward KN. 1997.** Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow transplant patient after platelet transfusion. *Transfusion*. 1997, 37, S. 947-952.
- Cohen BJ, Buckley MM. 1988.** The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol*. 1988, Bd. 25(2), S. 151-3.
- Cooling LL, Koerner TA, Naides SJ. 1995.** Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis*. 1995, 172, S. 1198-205.
- Corcioli F, Zakrzewska K, Fanci R, De Giorgi V, Innocenti M, Rotellini M, Di Lollo S, Azzi A. 2010.** Human parvovirus PARV4 DNA in tissues from adult individuals: a comparison with human parvovirus B19 (B19V). *Viol J*. 7, 2010, S. 272.
- Corcoran A, Crowley B, Dewhurst C, Pizer BL, Doyle S. 2006.** Establishment of functional B cell memory against parvovirus B19 capsid proteins may be associated with resolution of persistent infection. *J Med Virol*. 2006, 78, S. 125-8.
- Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. 1975.** Parvovirus like particles in human sera. *Lancet*. 1975, S. I: 72-73.
- Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR, Tattersall P. 1986.** Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J Virol*. 1986, 60 (2), S. 548-57.
- Cotmore SF, Tattersall P. 1984.** Characterization and molecular cloning. *Science*. 1984.
- Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, Siegl G. 1990.** Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology*. 1990, 175(1):247-54., S. 247-54.
- Dijkmans BA, Van Elsacker-Niele AM, Salimans MM, van Albada-Kuipers GA, de Vries E, Weiland HT. 1988.** Human parvovirus B19 DNA in synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 1988, 31, S. 279-81.
- Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landberg P, Hoffmann JH, Drobnik W, Modrow S. 2002.** The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2 like activity. *Journal of Virology*. 2002, 76, S. 2014-18.
- Duncan JR, Potter CB, Cappellini MD, Kurtz JB, Anderson MJ, Weatherall DJ. 1983.** Aplastic crisis due to parvovirus infection in pyruvate kinase deficiency. *Lancet*. 1983, Bd. 2(8340), S. 14-6.
- Egbuna O, Zand MS, Arbini A, Menegus M, Taylor J. 2006.** A cluster of parvovirus B19 infections in renal transplant recipients: a prospective case series and review of literature. *Am J Transplant*. 2006, 6, S. 225-31.
- Eid AJ, Brown RA, Patel R, Razonable RR. 2006.** Parvovirus B19 infection after transplantation: a review of 98 cases. *Clin Infect Dis*. 2006, 43(1), S. 40-8.

- Eis-Hubinger AM, Oldenburg J, Brackmann HH, Matz B, Schneweis KE. 1996.** The prevalence of antibody to parvovirus B19 in hemophiliacs and in the general population. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1996, 284, S. 232-40.
- Ennis O, Corcoran A, Kavanagh K, Mahon BP, Doyle S. 2001.** Baculovirus expression of parvovirus B19 (B19V) NS1: utility in confirming recent infection. *Journal of Clinical Virology*. 2001, 22, S. 55-60.
- Erdman DD, Anderson BC, Török TJ, Finkel TH, Anderson LJ. 1997.** Possible transmission of parvovirus B19 from intravenous immune globulin. *J Med Virol*. 1997, 53 (3), S. 233-36.
- Erol I, Alehan F, Yalcin K. 2006.** Refractory status epilepticus owing to human parvovirus B19 encephalitis in a child. *J Child Neurol*. 2006, 9, S. 820-2.
- Evans JP, Rossiter MA, Kumaran TO, Marsh GW, Mortimer PP. 1984.** Human parvovirus aplasia: case due to cross infection in a ward. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984, 288, S. 681.
- Fattet S, Cassinotti P, Popvic MB. 2004.** Persistent human parvovirus B19 infection in children under maintenance chemotherapy for acute lymphocytic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2004, 26, S. 497-503.
- Fryer JF, Hubbard AR, Baylis SA. 2007.** Human parvovirus PARV4 in clotting factor VIII concentrates. *Vox Sang*. 2007, Bd. 93(4), S. 341-7.
- Fu, Y. 2002.** necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol*. 2002.
- Gallinella G, Manaresi E, Venturoli S, Grazi GL, Musiani M, Zerbini M. 1999.** Occurrence and clinical role of active parvovirus B19 infection in transplant recipients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1999, 18, S. 811-13.
- Gonzalez B, Larranga C, Leon O, Diaz P, Miranda M, Barria M, Gaggero A. 2007.** Parvovirus B19 may have a role in the pathogenesis of juvenile idopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2007, 34, S. 1336-40.
- Groeneveld K, Von der Noordaa J. 2003.** Blood products and parvovirus B19. *Neth J Med*. 2003, 61, S. 154-6.
- Hanada T, Koike K, Hirano C, Takeya T, Suzuki T, Matsunaga Y, Takita H. 1989.** Childhood transient erythroblastopenia complicated by thrombocytopenia and neutropenia. *Eur J Haematol*. 1989, 42, S. 77-80.
- Hanada T, Koike K, Takeya T, Nagasawa T, Matsunaga Y, Takita H. 1988.** Human Parvovirus B19-induced transient pancytopenia in a child with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*. 1988, 70, S. 113-5.
- Heegaard ED, Brown KE. 2002.** Human Parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*. 2002, 15, S. 485-505.
- Heegaard ED, Laub Petersen B. 2000.** Parvovirus B19 transmitted by bone marrow. *Br J Haem*. 2000, 111, S. 659-61.

Heegaard ED, Petersen BL, Heilmann CJ, Hornsleth A. 2002. Prevalence of parvovirus B19 and parvovirus V9 DNA and antibodies in paired bone marrow and serum samples from healthy individuals. *J Clin Microbiol.* 2002, 40, S. 933-6.

Heegaard ED, Rostha JS, Petersen BL, Nielsen S, Karup Pedersen F, Hornsleth A. 1999. Role of parvovirus B19 infection in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr.* 1999, 88, S. 614-7.

Heegard ED, Myhre J, Hornsleth A, Gundestrup M, Boye H. 1997. Parvovirus B19 infections in patients with chronic anemia. *Haematologica.* 1997, 82, S. 402-5.

Hemauer A, Gigler A, Searle K, Beckenlehner K, Raab U, Broliden K, Wolf H, Enders G, Modrow S. 2000. Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J Med Virol.* 2000, 60, S. 48-55.

Hemauer A, von Poblitzki A, Gigler A, Cassinotti P, Siegl G, Wolf H, Modrow S. 1996. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J Gen Virol.* 1781-5. 1996, 77 (Pt 8), S. 1781-5.

Hida M, Shimamura Y, Ueno E, Watanabe J. 2000. Childhood idiopathic thrombocytopenic pupura associated with human parvovirus B19 infection. *Pediatr Int.* 2000, 42, S. 708-10.

Hino M, Ishiko O, Honda KI, Yamane T, Ohta K, Takubo T, Tatsumi N. 2000. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. *Br J Haem.* 2000, 108, S. 194-5.

Hokynar K, Soderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, Hedman K. 2002. A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology.* 2002, 302, S. 224-8.

Holm JM, Hansen LK, Oxhøj H. 1995. Kawasaki disease associated with parvovirus B19 infection. *Eur J Pediatr.* 1995, Bd. 154(8), S. 633-4.

Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. 1994. Virusspecific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature.* 1994, 369, S. 652-4.

Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z, Rudich H, Kasymbekova K, Sarv I, Nedeljkovic J, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Gerasimova AG, Moskaleva TN, Tikhonova NT, Chitadze N, Forbi JC, Faneye AO, Otegbayo JA, Charpentier. 2009. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J Clin Microbiol.* 2009, 47(11), S. 3735-8.

Isa A, Kasprowicz V, Norbeck O, Loughry A, Jeffery K, Broliden K, Klenerman P, Tolfvenstam T, Bowness P. 2005. Prolonged activation of virusspecific CD8(+) T cells after acute B19 infection. *PLoS Med.* 2005, 2, S. e343.

Jones LP, Erdmann DD, Anderson LJ. 1999. Prevalence of antibodies to human parvovirus B19 nonstructural protein in persons with various clinical outcomes following B19 infection. *J infect Dis.* 1999, 180, S. 500-4.

Jordan J, Tiangco B, Kiss J, Koch W. 1998. Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sanguinis*. 1998, 75, S. 97-102.

Jordan, JA. 2000. Comparison of a baculovirus-based VP2 enzyme immunoassay (EIA) to an Escherichia coli based VP1 EIA for detection of human Parvovirus B19 immunoglobulin M and immunoglobulin G in sera of pregnant women. *J Clin Microbiol*. 2000, 38, S. 1472-5.

Kajigaya S, Fujii H, Field A, Anderson S, Rosenfeld S, Anderson LJ, Shimada T, Young NS. 1991. Self assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88, S. 4646-50.

Keer S, O'Keeffe G, Kilty C, Doyle S. 1999. Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG. *J Med Virol*. 1999, 57, S. 179-85.

Kelley HA, Siebert D, Hammond R, Leydon J, Kiely P, Maskill W. 2000. The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. *Epidemiol Infect*. 2000, 124, S. 449-57.

Klepfish A, Rachmilevitch E, Schattner A. 2006. Parvovirus B19 reactivation presenting as neutropenia after rituximab treatment. *Eur J Intern Med*. 2006, 17(7), S. 505-7.

Koch WC, Massey G, Russell CE, Adler SP. 1990. Manifestations and treatment of human parvovirus B19 infection in immunocompromised patients. *J Pediatr*. 1990, 116, S. 355-9.

Koch, WC. 2000. *Parvovirus B19. Textbook of Pediatrics*. Philadelphia:W.B. Saunders : Behrman, Kliegman, Jenson eds., 2000. S. 964-6.

Koenigbauer UF, Eastlund T, Day JW. 2000. Clinical illness due to parvovirus B19 infection after infusion of solvent/detergent-treated pooled plasma. *Transfusion*. 2000, 40, S. 1203-6.

Koppelman MH, Cuypers HAT, Emrich T, Zaaijer HL. 2004. Quantitative real time detection of parvovirus B19 DNA in Plasma. *Transfusion*. 2004, 44(1), S. 97-103.

Kudoh T, Yoto Y, Suzuki N, Oda T, Katoh S, Chiba S, Matsunaga Y. 1994. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in iron deficiency anemia. *Acta Paediatr Jpn*. 1994, 36(4), S. 448-9.

Kueth F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, Schaal S, Kamvissi V, Bornstein SR, Schwanebeck U, Modrow S. 2009. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin Infect Dis*. 2009, Bd. 49(11), S. 1660-6.

Kurtzman GJ, Cohen BJ, Field AM, Oseas R, Blaese RM, Young NS. 1989. Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest*. 1989, 84 (4), S. 1114-23.

LaMonte AC, Paul ME, Read JS, Frederick MM, Erdmann DD, Han LL, Anderson LJ. 2004. Persistent parvovirus B19 infection without the development of chronic anemia in HIV-infected and -uninfected children: the Women and Infants Transmission Study. *Journal of Infectious Diseases*. 2004, 189, S. 847-51.

Lefrère JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrère F, Girot R, Allain JP, Laperche S. 2005. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood*. 2005, 106, S. 2890-5.

Lehmann HW, Knoll A, Kuster RM, Modrow S. 2003. Frequent infection with a viral pathogen, parvovirus B19, in rheumatic diseases in childhood. *Arthritis Rheum*. 2003, Bd. 48, S. 1631-8.

Lehmann HW, Lutterbüse N, Plentz A, Akkurt I, Albers N, Hauffa B, Hiort O, Schoenau E, Modrow S. 2008. Association of parvovirus B19 infection and Hashimoto's thyroiditis in children. *Viral immunol*. 2008, 21, S. 379-84.

Lehmann HW, Plentz A, v. Landberg P, Küster RM, Modrow S. 2008. Different patterns of disease manifestations of parvovirus B19-associated juvenile arthritis and the induction of antiphospholipid-antibodies. *Clin Rheumatol*. 2008, 27, S. 333-8.

Li X, Rhode III SL. 1990. Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter transactivation, and cytotoxicity. *J Virol*. 1990, 64, S. 4654-60.

Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres AS, Raab U, Neumayer HH, Meisel H, Modrow S. 2005. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol*. 75(1), 2005, S. 161-9.

Lindblom A, Heyman M, Gustafsson I, Norbeck O, Kaldensjö T, Vernby A, Henter JL, Tolfenstam T, Broliden K. 2008. Parvovirus B19 infection in children with acute lymphoblastic leukemia is associated with cytopenia resulting in prolonged interruptions of chemotherapy. *Clin Infect Dis*. 2008, 46, S. 528-36.

Lindblom A, Isa A, Norbeck O, Wolf S, Johansson B, Broliden K, Tolfvenstam T. 2005. Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection. *Clin Infect Dis*. 2005, 41, S. 1201-3.

Llewellyn C, Williamson L. 2004. Distribution of blood components recipients according to immune status. *Euro Sat*. 2004, October.

Lundqvist A, Tolfvenstam T, Bostic J, Soderlund M, Broliden K. 1999. Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Scand J Infect Dis*. 1999, 31.

Luo W, Astell CR. 1993. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology*. 1993, 195(2), S. 448-55.

Manaresi E, Gallinella G, Zerbini ML, Venturoli S, Gentilomi G, Musiani M. 1999. IgG immune response to B19 parvovirus VP1 und VP2 linear epitopes by immunoblot assay. *J Med Virol*. 1999, 57, S. 174-8.

Manaresi E, Zuffi E, Gallinella G, Gentiloni G, Zerbini ML, Musiani M. 2001. Differential IgM response to conformational and linear epitope of Parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins. *J Med Virol*. 2001, 64, S. 67-73.

Mauser Bunschoten EP, Zaaijer HL, van Drimmelen AA, de Vries S, Roosendaal G, van den Berg HM, Lelie PN. 1998. High prevalence of parvovirus B19 IgG antibodies among Dutch hemophilia patients. *Vox Sanguinis*. 1998, 74, S. 225-7.

McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. 1983. Cytotoxic T cell immunity to influenza. *N Engl J Med*. 1983, 309, S. 13-7.

McOmish F, Yap PL, Jordan A, Hart H, Cohen BJ, Simmonds P. 1993. Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993, 31, S. 323-28.

Miyagawa E, Yoshida T, Takahashi H, Yamaguchi K, Nagano T, Kiriya Y, Okochi K, Sato H. 1999. Infection of the erythroid cell line, KU 812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J Virol Methods*. 1999, 83, S. 45-54.

Modrow S, Falke D, Truyen U. 2003. *Molekulare Virologie 2. Auflage*. 2003.

Modrow S, Falke, Truyen. 2000. *Molekulare Virologie*. s.l. : Spektrum Verlag, 2000.

Modrow S, Wenzel JJ, Schimanski S, Schwarzbeck J, Rothe U, Oldenburg J, Jilg W, Eishübing AM. 2010. Prevalence of nucleic acid sequences specific for human parvoviruses, hepatitis A and hepatitis E viruses in coagulation factor concentrates. *Vox Sang*. 2010, Bde. doi: 10.1111/j.1423-0410.2010.01445.x. [Epub ahead of print].

Modrow, S. 2001. Parvovirus B19: Ein Infektionserreger mit vielen Erkrankungsbildern. *Dtsch Arztebl* 2001. 2001, Bde. D98: A 1620–1624, [Heft 24].

—. **2006.** Parvovirus B19: the causative agent of dilated cardiomyopathy or a harmless passenger of the human myocard? *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006, 55, S. 63-82.

Mofatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. 1998. Human Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol*. 1998, 72, S. 3018-28.

Momoeda M, Kawase M, Jane SM, Miyamura K, Young NS, Kajigaya S. 1994. The transcriptional regulator YY1 binds to the 5'-terminal region of B19 parvovirus and regulates P6 promoter activity. *J Virol*. 1994, 68, S. 7159-68.

Momoeda M, Wong S, Kawase M, Young NS, Kajigaya S. 1994. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J Virol*. 1994, 68, S. 8443-6.

Morinet F, D'Auriol L, Tratschin JD, Galibert F. 1989. Expression of the human Parvovirus B19 protein fused to protein A in *Escherichia coli*: recognition by IgM and IgG antibodies in human sera. *J Gen Virol*. 1989, 70, S. 3091-7.

Mortimer PP, Humphries RK, Moore JG, Purcell RH, Young NS. 1983. A human parvovirus like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature*. 1983, 302, S. 426-9.

Moudgil A, Shidban H, Nast CC, Bagga A, Aswad S, Graham SL, Mendez R, Jordan SC. 1997. Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients: treatment with intravenous immunoglobulin. *Transplantation*. 1997, 64, S. 1847-50.

- Muir K, Todd WT, Watson WH, Fitzsimons E. 1992.** Viral-associated haemophagocytosis with parvovirus B19 related pancytopenia. *Lancet*. 1992, 339, S. 1139-40.
- Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Koder T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. 2005.** Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood*. 2005, 106, S. 3449-56.
- Musiani M, Zerbini M, Gentilomi G, Plazzi M, Gallinella G, Venturoli S. 1995.** Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J Infect Dis*. 1995, 172, S. 1360-3.
- Nigro G, Zerbini M, Krzysztofiak A, Gentilomi G, Porcaro MA, Mango T, Musiani M. 1994.** Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. *Lancet*. . 1994, Bd. 343(8908), S. 1260-1.
- Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Söderlund-Venermo M, Hedman K. 2006.** Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2006, 103, S. 7450-53.
- Nour B, Green M, Michaels M, Reyes J, Tzakis A, Gartner JC, McLoughlin L, Starzl TE. 1993.** Parvovirus B19 infection in pediatric transplant patients. *Transplantation*. 1993, 56, S. 835-8.
- Oguz F, Akdeniz C, Unuvar E, Kucukbasmaci O, Sidal M.** Parvovirus B19 in acute arthropathies and juvenile rheumatoid arthritis. *J Paediatr Child Health*. 38, S. 358-62.
- Oh SE, Kim JH, Choi CH, Park KH, Jung JY, Park Y, Park MJ. 2005.** An adult with aplastic crisis induced by human parvovirus B19 as an initial presentation of hereditary spherocytosis. *Korean J intern Med*. 20(1), 2005, S. 96-9.
- Owren, PA. 1948.** Congenital hemolytic jaundice the pathogenesis of the hemolytic crisis. *Blood*. 1948, 3, S. 231-48.
- Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T, Young N. 1987.** Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *Journal of Virology*. 1987, 61, S. 2395-406.
- Ozawa K, Ayub J, Kajigaya S, Shimada T, Young N. 1988.** The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J Virol*. 1988, 62, S. 2884-9.
- Ozawa K, Young N. 1987.** Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol*. 1987, 61, S. 2627-30.
- Ozdemir N, Aki H, Hakyemez HT, Cokuğraş FC, Apak H. 2010.** Parvovirus B19 infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Int J Infect Dis*. 2010 [Epub ahead of print]. [Epub ahead of print], 2010.
- Palmer P, Pallier C, Leruez-Ville M, Deplanche M, Morinet F. 1996.** Antibody response to human Parvovirus B19 in patients with primary infection by immunoblot assay with recombinant proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996, 3, S. 236-8.

- Parsyam A, Condotti D. 2007.** Human erythrovirus B19 and blood transfusion - an update. *Transfusion Medicine*. 2007, 17, S. 263-78.
- Parsyan A, Addo-Yobo E, Owusu-Oforu S, Akpene H, Sarkodie F, Allain JP. 2006.** Effects of transfusion on human erythrovirus B19 susceptible or infected pediatric recipients in a genotype 3 endemic area. *Transfusion*. 2006, 46, S. 1593-600.
- Parsyan A, Szmargd C, Allain JP, Candotti D. 2007.** Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol*. 2007, Bd. 88, S. 428–31.
- Pattison JR, Jones SE, Hodgson J et al. 1981.** Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle cell anaemia. *Lancet*. 1981, S. 1: 664-5.
- Peerlinck K, Goubau P, Reybrouk R, Desmyter J, Vermynen J. 1995.** Parvovirus B19 antibodies in patients with haemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995, 73, S. 555-6.
- Pfreppe KI, Enders M, Motz M. 2005 .** Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005 , Bde. 52(7-8), S. :362-5.
- Prowse C, Ludlam CA, Yap PL. 1997.** Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang*. 1997, 72, S. 1-10.
- Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller S, Doyle S, Modrow S. 2002.** NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology*. 2002, Bd. 293, S. 86-93.
- Rao SP, Desai N, Miller ST. 1996.** B19 parvovirus infection and transient aplastic crisis in a child with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1996, 18, S. 175-7.
- Rodriguez-Pla A, Stone JH. 2006.** Vaskulitis and systemic infections. *Curr Opin Rheumatol*. 2006, 18, S. 39-47.
- Röhrer C, Gärtner B, Sauerbrei A, Böhm S, Hottenträger B, Raab U, Thierfelder W, Wutzler P, Modrow S. 2008.** Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol Infect*. 2008, Bd. 136(11), S. 1564-75.
- Rosenfeld SJ, Yoshimoto K, Kajigaya S et al. 1992.** Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest*. 1992, 89, S. 2023-29.
- Rouger P, Gane P, Salmon C. 1987.** Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies. *Fr Transfus Immunohematol*. 1987, 30, S. 699-708.
- Saal JG, Steidle M, Einsele H, Muller CA, Fritz P, Zacher J. 1992.** Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 1992, 12, S. 147-51.
- Saarinén UM, Chorbá TL, Tattersall P, Young NS, Anderson LJ, Palmer E, Coccia PF. 1986.** Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*. 1986, 67, S. 1411-7.

Saikawa T, Anderson S, Momoeda M, Kajigaya S, Young NS. 1993. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J Virol.* 1993, 67, S. 3004-9.

Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M. 1994. Eliminating parvovirus B19 from blood products. *Lancet.* 1994, 343, S. 798.

Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M, Musso R, Santoro R, Schiavoni M. 1997. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100 degrees C heat after lyophilization. *Transfusion.* 1997, 37, S. 517-22.

Sarfraz AA, Samuelsen SO, Bruu AL, Jennum PA, Eskild A. 2009. Maternal human parvovirus B19 infection and the risk of fetal death and low birthweight: a case-control study within 35 940 pregnant women. *BJOG.* 2009, Vol. 116 (11), pp. 1492-8.

Schwarz TF, Roggendorf M, Deinhardt F. 1988. Human Parvovirus B19: ELISA and immunoblot assay. *J Virol Methods.* 1988, 20, S. 155-68.

Schwarz TF, Serke S, Hottenträger B, von Brunn A, Baurmann H, Kirsch A, Stolz W, Huhn D, Deinhardt F, Roggendorf M. 1992. Replication of parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood. *Journal of Virology.* 1992, 66, S. 1273-76.

Searle K, Schalasta G, Enders G. 1998. Development of antibodies to the nonstructural protein NS1 of parvovirus B19 during acute symptomatic and subclinical infection in pregnancy: implications for pathogenesis doubtful. *Journal of Medical Virology.* 1998, 56, S. 192-198.

Serjeant BE, Hambleton RR, Kerr S, Kilty CG, Serjeant GR. 2001. Haematological response to Parvovirus B19 infection in homozygous sickle-cell disease. *Lancet.* 2001, 358, S. 1779-80.

Serjeant BE, Thomas PW, Anderson MJ, Patou G, Pattison JR. 1993. Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *Lancet.* 15. 05 1993, S. 341:1237-40.

Servant, A., Laperche S., Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet J.F., Garbarg-Chenon A. 2002. Genetic diversity within human erythroviruses identification of three genotypes. *Journal of Virology.* 2002, 76, S. 9124-34.

Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR. 1986. Nucleotide sequence and genome organization of human Parvovirus B19 isolated from serum of a child during aplastic crisis. *J Virol.* 1986, 58, S. 921-36.

Shen Q, Xu H, Cao Q, Zhou LJ, Xu J, Fang XY, Ge J. 2010. Long-term remission of recurrent severe anemia as a result of parvovirus B19 infection in a pediatric renal transplant recipient. *Pediatr Transplant.* 2010, Epub ahead of print.

Shimomura S, Komatsu N, Frickhofen N, Anderson S, Kajigaya S, Young NS. 1992. First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood.* 1992, 79, S. 18-24.

Shneerson JM, Mortimer PP, Vandervelde EM. 1980. Febrile illness due to a parvovirus. *Br Med J.* 1980, 280, S. 1580.

Skaff PT, Labiner DM. 2001. Status epilepticus due to human parvovirus B19 encephalitis in an immunocompetent adult. *Neurology*. 2001, 57(7), S. 1336-7.

Smith MA, Shah NR, Lobel JS, Cera PJ, Gary GW, Anderson LJ. 1988. Severe anemia caused by human parvovirus in a leukemia patient on maintenance chemotherapy. *Clin Pediatr (Phila)*. 1988, 27, S. 383-6.

Smith-Whitley K, Zhao H, Hodinka RL, Kwiatkowski J, Cecil R, Cecil T, Cnaan A, Ohene-Frempong K. 2004. Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease. *Blood*. 2004, 103, S. 422-7.

Söderlund M, Brown CS, Spaan WJM, Hedman L, Hedman K. 1995. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 und VP2 of human Parvovirus B19. *J Infect Dis*. 1995, 172, S. 1431-6.

Soderlund M, von Essen R, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K. 1997. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet*. 1997, 349, S. 1063-5.

Soliman Oel-S, Abd El-Aal Hegazi Hasan M, El-Ashry R, Zaghloul MH, Kora B. 2009. Parvovirus B19 infection in pediatric oncology patients: diagnostic value of clinical and serological parameters compared with nested PCR. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009, 31, S. 173-6.

Srivastava A, Bruno E, Briddell R, Cooper R, Srivastava C, van Besien K, Hoffman R. 1990. Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 1990, 76, S. 1997-2004.

Srivastava CH, Zhou S, Munshi NC, Srivastava A. 1992. Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology*. 1992, 189, S. 456-61.

Suikkanen S, Antila M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta, M, Vuento M. 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology*. 2003, 316, S. 267-80.

Tchernia G, Morinet F, Congard B, Croisille L. 1993. Diamond Blackfan anaemia: apparent relapse due to B19 parvovirus. *Eur J Pediatr*. 209-10. 1993, Bd. 152(3), S. 209-10.

Tolfvenstam T, Broliden K. 2009. Parvovirus B19 infection. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009, Bd. 14 (4), S. 218-21.

Tolfvenstam T, Oxenius A, Price DA, Shacklett BL, Spiegel HM, Hedman K, Norbeck O, Levi M, Olsen K, Kantzanou M, Nixon DF, Broliden K, Klenerman P. 2001. Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19. *J Virol*. 2001, 75, S. 540-3.

Toyokawa Y, Kingetsu I, Yasuda C, Yasuda J, Yoshida K, Kurosaka D, Yamada A. 2007. A case of pure red cell aplasia complicated by Evans syndrome. *Mod Rheumatol*. 2007, 17, S. 333-7.

Tsujimura M, Matsushita K, Shiraki H, Sato H, Okochi K, Maeda Y. 1995. Human parvovirus B19 infection in blood donors. *Vox Sang*. 1995, 69, S. 206-12.

Uike N, Miyamura T, Obama K, Takahira H, Sato H, Kazuru M. 1993. Parvovirus B19-associated haemophagocytosis in Evans syndrome: aplastic crisis accompanied by severe thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1993, 84, S. 530-2.

Umene K, Nunoue T. 1991. Genetic diversity of human parvovirus B19 determined using a set of restriction endonucleases recognizing four or five base pairs and partial nucleotide sequencing: use of sequence variability in virus classification. *J Gen Virol.* . 1991, 72 (Pt 8), S. 1997-2001.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes Mk, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. 2000. *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the international committee on taxonomy of viruses.* San Diego : Academic Press, 2000.

Venturoli S, Gallinella G, Manaresi E, Gentilomi G, Musiani M, Zerbini M. 1998. IgG response to the immunoreactive region of parvovirus B19 nonstructural protein by immunoblot assay with a recombinant antigen. *J Infect Dis.* 1998, 178, S. 1826-9.

von dem Borne AE, Bos MJ, Joustra-Maas N, Tromp JF, van't Veer MB, van Wijngaarden-du Bois R, Tetteroo PA. 1986. A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br J Haematol.* 1986, 63, S. 35-46.

von Poblitzki A, Hemauer A, Gigler A, Puchhammer-Stöckl E, Heinz FX, Pont J, Laczika K, Wolf H, Modrow S. 1995. Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients implications for pathogenesis. *J Infect Dis.* 1995, 172, S. 1356-9.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. 2003. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human Parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood.* 2003, 102, S. 3927-33.

—. **2001.** Recombinant human Parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J Virol.* 2001, 75, S. 4110-6.

Wildig, J. 2006. Parvovirus B19 Infection contributes to severe anemia in young children. *JID.* 15. 7 2006, 194.

Woolf AD, Champion GV, Chishick A, Wise S, Cohen BJ, Klouda PT, Caul O, Dieppe PA. 1989. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med.* 1989, 149, S. 1153-6.

Woolf AD, Cohen BJ. 1995. Parvovirus B19 and chronic arthritis - causal or casual association? *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1995, 54, S. 535-536.

Yaegashi N, Shiraishi H, Takeshita T, Nakamura M, Yajima A, Sugamura, K. 1989. Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver. *Journal of Virology.* 1989, S. 2422-26.

Yetgin S, Cetin M, Yenicesu I, Ozaltin F, Uçkan D. 2000. Acute parvovirus B19 infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 65(4), 2000, S. 276-8.

Yoto Y, Kudoh T, Haseyama K et al. 1995. Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br J Haematol.* 1995, 91, S. 1017-8.

- Young NS, Brown KE. 2004.** Parvovirus B19. *N Engl J Med.* 2004, 350, S. 586-97.
- Yunoki M, Tsujikawa M, Urayama T, Sasaki Y, Morita M, Tanaka H, Hattori S, Takechi K, Ikuta K. 2003.** Heat sensitivity of human parvovirus B19. *Vox sanguinis.* 2003, 84, S. 164-9.
- Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariépy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P. 2001.** A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell.* 2001, Bd. 1(2), S. 291-302.
- Zaki Mel S, Hassan SA, Seleim T, Lateef RA. 2006.** Parvovirus B19 infection in children with a variety of hematological disorders. . *Hematology.* 2006, 11, S. 261-6.
- Zakrzewska K, Azzi A, De Biasi E, Radossi P, De Santis R, Davoli PG, Tagariello G. 2001.** Persistence of parvovirus B19 DNA in synovium of patients with haemophilic arthritis. *J Med Virol.* 2001, 65, S. 402-7.
- Zanella A, Rossi F, Cesana C et al. 1995.** Transfusion transmitted human parvovirus B19 infection in a thalassemic patient. *Transfusion.* 1995, 35, S. 769-772.
- Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. 2006.** Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles of NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *Journal of Virology.* 2006, 80, S. 5941-50.

Danksagung

Hiermit will ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die mich auf dem Weg zu meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Susanne Modrow und Herrn Dr. Ove Peters für ihre Unterstützung, konstruktive Kritik und Geduld.

Ich danke der gesamten „AG Modrow“ für die kollegiale und freundliche Atmosphäre. Insbesondere möchte ich Frau Petra Turowski für ihre große Unterstützung danken.

Den Dank an die kleinen Patienten und ihre Eltern für ihre vorbehaltlose Teilnahme an dieser Studie verbinde ich mit meinen besten Wünschen für die Zukunft.

Außerdem danke ich den Ärzten und Krankenschwestern der Abteilung für pädiatrische Hämatologie/Onkologie für ihre Hilfe beim Sammeln der Proben.

Ich danke meiner Familie und meinem Freund Dimi für ihre grenzenlose Fürsorge und Unterstützung.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Universität Regensburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Parvovirus B19 Infektionen bei pädiatrischen Patienten mit hämatologischen und / oder onkologischen Erkrankungen

aus dem Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Regensburg unter Betreuung und Anleitung von Frau Prof. Susanne Modrow mit Unterstützung durch Dr. med. Ove Peters ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Clinical Microbiology and Infection, 2010 Sep 3 (im Druck)

Der Titel des veröffentlichten Artikels lautet:

Impact of Parvovirus B19 Infection on Pediatric Patients with Hematologic and/or Oncologic Disorders.

Stockholm, Februar 2011