

Aus dem Institut für Tropenmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

D I S S E R T A T I O N

Randomisierte, doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Therapiestudie  
zu Sulphadoxin-Pyrimethamin allein  
und in Kombination mit Amodiaquin  
oder Artesunat bei unkomplizierter Malaria in Ghana

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nasstasja Wassilew  
aus Hamburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. F. P. Mockenhaupt
2. Prof. Dr. med. H.-W. Presber
3. Prof. Dr. med. K. Stark

Datum der Promotion: 03.09.2010

Meinen Eltern Sawko und Elisabeth

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie der Malaria . . . . .	2
1.2	Entwicklungszyklus der Plasmodien . . . . .	4
1.3	Klinik der Malaria tropica im Hochendemiegebiet . . . . .	5
1.4	Immunität . . . . .	7
1.5	Diversität von <i>Plasmodium falciparum</i> . . . . .	8
1.6	Therapie der Malaria . . . . .	9
1.6.1	Chloroquin . . . . .	10
1.6.2	Alternative Malariamedikamente . . . . .	11
1.7	Resistenzmechanismen und Medikamentenkombinationen . . . . .	15
1.8	Entwicklungen in der Malaria-Politik bis 2000 . . . . .	16
1.9	Zielsetzung . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Studiengebiet Ghana . . . . .	19
2.2	Studienteam und Studienteilnehmer . . . . .	20
2.3	Ein- und Ausschlußkriterien . . . . .	21
2.4	Rekrutierungsablauf . . . . .	22
2.4.1	Anamnese . . . . .	23
2.4.2	Klinik . . . . .	23
2.4.3	Labor . . . . .	24
2.4.4	Aufklärung und Einwilligung . . . . .	26
2.4.5	Therapie . . . . .	26
2.5	Studienablauf . . . . .	28
2.6	Klassifizierung des Therapie-Ergebnisses . . . . .	29

2.7	Ergänzende Laborarbeiten, Institut für Tropenmedizin Berlin, Charité . . . .	30
2.7.1	DNA-Extraktion . . . . .	30
2.7.2	Polymerase Kettenreaktion . . . . .	31
2.7.3	<i>msp1</i> und <i>msp2</i> . . . . .	32
2.7.4	Gel-Elektrophorese . . . . .	34
2.8	Datenanalyse . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Charakterisierung der Therapiegruppen . . . . .	37
3.2	Studienausschlüsse und Therapieabbrüche . . . . .	38
3.3	Auswertung der Ergebnisse . . . . .	40
3.3.1	Auswertung nach 14 Tagen . . . . .	40
3.3.2	Auswertung nach 28 Tagen . . . . .	41
3.4	Parasiten- und Fieberbeseitigung, Hb-Entwicklung . . . . .	42
3.5	Gametozyten . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1	Diskussion von Studienprotokoll und Rahmenbedingungen . . . . .	46
4.1.1	Studienprotokoll . . . . .	46
4.1.2	Rahmenbedingungen der Studie . . . . .	49
4.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	50
4.2.1	Vergleich der Therapieregime . . . . .	51
4.2.2	Entwicklungen seit 2000 . . . . .	58
4.2.3	Herausforderungen der Malaria-Kontrolle . . . . .	60
4.3	Schlussfolgerung . . . . .	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Bezugsquellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>83</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Malaria ist noch heute, etwa 100 Jahre nach der Entdeckung der erythrozytären Parasiten als ihr Erreger durch Alphonse Laveran 1880 [1] und der Entdeckung der Übertragung durch die Mücke der Gattung *Anopheles* durch Ronald Ross 1897 [2], mit einer Gesamtmortalität von schätzungsweise über 1.000.000/Jahr die bedeutendste parasitäre Erkrankung weltweit. Mit anteilig 90 % der Gesamtmortalität am meisten betroffen sind die Länder südlich der Sahara in Afrika [3]. In Regionen mit stabilen und hohen Transmissionsraten, sogenannten hyper- bis holoendemischen Regionen, stellen Kinder unter fünf Jahren die Hauptrisikogruppe für Malariamorbidity und -mortalität dar. Ursache hierfür ist das bei Kindern dieser Altersgruppe noch nicht ausreichend gegen Malaria geschulte Immunsystem. Kinder entwickeln im Laufe der ersten Lebensjahre in solchen Regionen eine Immunität gegen den regionalen Parasitenpool und sind damit ab einem bestimmten Alter gegen schwere Erkrankungsformen geschützt. Die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes gegen die Malaria gestaltet sich als schwieriger als vor 40 Jahren noch angenommen [4]. Folglich stehen heutzutage weiterhin die Kontrolle des Vektors und Therapie der Erkrankten im Vordergrund. Die Ausrottung von Malaria mit Hilfe ausgedehnter Anwendung von Insektiziden (Dichlordiphenyltrichlorethan, DDT) und Chloroquin (CQ) im Rahmen eines Malaria Eradikationsprogrammes, das von 1955 bis 1970 durchgeführt wurde, gelang vor allem in den Ländern der gemäßigten Klimazonen und auf Inseln, aber nicht in den kontinentalen Bereichen der Tropen [5]. Bis heute ist das Ziel einer Eliminierung der Malaria unter den für die *Anopheles* klimatisch optimalen Bedingungen der kontinentalen Tropen sowie aufgrund der schwachen Infrastruktur in weiten Teilen Afrikas schwer vorstellbar.

Seit Ende des zweiten Weltkrieges konnte Malaria effizient und kostengünstig durch CQ, welches bald weltweit als Mittel der ersten Wahl angewendet wurde, therapiert werden. Im Laufe der Jahrzehnte entwickelten die Parasiten jedoch hohe Resistenzraten [6], so dass sich spätestens Ende der neunziger Jahre die Frage der Therapieoptimierung stellte. Die Herausforderung hierbei war, Medikamente zu wählen, welche wirksam, verträglich und kostengünstig sind sowie eine schnelle Entwicklung von Resistenzen weitestgehend verhindern.

In der Region von Tamale, Nord-Ghana, wurde im Jahr 2000 bei ca. 30 % der mit CQ behandelten Kinder mit Malaria ein Therapieversagen beobachtet [7]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, für diese Region Therapieregime zu überprüfen, welche CQ als Mittel erster Wahl zur Therapie der unkomplizierten Malaria ersetzen können. Dazu wurden in vorliegender Studie Sulphadoxin-Pyrimethamin (SP) allein und jeweils in Kombination mit Amodiaquin (AQ) und Artesunat (AS) in ihrer Wirksamkeit bei der Behandlung von Kindern mit unkomplizierter Malaria verglichen.

## 1.1 Epidemiologie der Malaria

Bis zum 20. Jahrhundert war die Malaria bis nach Nordeuropa, Nordamerika und Russland verbreitet. Bis heute konnte sie in den Regionen gemäßigterer Klimazonen durch Bekämpfung der jeweils verantwortlichen weiblichen *Anopheles* mittels Insektiziden und CQ ausgerottet werden. In Indien, China und dem Mittleren Osten haben die Fallzahlen stark abgenommen, so dass sich das Vorkommen heutzutage vor allem auf die tropischen Regionen Afrikas, Südamerikas und Asiens konzentriert [5]. Eine wesentliche Rolle bei der Verbreitung der Malaria spielen soziale und ökonomische Faktoren. So fehlen in armen Regionen mit niedriger Bildungsrate Mittel und Wissen, mit dieser Erkrankung umzugehen. In den nordafrikanischen Ländern haben die Verbesserung der allgemeinen Hygiene und des öffentlichen Gesundheitswesens mit konsekutiver Aufklärung der Bevölkerung zur Prävention von Mückenstichen, die Trockenlegung von Sümpfen, die Beseitigung von offenen Abwassergräben und anderen Moskito-Brutstätten sowie die Möglichkeit schneller, eindeutiger Malariadiagnostik und effizienter, kontrollierter Therapie, zur Verminderung der Transmissionsraten geführt. Solche Maßnahmen versprechen in hypo- bis mesoendemischen Regionen mehr Erfolg als in tropischen, hochendemischen Regionen, spielen jedoch auch dort eine wichtige Rolle zur effektiven Malariakontrolle [5, 8, 9, 10]. Die Etablierung von Malariakontrollprogrammen wird durch

internationale Hilfsorganisationen gefördert. Aktuell stehen die medikamentöse Behandlung sowie die Vektorkontrolle mit Hilfe von Insektizid-imprägnierten Moskitonetzen und die Anwendung von Insektensprays in den Häusern im südlich der Sahara gelegenen Afrika im Vordergrund.

Schätzungsweise über eine Millionen Tote fordert diese Erkrankung jährlich weltweit, davon sind in hochendemischen Regionen in Afrika südlich der Sahara in über 75 % der Fälle Kinder unter fünf Jahren betroffen [11, 12]. Die Dunkelziffer der an Malaria erkrankten Kinder ist vermutlich hoch. Diagnostische Möglichkeiten und das Erreichen von Gesundheitsinstitutionen sind in ländlichen Gebieten Afrikas weiterhin sehr eingeschränkt. Schätzungsweise kommen nur 20 % der erkrankten Kinder in Kontakt mit Gesundheitseinrichtungen, die weiteren 80 % kurieren und therapieren ihre febrile Erkrankung zu Hause [8].

Mit etwa 200 Malariaerkrankungen pro 1000 Einwohner/Jahr (2006) gilt Ghana als Hochendemiegebiet für Malaria. Eine epidemiologische Studie zweier ökologisch verschiedener Gebiete in Südghana zeigte jeweils eine ganzjährige Übertragung von Malaria, mit jedoch einer höheren Malariaprävalenz im Waldgebiet (51 %) als im Küstensavannengebiet (37 %) [13]. Die Region Nordghanas ist mit bis zu 100 Malariafällen pro 1000 Einwohner pro Jahr ebenfalls hochendemisch, aber etwas weniger betroffen als die südlichen Regionen und der äusserste Norden an der Grenze zu Burkina Faso [14]. Von einer 2006 geschätzten Bevölkerungszahl von 23 Mio, darunter 3,2 Mio Kinder unter fünf Jahren, erkrankten im Jahr 2006 7,3 Millionen Ghanaer an Malaria, 3,9 Millionen Episoden betrafen Kinder unter fünf Jahren. 75 bis 100 % der Infektionen werden durch *P. falciparum* verursacht. Infektionen mit *P. ovale* und *P. malariae* machen den restlichen Anteil aus. In der Praxis wurden im Jahr 2006 nur etwa 15 - 20 % der klinisch geschätzten Malariafälle labordiagnostisch als *P. falciparum*-Malaria bestätigt, was die eingeschränkten Mittel für eine zuverlässige Malaradiagnostik widerspiegelt. Betrachtet man die von der WHO berichteten Malariafälle von 1990 bis 2007, läßt sich mit 1,4 Mio Fällen im Jahr 1990 und 3,5 Mio Fällen im Jahr 2007 eine kontinuierliche Steigerung der Malariainzidenz beobachten. Eine Verminderung der Todesfälle konnte in den letzten zehn Jahren nicht beobachtet werden. 2006 starben im Mittel 6,6 von 1000 Kindern (obere Grenze 3,4/1000, untere Grenze 10/1000) an Malaria [14].



## 1.2 Entwicklungszyklus der Plasmodien

Der Erreger der Malaria ist ein Protozoon der Gattung *Plasmodium*, von dem vier rein humanpathogene Spezies existieren: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Ein fünfter Erreger, *P. knowlesi*, befällt selten Menschen und häufiger andere Primaten. Ihr Entwicklungszyklus wird in drei Phasen eingeteilt: die asexuelle prä-erythrozytäre Phase in der Leber (Gewebschizogonie) und die asexuelle, erythrozytäre Phase im Blutkreislauf des Menschen (erythrozytäre Schizogonie), sowie die sexuelle Phase in der Mücke der Gattung *Anopheles*, Sporogonie genannt.

### Prä-erythrozytäre Phase (Gewebschizogonie)

Bei der Infektion inokuliert die weibliche *Anopheles* durch ihren Stich 8-15, manchmal auch bis zu 100 Sporozoiten aus ihrer Speicheldrüse in die menschliche Blutbahn oder ins menschliche Lymphsystem [15]. Auf diesem Weg gelangen die Sporozoiten in die Leber, wo sie sich in Hepatozyten einschleusen. Innerhalb von 45 min sind alle Sporozoiten entweder in Hepatozyten eingeschleust, oder vom Immunsystem beseitigt. In den Hepatozyten findet die erste asexuelle Teilung statt, die sogenannte Gewebsschizogonie, welche mit der Freisetzung von tausenden Merozoiten in die Blutbahn endet. Die Dauer der Gewebsschizogonie ist speziesabhängig und dauert etwa sechs bis sechzehn Tage. Im Falle einer Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* können sogenannte Hypnozoiten, parasitäre Ruheformen, in der Leber verbleiben und Wochen bis Monate später zu einer symptomatischen Malaria führen [16].

### Erythrozytäre Phase (erythrozytäre Schizogonie)

Die nun in die Blutbahn entlassenen Merozoiten befallen Erythrozyten, in denen sie einen Reifungs- und Teilungsprozess von der Ringform über den Trophozoiten zum Schizonten durchmachen. Bei *P. falciparum* kann ein reifer Schizont 4-16 Merozoiten enthalten. Diese zweite Phase der asexuellen Teilung wird erythrozytäre Schizogonie genannt. Reife Merozoiten gelangen nun erneut durch Platzen der Erythrozyten in den Blutkreislauf und befallen neue Erythrozyten. Es kommt zur exponentiellen Vermehrung der Parasiten [16]. Diese Phase ruft beim Menschen, in Abhängigkeit von ihrer Immunitätslage, Symptome hervor.

## Gametozyten

Im Laufe dieses Reifungs- und Vermehrungszyklus entwickeln sich einige Merozoiten binnen 10 - 12 Tagen zu männlichen und weiblichen Gametozyten, Mikro- und Makrogametozyten genannt. Ein Gametozyt hat eine mittlere Lebenszeit von zweieinhalb Tagen im peripheren Blut, eine Gametozytengeneration kann bis zu drei Wochen im Blut zirkulieren. Robert et al. konnten eine Korrelation zwischen der Gametozytendichte und der Infektivität für Mosquitos aufzeigen [17]. Durch welche Mechanismen und Signale die Gametozytogenese gesteuert wird, ist bis heute nicht geklärt. Man hat jedoch beobachtet, dass das Ausmaß der Gametozytogenese dem Einfluß des angewandten Malariamedikamentes, der parasitären Resistenzlage sowie dem Zeitpunkt unterliegt, zu dem die Behandlung nach Beginn der Symptome begonnen wurde [17].

## Sexuelle Phase (Sporogonie)

Gametozyten werden bei einem Stich durch die *Anopheles* über die Blutnahrung aufgenommen. Die sexuelle Phase, Sporogonie genannt, beginnt. Nur die weibliche *Anopheles* nimmt neben Nektar auch Blutmahlzeiten zu sich, da sie für die Produktion von Eiern mehr Proteine benötigt, ungleich der männlichen *Anopheles* [18]. Im Magen der *Anopheles* verschmelzen Mikro- und Makrogametozyt zur Oozyste und gelangen durch die Magenwand in die Speicheldrüse, wo sie sich zu Sporozoiten entwickeln und vermehren, welche bei einem nächsten Stich wieder in die Blutbahn des Menschen inokuliert werden. Der parasitäre Entwicklungszyklus ist geschlossen [16].

## 1.3 Klinik der Malaria tropica im Hochendemiegebiet

Die Malaria tritt in drei "klassischen" Krankheitsformen unterschiedlichen Charakters auf. Die Malaria tertiana wird durch eine Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* hervorgerufen, die Malaria quartana durch *P. malariae*. Beide Formen sind benignen Charakters. Die gefährlichste, potenziell letal endende Form ist die durch *P. falciparum* hervorgerufene Malaria tropica. In vorliegender Arbeit soll im Wesentlichen auf die Klinik und Eigenschaften der Malaria tropica eingegangen werden.

Die ersten Anzeichen einer Malaria tropica nach ca. einer Woche Inkubationszeit sind uncharakteristisch, ähnlich der Grippe-symptomatik und in ihrer Ausprägung abhängig von der spezifischen Immunitätslage des Infizierten. Leitsymptom der Malaria ist Fieber, hervorgerufen durch die Ausschüttung von Pyrogenen beim Platzen der Schizont-haltigen Erythrozyten. Durch die Hämolyse verursacht eine akute Malaria-Infektion immer auch Anämie, Thrombozytopenie, Splenomegalie und manchmal einen Ikterus, der i.d.R. nur leicht ausgeprägt ist. In endemischen Gebieten mit häufigen Re-Infektionen chronifizieren Splenomegalie und Anämie, letztere wird durch eine durch die Infektion induzierte Knochenmarkdepression noch verstärkt und kann lebensbedrohliche Ausmaße annehmen. Die prozentuale Häufigkeit einer Splenomegalie bei Kindern zwischen zwei und neun Jahren wird auch als Maß der Malaria-Endemizität in einer Region angewendet. Zusätzliche Symptome der Malaria sind eher unspezifischen Charakters wie Unlust, Lethargie, Kopfschmerzen, Durchfall, Husten. Sie dominieren bei der Vorstellung des Patienten zusammen mit Fieber und erschweren die klinische Diagnose der Malaria erheblich [16, 18].

Die Ausprägung der klinischen Malaria ist abhängig vom Immunstatus des Infizierten. In Hochendemiegebieten ist die Malaria im Wesentlichen eine Erkrankung des Kindesalters (s. Kapitel "Immunität,,"). Kinder von sechs Monaten bis etwa fünf Jahre sind am meisten den Gefahren einer Malaria tropica mit dessen möglichen Komplikationen ausgeliefert. So entwickeln Kinder nicht selten eine schwere Malaria. Nach WHO liegt eine schwere Malaria vor, wenn mindestens eines der in Tabelle 1.1 definierenden Zeichen auftritt [19, 20]:

<b>Definierende Zeichen</b>	<b>Laborzeichen</b>
Schwere Anämie (<5 g/dl)	Hypoglykämie
Erschöpfung	Azidose
Bewusstseinstörung	Nierenversagen
Tachypnoe (Kußmaulatmung)	Hyperlaktatämie
Multiple Konvulsionen	Hyperparasitämie (>200 000 Parasiten/ $\mu$ L)
Kreislaufkollaps	
(Radiologisches) Lungenödem	
Blutungszeichen	
Ikterus	
Haemoglobinurie	

Tabelle 1.1: **Klassifikation schwere Malaria**

Die zerebrale Malaria ist mit 80 % die häufigste direkt durch Malaria verursachte Todesursache im Rahmen einer Infektion mit *P. falciparum*. Sie kommt vor allem bei Kindern vor. Die genaue Pathogenese ist bislang nicht geklärt. Sie ist definiert durch Parasitämie, Bewusstseinsintrübung (Glasgow Koma Skala  $\leq 8$ ), persistierendes Koma nach Ausgleich der metabolischen Störungen, und Krampfanfälle, die keine andere Ursache haben [18, 20].

Durch wiederholte Infektionen mit *P. falciparum*, bzw. durch wiederholtes Therapieversagen, kommt es in Hochendemiegebieten zu chronischen, häufig schweren Anämien, an die sich die Kinder erstaunlich gut adaptieren. Diese mittlerweile häufigste Manifestationsform der schweren Malaria im Kindesalter kann jedoch, zusätzlich zu Mangelernährung, anderen chronisch-rezidivierenden parasitären Erkrankungen wie z.B. Wurmbesiedlungen oder HIV, die Kinder schwächen und zu Entwicklungsstörungen oder zum Tod führen. Als Folge vermehrter Transfusionen konnte eine steigende Inzidenz von HIV-Infektionen beobachtet werden [21]. Diese Zusammenhänge veranschaulichen die Rolle der Malaria im Teufelskreis der Armut im südlich der Sahara gelegenen Afrika.

## 1.4 Immunität

Die klinische Ausprägung der Malaria tropica unterliegt, wie bereits kurz geschildert, multifaktoriellen Einflüssen. Neugeborene erkranken selten. Sie sind durch von der Mutter plazentär übertragene Antikörper, durch einen Mangel an Para-Aminobenzoesäure in der Muttermilch sowie durch den postpartal hohen Anteil an fetalem Hämoglobin, welches von den Parasiten nicht gespalten wird, geschützt [22]. Mit steigendem Lebensalter und damit Abfallen des fetalen Hämoglobins und der maternalen Antikörper nimmt die Inzidenz der Malaria tropica bei den Säuglingen zu. Ab einem Alter von etwa drei Monaten ist eine steigende Inzidenz für hohe Parasitendichten, niedrige Hämoglobinwerte und Fieber zu beobachten [23]. Je nach Endemiegebiet liegen die Morbiditäts- und Mortalitätsgipfel zwischen dem zweiten und zehnten Lebensjahr [24].

Die Immunmechanismen, die durch eine Infektion mit *P. falciparum* in Gang gesetzt werden, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Man unterscheidet zwei Wege, die der Mensch unter ständiger Exposition mit *P. falciparum* als Abwehrmechanismen entwickelt und die ihn vor der klinischen Ausprägung einer Malaria schützen: Teil-Immunität und Prämunitation.

In hyperendemischen Regionen, wie zum Beispiel in der Region um Tamale in Nordghana, erleiden insbesondere Kleinkinder wiederholte Episoden klinisch relevanter Malaria. Bei Schulkindern sind vor allem chronische Parasitämien mit niedrigen Parasitendichten zu beobachten, die in der Regel ohne klinische Symptome vorstatten gehen [25]. Ursache hierfür ist die Entwicklung einer Teil-Immunität unter wiederholter bzw. chronischer Parasitenexposition. Hierbei spielen spezifische Zell- und humoral vermittelte sowie unspezifische Immunmechanismen eine Rolle. Hierunter entwickeln Kinder, sofern sie die jeweiligen Infektionen überleben, mit den Jahren eine immer ausgeprägtere Immunkompetenz gegenüber dem regionalen Pool an Parasitenstämmen. Ein Problem für die Ausbildung einer vollständig vor Malaria schützenden Immunität stellt die Diversität der Parasiten dar. Das Reservoir der Parasitenstämme innerhalb einer Region kann zwischen den Jahreszeiten variieren. Das neue Reservoir kann damit der gerade erworbenen, spezifischen Immunität entkommen. Aus diesem Grund wird nur von einer Teilimmunität gesprochen.

Smith et al. stellten jedoch fest, dass die Infektion mit einem neuen Stamm von den Immunmechanismen, die durch eine ältere oder noch bestehende Infektion in Gang gesetzt worden sind, beeinflusst wird [26]. Man geht demnach von einer teilweisen Kreuzreaktivität der vorher ausgebildeten Immunität aus. Zudem konnte man eine Korrelation zwischen antiparasitärer Kontrolle und der Antigenverwandtschaft der neuen und vorbestehenden Stämme beobachten. Die neuinfizierenden Parasitenstämme werden durch diese aktive, wenn auch für sie unspezifische, aber kreuzreaktive Immunreaktion gehemmt, und auf diese Art und Weise kontrolliert. Durch diese Mechanismen wird die klinische Ausprägung einer Malaria verhindert, eine chronische, niedrige Parasitämie jedoch erhalten. Dieses Phänomen wurde mit dem Begriff der Prämunition bezeichnet [26, 27, 28, 29, 30].

## 1.5 Diversität von *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* exprimiert spezifische Antigene auf seiner Oberfläche, dazu gehören unter anderem MSP1 und 2 (engl. merozoite surface protein 1 und 2). Diese unterliegen einer hohen Diversität, was eine Herausforderung an das menschliche Immunsystem darstellt und zudem die Ursache für die Schwierigkeit der Entwicklung eines Impfstoffes ist. In den 80er Jahren konnten Tanabe et al. das Gen für MSP1 auf Chromosom 9 lokalisieren [31]. Das für MSP2 kodierende Gen wurde auf Chromosom 7 lokalisiert [32]. Die jeweiligen Genabschnitte *msp1*

und *msp2* besitzen polymorphe Regionen, die von stabilen bzw. semistabilen Abschnitten flankiert werden. Die stabilen Abschnitte variieren innerhalb von *msp1* und *msp2* und lassen sich in durch ihre Nukleotidsequenz definierte, verschiedene Allelfamilien unterteilen: MAD20, Ro33 und K1 für *msp1* sowie ID und FC27 für *msp2*. Die polymorphen Regionen in den jeweiligen Allelfamilien variieren noch zusätzlich in ihrer Nukleotidsequenz und lassen sich durch ihre unterschiedlichen Basenpaarlängen voneinander unterscheiden. Sie verursachen als variable, zu einer der Allelfamilien zugehörige Allele zusätzlich eine hohe genetische Diversität. In epidemiologischen Studien konnten bis zu 30 verschiedene Allele einer Allelfamilie von *msp1* und bis zu 47 Allele der Allelfamilien von *msp2* unterschieden werden [33, 34].

Da die Parasiten einen haploiden Chromosomensatz besitzen, repräsentieren die in einer Blutprobe detektierten Allele die jeweilig in einem Patienten vorhandenen Parasitenstämme. Diese Tatsache wurde in der vorliegenden Studie dazu genutzt, die Allele, welche nach Therapieversagen bei einem Patienten detektiert werden konnten, mit den Allelen der vor Therapie vorhandenen Stämme zu vergleichen. Auf diese Weise ist es möglich, eine Neuinfektion mit anderen Parasitenstämmen durch einen erneuten Mückenstich von einer Rekrudescenz durch einen der ursprünglich für die Infektion verantwortlichen Parasitenstämme zu unterscheiden. Dies ermöglicht die Unterscheidung echter Therapieversager von Neuinfektionen. Nur auf diese Art und Weise ist es, besonders in holoendemischen Regionen, in denen die Diversität der Parasiten und die Transmissionsraten hoch sind, möglich, die Effektivität eines Therapieregimes zu eruieren. Ohne die Differenzierung zwischen Neuinfektionen und Rekrudescenzen wäre der Anteil an Therapieversagern unecht höher [20].

## 1.6 Therapie der Malaria

Chinin wird seit 350 Jahren zur Behandlung von fieberhaften Erkrankungen angewandt, lange bevor Malaria als parasitäre Erkrankung bekannt war. Ebenso wird Artemisinin seit Jahrhunderten in China als pflanzliches Mittel gegen fieberhafte Erkrankungen angewandt. Erst durch die beiden Weltkriege bekam die synthetische Entwicklung von Malariamedikamenten einen Schub. So wurde 1934 Chloroquin (CQ) synthetisiert, nachdem während des ersten Weltkrieges in tropischen Gebieten mehr Soldaten an Malaria gestorben waren als durch Waffeneinwirkung. Dieses galt zunächst als zu toxisch, um seine Anwendung während

des zweiten Weltkrieges zu finden, und erlangte erst in den 50er Jahren seine Bedeutung in der Therapie der Malaria, die bis vor wenigen Jahren in großen Teilen Afrikas anhielt [21].

### 1.6.1 Chloroquin

CQ gehört in die Gruppe der 4-Aminochinoline. Der genaue Wirkmechanismus dieser Aminochinoline im Parasiten ist bis heute nicht geklärt. Bislang erklärte man sich seine Wirkung in der Interaktion mit dem Abbau von Hämoglobin im Parasiten. CQ sammelt sich in hoher Konzentration im sauren Milieu der parasitären Nahrungsvakuole an, die es aufgrund seiner positiven Ladung nicht mehr zu verlassen vermag. Dort bildet es einen Komplex mit dem parasitenschädlichen Häm-Abbauprodukt Ferriprotoporphyrin-IX, wodurch dieses nicht mehr zum verträglichen Hämozoïn polymerisiert werden kann, der Parasit geht zugrunde. Auf welche Art und Weise nichtpolymerisierte Ferriprotoporphyrin-IX-Moleküle den Parasiten schädigen, ist abschließend nicht geklärt [35].

CQ zeichnete sich am Anfang seiner Ära durch eine gute Wirksamkeit gegen Plasmodien aus. Es gilt als gut verträglich und kann auch von schwangeren Frauen und Kindern eingenommen werden. Seine unangenehmste, aber harmlose Nebenwirkung ist ein penetranter Juckreiz, der bei Schwarzafricanern häufig ist [36, 37]. Schwerwiegende Nebenwirkungen treten nur nach sehr hohen Dosen oder langjähriger Anwendung unter Kumulativdosen von etwa 100 g auf. Hierzu sind irreversible Schäden von Retina und Sehnerven beschrieben [38]. CQ werden antiinflammatorische und antipyretische Eigenschaften zugeschrieben.

### Chloroquinresistenz

Die ersten CQ-Resistenzen in Afrika wurden erstmals 1978 in Kenia, und 1986 in Ghana [39] beobachtet. Bis 1988 waren alle tropischen Länder Afrikas betroffen [21]. Durch eine Punktmutation im *P. falciparum* CQ-Resistenz-Transporter-Gen (*pfcr1*) wird der Parasit dazu befähigt, CQ aus der Nahrungsvakuole wieder herauszuschleusen, woraufhin Hämoglobin wieder ordnungsgemäß abgebaut werden kann [40, 41]. In einigen Regionen mit bestehender CQ-Resistenz hat man die Wiederkehr von CQ-Sensibilität nach Abkehr von diesem Medikament beobachten können [42]. Dies impliziert eine verminderte Überlebenschance der die *pfcr1*-Mutation tragenden Parasiten. Man hat ein weiteres Gen identifiziert, dessen Mutationen mit CQ-Resistenz assoziiert sind, *pfmdr1* (engl.: multi drug resistance - multiple

Medikamentenresistenz). Liegt die *pfmdr1*-Sequenz im Parasiten in hoher Amplifikation vor, führt dies zu Resistenzen gegen Mefloquin (MQ), Chinin und Halofantrin [43, 44].

Das Fehlen diagnostischer Möglichkeiten und medizinischer Fachleute in ländlichen Gebieten Afrikas, wie auch in der Region um Tamale, haben dazu geführt, Fieber ohne diagnostische Abklärung routinemäßig mit CQ zu behandeln. Dazu kommt, dass CQ häufig zur Selbsttherapie in den Haushalten vorrätig ist. Dies konnten auch Abuako et al. 2004 für eine Region in Nordghana bestätigen [45]. Falsche Dosierung, unangemessene Verabreichung des Medikamentes, mangelnde Therapietreue aufgrund frühzeitigen Absetzens bei rascher klinischer Besserung sowie eine Halbwertszeit von drei Wochen führen häufig bis regelhaft zu chronischen CQ-Spiegeln im Blut von afrikanischen Kindern, die jedoch meist unter der therapeutischen Schwelle liegen [46, 47, 48]. Dadurch entstehen optimale Bedingungen zur Selektion resistenter Parasitenstämme [49, 50].

Noch im Jahr 2000 war CQ in den meisten afrikanischen Ländern das Mittel der ersten Wahl zur Therapie der unkomplizierten Malaria [21]. Ehrhardt *et al.* untersuchten im Jahr 2000 in Tamale im Rahmen einer Therapiestudie bei Kindern im Alter von unter 5 Jahren die Resistenzlage gegen CQ. Sie fanden in 57 % der Fälle ein parasitologisches Therapieversagen und in 29% ein klinisches Therapieversagen nach 14tägiger Verlaufskontrolle der Patienten [7]. In einer weiteren Untersuchung konnten sie eine positive Korrelation der CQ-Resistenzmarker *pfcr1* und *pfmdr1* mit steigenden CQ-Spiegeln im Blut zeigen, und werteten dies als Zeichen stattgehabter Selektion resistenter Parasitenstämme [48].

## 1.6.2 Alternative Malariamedikamente

### Sulphadoxin-Pyrimethamin

Sulphadoxin und Pyrimethamin wirken hemmend auf die Dihydropterinsäuresynthase (DHPS) bzw. auf die Dihydrofolsäurereduktase (DHFR) und greifen damit in die parasitäre Folsäuresynthese ein. Menschen sind nicht in der Lage, Folsäure selber zu synthetisieren, sondern müssen diese mit der Nahrung aufnehmen. Da die Dihydropterinsäuresynthase beim Menschen nicht vorhanden und die parasitäre Dihydrofolsäurereduktase in ihrer Struktur der des Menschen weitestgehend ungleich ist, können diese Medikamente gegen die Malaria eingesetzt werden, ohne wesentlich in den menschlichen Folsäurezyklus einzugreifen. Die Elimina-



tionshalbwertszeit von Sulphadoxin liegt bei sieben bis neun Tagen, die von Pyrimethamin bei zwei bis vier Tagen [35]. Sulphadoxin-Pyrimethamin (SP) ist relativ nebenwirkungsarm. Unter Langzeitprophylaxe wie unter intensiver Therapie sind jedoch Fälle toxischer Epidermolyse und schwerer Agranulozytose aufgetreten [51]. Aus diesem Grund ist das Medikament in den meisten Industrieländern vom Markt genommen worden. SP ist nur oral applizierbar.

### **Sulphadoxin-Pyrimethamin Resistenz**

Durch mehrere Mutationen im *dhps*-Gen kann im Parasiten die Wirkung von Sulphonamiden abgeschwächt werden. Je nach Anzahl und Austausch bestimmter Aminosäuren wird eine zur Bindung des Sulphonamids an die Dihydropteroidsäuresynthase notwendige Wasserstoffbrückenbindung aufgehoben. Durch mehrere Punktmutationen wird die Bindefähigkeit von Sulphadoxin an die Bindestelle des Enzymes zunehmend erschwert und damit die Sensibilität des Parasiten auf Sulphonamide schrittweise reduziert [52, 53, 54].

Ähnlich wie bei Sulphadoxin ist bei Pyrimethamin die schrittweise Anhäufung von Punktmutationen im *dhfr*-Gen Ursache für eine zunehmende Resistenz gegen dieses Medikament. Die wichtigste Mutation bewirkt einen Austausch von Serin in Position 108 gegen Asparagin, was zu einer derartigen Umstrukturierung des Enzymes führt, dass die Affinität von Pyrimethamin zu DHFR um das 10-fache fällt. So bewirkt die Dreifachmutante S108N, N51I und C59R eine 100-mal stärkere, und die Vierfachmutante S108N, N51I, C59R und I164L eine 500-mal stärkere Resistenz gegen Pyrimethamin als bei Wildtypen ohne *dhfr*-Mutation. Das Medikament wird folglich unwirksam [55, 56, 57].

Nach Analysen der das *dhfr*-Gen flankierenden Regionen ist deutlich geworden, dass zufällige Mutationen, die zur Resistenzbildung führen, ein eher seltenes Ereignis sind. Stattdessen hat sich anscheinend ein einzelner Parasitenstamm mit der o.g. Triple-Mutation an Position 51, 59 und 108 in den letzten 20 Jahren von Asien nach Afrika verbreitet. So konnte derselbe mutierte Haplotyp, der bereits in Asien sehr häufig mit Therapieversagen unter SP in Zusammenhang gebracht worden war, in einigen Ländern Afrikas gesehen werden [58, 59, 60, 61]. Schließlich zeigten Maiga *et al.*, dass 85 % der resistenten *P. falciparum*-Stämme in 11 verschiedenen afrikanischen Ländern südlich der Sahara denselben mutierten *dhfr*-Haplotypen tragen [62]. Diese Fähigkeit eines resistenten Parasitenstammes, sich so rasant zu verbreiten wird u.a. auf die gesteigerte Gametozytogenese zurückgeführt, die mit SP-Resistenz assozi-

iert ist [63]. Der relative Transmissionsvorteil und der hohe Selektionsdruck durch die häufige Anwendung von SP in Regionen mit bestehender Resistenz mögen die Schlüsselmerkmale für die schnelle Resistenzausbreitung gegen SP sein [49].

## **Amodiaquin**

Amodiaquin (AQ) gehört wie Chloroquin zu den 4-Aminochinolinen. Die Möglichkeit einer Kreuzresistenz zwischen CQ und AQ ist bekannt [20, 64], aber nicht zwingend und dementsprechend regional unterschiedlich. Man vermutet eine verminderte Affinität zum CQ-Resistenz-Transporter aufgrund einer aromatischen Seitenkette [65, 66]. Resistenzen sind auch in Regionen beobachtet worden, in denen AQ als Monotherapie bislang noch nicht in Anwendung gewesen ist [67].

Die Eliminationshalbwertszeit von AQ bzw. seines in der Leber entstehenden, antiparasitär wirksamen Metaboliten Mono-Desethyl-Amodiaquin liegt bei 10-14 Tagen [20, 68]. Abbauprodukte dieses Metaboliten können leber- bzw. das Blutbild schädigend wirken. So hat man nach längerdauernder Anwendung von AQ im Rahmen der Malariaphylaxe bei Reisenden als Nebenwirkung schwere Leberschäden (bei einer Anwendung über drei Wochen bis zehn Monate) mit einer Inzidenz von 1:15500 sowie lebensbedrohliche Agranulozytosen (bei einer Anwendung über fünf bis 14 Wochen) mit einer Inzidenz von 1:2100 beobachtet [66, 69, 70]. Aus diesem Grund ist AQ in den Industrieländern vom Markt genommen und von der WHO im Jahr 1990 nicht mehr zur Therapie der Malaria empfohlen worden. Olliaro *et al.* berichteten jedoch 1996 nach einer Untersuchung von 40 Studien zu AQ im Vergleich zu CQ oder SP von dessen guter Verträglichkeit, welche sich bzgl. des Risikos für schwerwiegende Nebenwirkungen von dem unter Therapie mit SP nicht wesentlich unterscheidet, vorausgesetzt es wird nur zur Akuttherapie eingesetzt. Einzelne Fälle mit Agranulozytose oder Hepatitis sind in hochendemischen Gebieten, in denen aufgrund hoher Inzidenzraten die Häufigkeit der Malariatherapie eine Prophylaxe imitiert, beobachtet worden. Das Risikoprofil übersteigt jedoch nicht das von SP [65]. Ansonsten ist AQ weniger bitter im Geschmack und wird demnach von Kindern besser toleriert, zudem scheint es weniger zu Ekzemen und Pruritus zu führen als CQ. Weiterhin vorteilhaft ist die antiinflammatorische und antipyretische Wirkung, die den Aminochinolinen zu eigen ist. AQ ist nach CQ das kostengünstigste Malariamedikament weltweit [65]. AQ ist nur oral applizierbar.

## Artesunat

Artesunat (AS) gehört zur Gruppe der Artemisinine. Es entspringt einem Extrakt des einjährigen Beifußes *Artemisia annua* und ist in China seit etwa 2000 Jahren gegen febrile Erkrankungen in Anwendung. 1971 wurde der aktive Inhaltsstoff Artemisinin isoliert und ist seit 1972 gezielt als Medikament gegen Malaria in Anwendung [18, 71]. Aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften von Artemisinin in Fett oder in Wasser werden heutzutage nur semisynthetische Artemisininderivate verwendet, wie z.B. AS. Eine hochgradige antiparasitäre Wirksamkeit ist für Artemisinine nachgewiesen. Sie reduzieren die Parasitenlast um den Faktor  $10^4$  pro asexuellem Zyklus und richten sich vorwiegend gegen die frühen und späten Ringstadien [72, 73]. Zudem hemmen sie die Entwicklung von Gametozyten im Parasiten und vermindern somit die Gametozytenprävalenz und -dichte während und nach einer erfolgten Infektion [74, 75]. Dies führt zu einer herabgesetzten Infektivität der Patienten unter und nach erfolgter Therapie, und führt folglich v.a. in Regionen mit niedrigen oder stark saisonalen Transmissionsrate zu einer Reduktion der Übertragungsraten [18, 19, 74]. Die Eliminationshalbwertszeit von Artemisinenen ist mit 20 bis 30 Minuten sehr kurz [35].

Bislang zeigten sich Artemisinine erstaunlich nebenwirkungsarm. Im Tierversuch wurden Neuro- und Fetotoxizität nachgewiesen [76, 77, 78, 79]. Neurotoxizität sind beim Menschen trotz breiter Anwendung bislang nur in Mosambik beobachtet worden. Hier konnten Toovey *et al.* 2004 einen Zusammenhang zwischen Hörverlust und der Applikation von Artemether-Lumefantrin (ALT), zeigen [80]. Diese konnten anderswo bislang nicht verifiziert werden. Bzgl. der Fetotoxizität liegen nicht ausreichend Daten vor. Zufällige Applikation im ersten Trimenon haben bislang keine Folgen gezeigt [81]. Da bzgl der Fetotoxizität unter AS nicht genug Daten vorliegen, ist man mit einer Anwendung im ersten Trimenon einer Schwangerschaft weiterhin zurückhaltend.

Der genaue Wirkmechanismus der Artemisinine ist im Einzelnen noch nicht aufgeschlüsselt. Zwei Theorien stehen zur Zeit zur Debatte, die jedoch hier nicht diskutiert werden sollen [82, 83, 84, 85, 86, 87].

Bis 2008 waren trotz breiter Anwendung v.a. in Südastien noch keine Resistenzen gegen Artemisinine beobachtet worden. 2005 wurde in Französisch Guyana erstmals eine reduzierte *in vitro* Sensibilität gegen Artemether beschrieben [88]. An der thailändisch-kambodschanischen Grenze sind 2009 nun Zeichen für Resistenzen gegen Artemisinine aufgezeigt worden, die sich

im Wesentlichen in einer verlangsamten Parasitenbeseitigung ausdrücken und zu vermehrten Rekrudescenzen unter AS-Monotherapie führen [89].

Artesunate ist oral, intramuskulär, rektal und intravenös applizierbar.

## 1.7 Resistenzmechanismen und Medikamentenkombinationen

Zahlreiche Faktoren nehmen Einfluß auf die Entwicklung von Resistenzen [49, 90]: Die intrinsische Häufigkeit, mit der Mutationen im Parasiten auftauchen; der damit einhergehende Resistenzgrad (pharmakodynamische Faktoren); und der Anteil der übertragbaren Infektionen, die mit dem Medikament in Berührung kommen (zugrundeliegende Transmissionsraten, pharmakokinetische Faktoren, Verhaltensmuster in Bezug auf Medikamentennutzung, Immunitätsprofile in der Bevölkerung).

Subtherapeutische Medikamentenkonzentrationen können eine Selektion resistenter Parasitenstämme zur Folge haben. Sie beseitigen die meisten der sensiblen Stämme, ihre konzentrationsabhängige Wirkung reicht aber für die Beseitigung der resistenten Stämme nicht mehr aus. Patienten mit hohen Parasitendichten, die aufgrund von schlechter Medikamentenqualität, schlechter Therapietreue und eventuell aufgrund von Erbrechen inadäquate Medikamentenwirkspiegel im Blut aufweisen sind eine wichtige Quelle für die Selektion resistenter Parasitenstämme [18]. Dies veranschaulicht, wie wichtig die angemessene Verschreibung qualitativ hochwertiger Medikamente sowie Therapietreue, nicht nur für eine erfolgreiche Therapie, sondern auch für die Reduktion von Resistenzentwicklung sind. Medikamente mit langen Halbwertszeiten, die im Verlauf unausweichlich subtherapeutische Blutkonzentrationen über einen längeren Zeitraum annehmen, als Medikamente mit kurzen Halbwertszeiten, wirken als selektiver Filter, der gerade noch dazu befähigt ist, sensible Parasiten zu beseitigen, resistente aber selektiert [91]. Bestes Beispiel ist z.B. CQ, das lange in subtherapeutischen Spiegeln im Blut verweilt und damit über Monate resistente Parasiten selektiert.

Die Anwendung von Kombinationstherapien zur Behandlung der unkomplizierten Malaria wird heutzutage empfohlen. Die Vorteile scheinen über den möglichen Nachteilen einer Kombinationstherapie, nämlich additive Nebenwirkungen, Einnahme von zwei Tabletten statt

einer, höheren Kosten, etc. zu überwiegen [92, 93] Durch die Kombination von mindestens zwei Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und folglich unterschiedlichen Angriffszielen auf die Parasiten kann die Ausbildung von Resistenzen gebremst werden [49, 94, 95]. Die Kombination von Medikamenten zur Eindämmung von Resistenzbildung hat sich in der Behandlung von Tuberkulose, HIV und Krebserkrankungen seit Jahren fest etabliert [18]. Mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Parasit Resistenzen gegen zwei unterschiedlich wirkende Medikamente gleichzeitig entwickelt wurde ausführlich untersucht und beschrieben [94]. Sie wird als sehr gering eingeschätzt. Sie steigt jedoch, wenn Einzelkomponenten der Medikamentenkombination im Umlauf sind. Unter diesen Umständen steigt die Gefahr der Selektion erneut. Dies veranschaulicht die Wichtigkeit einer möglichst breiten Abdeckung der jeweiligen Region mit dem gewählten Kombinationsmedikament.

Medikamentenkombinationen sind teurer als Monotherapien. Langfristig sind die Ersparnisse aufgrund von fallender Morbidität und Mortalität jedoch größer, vorausgesetzt die Kombinationstherapien werden richtig eingesetzt.

Ein Problem stellen unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften dar, wie z.B. bei den Artemisinin-kombinierten Medikamenten. Artemisinine sind nach vier Tagen nicht mehr im Blut nachweisbar. Nahezu jedes zur Zeit angewandte Partnermedikament, wie z.B. SP, Lumefantrin oder Amodiaquin, hat eine deutlich längere Eliminationshalbwertszeit und ist noch weitere Tage bis Wochen teilweise in subtherapeutischen Konzentrationen im Blut nachweisbar und wird den Parasiten quasi als Monotherapie präsentiert [18].

## 1.8 Entwicklungen in der Malaria-Politik bis 2000

Mit steigender CQ-Resistenz und konsekutiv steigender Kindermortalität in tropischen Gebieten stellte sich seit den 1990er Jahren die Frage nach der Einführung neuer, geeigneter Standardtherapien gegen die unkomplizierte Malaria in betroffenen Regionen. Malawi änderte 1993 als erstes der afrikanischen Länder seine Leitlinien und führte SP als Standardtherapeutikum gegen unkomplizierte Malaria ein. Dem Beispiel folgten bald Kenia und Tansania [21].

Bereits in den Neunziger Jahren wurde die Kombination von Medikamenten zur Bekämpfung von Malaria propagiert und diskutiert [93, 94, 96, 97, 98]. Zu dem Zeitpunkt lagen jedoch

kaum Daten über Wirksamkeit von kombinierten Malariamedikamenten, Potenzierung von Nebenwirkungen, geschweige denn Umsetzungsmöglichkeiten für südlich der Sahara gelegene Länder Afrikas vor. In Asien dagegen hatte in Regionen mit niedrigen Transmissionsraten die Resistenzentwicklung gegen CQ, SP und schließlich auch Mefloquin (MQ), einen rasanten Verlauf genommen [99]. Hier war bereits in den frühen neunziger Jahren die Kombinationstherapie von MQ und AS eingeführt worden und hatte eindrucksvolle Ergebnisse gezeigt [100], was zur Folge hatte, dass Experten die Einführung von Artemisinin-basierten Kombinationstherapien (ACT) auch in Afrika zu propagieren begannen [94, 101]. Eine Reihe von Organisationen, darunter die WHO, der Global Fund, und die Bill und Melinda Gates Stiftung, machten sich Ende der neunziger Jahre und Anfang dieses Jahrhunderts die Eindämmung bzw. sogar die Eradikation der Malaria zur Aufgabe. Nach 20jähriger Resignation begannen so die Industrienationen aufgrund von steigender malariaassoziiertes Kindermortalität ihr Augenmerk wieder verstärkt auf Afrika zu richten, was u.a. zahlreiche Studien nach sich zog, welche v.a. die Wirksamkeit verschiedener Medikamenten-Kombinationen gegen Malaria untersuchten (s. Kapitel Diskussion). So empfahl die WHO bereits 2001 die Einführung von ACT in allen Ländern Afrikas, in denen das Standardmalariamedikament eine Resistenzrate von 25 % überschritt, als neues Standardmedikament zu einführen [20].

## 1.9 Zielsetzung

Erhardt *et al.* konnten im Jahr 2000 zeigen, daß CQ zur Therapie der unkomplizierten Malaria bei Kindern in Tamale, Nordghana, nicht mehr adäquat ist [7]. Zur Wirksamkeit anderer Medikamente gab es zum Zeitpunkt der Studiendurchführung für Ghana noch keine Daten. Ziel der vorliegenden Studie ist die Überprüfung alternativer Therapieregime gegen unkomplizierte Malaria in der hauptsächlich betroffenen Bevölkerungsgruppe, nämlich bei Kindern unter fünf Jahren.

Primärer Endpunkt ist die PCR-korrigierte Wirksamkeit von Sulphadoxin-Pyrimethamin allein, sowie jeweils in Kombination mit Amodiaquin und Artesunat, gemessen an den Heilungsraten bzw. an den parasitologischen und klinischen Therapieversagerraten nach 28 Tagen Verlaufskontrolle. Sekundäre Endpunkte sind die vergleichende Untersuchung klinischer und laborchemischer Aspekte, nämlich der Parasiten- und Fieberbeseitigung sowie der Hämoglobin-Entwicklung, unter Therapie.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

Die Studie fand von August bis Dezember 2002 zum Ende der Regenzeit in der Nördlichen Region Ghanas statt. Sie war eine Kooperationsstudie zwischen dem Institut für Tropenmedizin Berlin, Charité, der University of Development Studies, Tamale und dem Gesundheitsministerium, Northern Region, Tamale, gefördert durch die WHO (EPH/CSR, MSO 181-9). Sie wurde von dem Gesundheitsministerium der Northern Region, Tamale, dem Bereich für Gesundheit und Forschung des Nationalen Ghanaischen Gesundheitsministeriums, Accra (Health Research Unit) und dem zuständigen Ethikkomitee der WHO (Secretariat Committee on Research Involving Human Subjects) in Genf geprüft und genehmigt. Diese Voten wurden dem Ethikkomitee der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Kenntnis gebracht.

Die Verfasserin dieser Arbeit war in Tamale gemeinsam mit einem weiteren Doktoranden für den Ablauf und die Organisation der Studie, die mikroskopische Diagnostik und die Supervision und Durchführung der Laborarbeiten verantwortlich.

Im Labor des Berliner Institutes für Tropenmedizin wurden ergänzende Laborarbeiten durchgeführt. Die Verfasserin führte die DNA-Extraktionen, die Typisierungen von *m*sp1 und *m*sp2, die Gelelektrophorese und deren Interpretation durch, und beteiligte sich an der Datenanalyse.

Die PCR-Arbeiten zur Detektion von Mischinfektion wurden freundlicherweise vom Institut für Tropenmedizin, Charité, zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Gametozytenauszählung wurden freundlicherweise von Dr. Teun Bousema, Abteilung für Medizinische Mi-

krobiologie, Universitäres Medizinisches Zentrum St. Radboud, Nijmegen, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

## 2.1 Studiengebiet Ghana

Das Studiengebiet liegt in der im Norden Ghanas gelegenen Region „Northern Region“. Die Regenzeit beginnt im Mai und endet im Oktober, von November bis April ist Trockenzeit. Der durchschnittliche jährliche Regenfall liegt zwischen 750 und 1050 mm. Die Vegetation besteht überwiegend aus Savanne, die durch einen lockeren Bestand an trockenresistenten Bäumen wie dem Baobabbaum oder Akazien gelegentlich unterbrochen wird. Die höchsten Temperaturen werden zum Ende der Trockenzeit erreicht, die niedrigsten im Dezember und im Januar. Der Harmattan, ein trockener heißer Wüstenwind aus der Sahara, weht im Norden von Dezember bis März. Die Temperaturen können zwischen 14 °C in der Nacht und 40 °C am Tag schwanken.

Tamale ist die Hauptstadt der Region mit knapp 350.000 Einwohnern. Die Stadt erstreckt sich über eine weite Fläche und ist eher ländlichen Charakters. Subsistenzwirtschaft und Kleinhandel sind das Hauptgewerbe der Region. Die Einwohner wohnen überwiegend in Häusern aus Lehmwänden und Strohdächern. Malaria kommt in Nordghana hyperendemisch vor, die Übertragung ist ganzjährig. Bis zu sieben Malariainfektionen pro Kind pro Jahr werden beobachtet, dabei gehäuft in der Regenzeit [102]. Dennoch ist die Infektionsprävalenz in Nordghana ganzjährig hoch [25]. Ehrhardt *et al.* konnten in der „Northern Region“ eine Infektionsprävalenz mit Plasmodien von 82 % in einer Studienpopulation von >4000 Kindern zwischen sechs Monaten und fünf Jahren in der Regenzeit und von 75 % in der Trockenzeit dokumentieren [103]. Die vorliegende Studie wurde im vorstädtischen Stadtteil Bulpeila in einem Gesundheitsposten der primären Versorgung, Bulpeila Health Center, durchgeführt. Der Einzugsbereich betrug ca. 20 km Radius im Umland. Bulpeila Health Center ist eine kleine Institution mit sieben Räumen, in denen eine Krankenschwester für die medizinische Grundversorgung der Patienten zuständig ist, und mehrere Hebammen sich um Schwangerschaften, Niederkünfte und die Folgeuntersuchungen der Neugeborenen und Kleinkinder kümmern. In einem dieser Räume hat das Berliner Institut für Tropenmedizin im Jahr 2000 ein einfaches Labor zur Anfertigung und Mikroskopie dicker Tropfen und Ausstriche zur Malariadiagnostik, sowie zur Lagerung von Blutproben eingerichtet.



Die in der Region dominierende Ethnie ist die der muslimischen Dagomba. Weitere Ethnien sind die größere Gruppe der Mamprusi und die kleinere Gruppe der Gurma. Da Tamale als drittgrößte Stadt Ghanas über eine Universität, ein universitäres Krankenhaus und über andere größere öffentliche Einrichtungen verfügt, ist die Einwanderungsrate muslimisch sowie christlich angehöriger Ethnien aus dem vorwiegend christlich geprägten Süden und dem vorwiegend muslimisch geprägten Norden hoch. Der Hauptanteil der Studienteilnehmer waren Dagombas.

## 2.2 Studienteam und Studienteilnehmer

### Studienteam

Das Studienteam bestand aus 16 Mitarbeitern: Der Studienleitung, PD Dr. med F. Mockenhaupt und Dr. med. S. Ehrhardt, die verantwortlich für Planung, Durchführung und Finanzierung der Studie waren. Zwei Doktoranden vor Ort, Jonas Schreiber und die Verfasserin, welche hauptverantwortlich für die Organisation und den Ablauf der Studie waren sowie für die Supervision und Durchführung der Laborarbeit und die mikroskopische Diagnostik der unkomplizierten Malaria. Der Studienarzt, Dr. Stephen Dzisi, war für die Untersuchung der Kinder sowie für weitere organisatorische Angelegenheiten zuständig. Drei einheimische Krankenschwestern waren jeweils eingeteilt zur Blutabnahme, Verabreichung der Medikamente, Registrierung der Neuankömmlinge und Studienkinder sowie die Aufklärung der Eltern oder Bevollmächtigten. Ein ghanaischer Therapieassistent übernahm die Medikamentenausgabe. Er hatte als einziger Einblick in die Randomisierungsliste, ohne den Code zu kennen. Ein einheimischer Laborassistent war zuständig für das Anfertigen der dicken Tropfen und Ausstriche, sowie deren Färbung und für die Laborverwaltung. Sechs einheimische technische Helfer waren in erster Linie zuständig für das Messen der axillären Körpertemperatur und das Informieren und Erinnern der Studienteilnehmer an ihre Nachuntersuchungen. Sie waren zusätzlich mitbeteiligt bei der Registrierung der Kinder, bei Übersetzung und Aufklärung der Eltern bzw. Bevollmächtigten und bei der Beobachtung der Kinder nach Medikamenteneinnahme. Um die teilweise 20 km weit entfernten Dörfer zu erreichen standen zwei Fahrräder und ein Moped zur Verfügung.

## Studienteilnehmer

Um repräsentative Daten zu erlangen, war die Rekrutierung von mindestens 450 Kindern definierten Alters mit unkomplizierter Malaria (s. Ein- und Ausschlußkriterien) notwendig. Es erfolgte die Randomisierung in drei gleich große Therapiearme A, B und C. Gruppe A wurde mit Sulphadoxin-Pyrimethamin (SP) allein, Gruppe B mit SP in Kombination mit Amodiaquin, und Gruppe C mit SP in Kombination mit Artesunat behandelt. Es konnten im Zeitraum von Mitte August bis Mitte November 1561 febrile Kinder auf Parasiten und andere Erkrankungen untersucht werden, von denen 451 Kinder nach unten aufgeführten Kriterien in die Studie aufgenommen wurden. Das Studienprotokoll orientierte sich an den WHO-Protokollen zur Bestimmung der Wirksamkeit von Therapeutika gegen unkomplizierte Malaria von 1996 und 2003 [20, 104].

## 2.3 Ein- und Ausschlußkriterien

### Einschlußkriterien

Folgende Einschlußkriterien erlaubten die Aufnahme in die Studie [20, 104]:

- Alter von  $\geq 6$  -  $\leq 59$  Monaten
- Axilläre Temperatur  $\geq 37,5$  °C
- Gewicht  $\geq 5$  kg
- Fehlen schwerer Mangelernährung
- Hämoglobin  $\geq 5$  g/dl
- Parasitämie zwischen 2000 und 200 000 asexuellen Parasiten/  $\mu\text{L}$  Blut
- Fehlen anderer fieberhafter Erkrankungen, die mit der Diagnose klinischer Malaria interferieren könnten, zum Beispiel Angina tonsillaris, Bronchitis und Pneumonien, Masern, Otitis media, Abszesse
- Fehlen von sogenannten Warnsymptomen, definiert als die Unfähigkeit zu trinken, zu saugen oder zu essen, ständiges Erbrechen, kürzlich aufgetretene Krampfanfälle, lethargischer oder bewusstloser Zustand, Unfähigkeit aufzustehen oder zu sitzen [20, 105]

- Möglichkeit, zu den festgesetzten Verlaufskontrollterminen zu erscheinen
- Zustimmung der Mutter/des Bevollmächtigten zur Studienteilnahme durch ein informierendes, unterzeichnetes Einwilligungsschreiben

## Ausschlußkriterien

Ausschlußkriterien waren:

- Ausreten von zusätzlichen Erkrankungen während des Studienverlaufes, die eine klare Zuordnung des Fiebers zu Malaria unmöglich machten. Darunter fielen Erkrankungen wie zum Beispiel Otitiden, oder Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes
- Bekannte Hypersensibilität gegenüber Sulphadoxin-Pyrimethamin, Amodiaquin oder Artesunat
- Wiederholtes Erbrechen der applizierten Medikamente
- Umzug eines Studienteilnehmers ausserhalb der Erreichbarkeit des Health-Centers
- Rückzug der Einwilligungserklärung
- Gabe von Malariamedikamenten durch einen Dritten
- Nachweis einer Infektion mit *P. malariae* und/oder *P. ovale*, zusätzlich zu *P. falciparum*

## 2.4 Rekrutierungsablauf

Den Kindern wurde bei Ankunft zunächst die axilläre Temperatur mit Hilfe eines elektrischen Thermometers gemessen.

Bei einer Temperatur  $\geq 37,5$  °C wurden folgende Daten der Patienten erhoben:

- Name des Kindes und der Mutter bzw. des Bevollmächtigten;
- Alter des Kindes, bei Zweifeln durch die Geburtsurkunde verifiziert;

- Größe des Kindes, mit Hilfe einer fixen Meßlatte gemessen;
- Gewicht des Kindes, mit Hilfe einer elektrischen Waage gemessen, die täglich auf ihre Funktion hin geprüft wurde. Kinder die noch nicht alleine stehen konnten wurden mit der Mutter auf die Waage gestellt, deren Gewicht anschließend abgezogen wurde.

Ab einer Körpertemperatur von  $\geq 38$  °C wurde Paracetamol 500 mg in Sirupform gegeben, bei  $\geq 40$  °C die Temperatur zusätzlich mit Hilfe feuchter Wickel gesenkt.

### 2.4.1 Anamnese

Die Anamnese orientierte sich an einem Anamnesebogen, der spezifisch auf das Studiendesign ausgelegt war. Eine ghanaische Hebamme führte gemeinsam mit Hilfe der anderen Teamarbeiter die Anamnese in der jeweiligen Stammsprache der vorstelligen Eltern, meist Mütter, durch. Es wurde nach vorangegangenem Fieber sowie nach einer eventuell vorausgegangen Einnahme von CQ gefragt. Wesentlich war die Frage nach kürzlich erfolgten zerebralen Krampfanfällen. Konnten diese plausibel durch die Eltern geschildert werden, wurden diese Kinder mit Verdacht auf schwere Malaria zügig einer entsprechenden Diagnostik und Therapie zugeführt.

Ebenfalls wesentlich war die Nachfrage nach bereits in der Vergangenheit aufgetretenen Hautreaktionen nach Gabe von CQ oder SP, um das Risiko eventueller allergischer Reaktionen zu verringern. Eine schwerwiegendere Hautreaktion als Pruritus oder einen unspezifischen Hautausschlag in der Vergangenheit konnte anamnestisch bei keinem der Kinder eruiert werden, und trat auch im Verlauf dieser Studie nicht auf.

### 2.4.2 Klinik

Die bis hierhin registrierten febrilen Kinder wurden anschließend von dem Studienarzt auf andere fieberhafte Erkrankungen, die mit der eindeutigen Diagnose einer Malaria interferieren könnten, sowie auf schwere Mangelernährung, andere schwere Erkrankungen, z.B. Immunschwäche, und auf Warnsymptome hin untersucht (siehe Einschlusskriterien).

Kinder mit Wurminfektionen wurden zusätzlich mit Albendazol, 200 mg, behandelt. Ebenso wurden andere ohne Fieber einhergehende Erkrankungen unter Anwendung von Medika-

menten, die keine Wirksamkeit gegen Malaria aufweisen, behandelt, z.B. mit Gentamycin Augensalbe oder Fluconazol. Diese Kinder wurden nicht aus der Studie ausgeschlossen.

Für alle registrierten 1561 Kinder war eine akute Krankenversorgung durch das Studienteam gewährleistet. Die fieberfreien und demnach nicht als potentielle Studienteilnehmer registrierten Kinder wurden der lokal tätigen Krankenschwester vorgestellt, oder ebenfalls durch den Studienarzt betreut. Im Hinblick auf den zyklischen Charakter der Malaria, mit häufigem Auftreten von Fieber besonders am Nachmittag, wurden Kinder mit Fieberanamnese und krankem Erscheinungsbild ein paar Stunden beobachtet und die Körpertemperatur zu einem späteren Zeitpunkt erneut gemessen.

### **2.4.3 Labor**

Im Labor des Bulpeila Health Centers konnten einfache Methoden durchgeführt werden, wie die Anfertigung dicker Tropfen und Ausstriche zur Diagnostik von Parasitämien. Es standen ein Öl-Immersionsmikroskop und ein Hemocue-Photometer zur Messung des Hämoglobinwertes zur Verfügung. Ebenso enthielt es mehrere Kühltruhen mit Temperaturen bis  $-18^{\circ}\text{C}$  zur Konservierung von Blutproben. Zwischenzeitliche Stromausfälle wurden mit einem Dieselbetriebenen Generator überbrückt. Für die spätere Durchführung von Polymerase Ketten Reaktionen (PCR, engl.: polymerase-chain-reaction) wurden mit Hilfe einer Zentrifuge bei einem Teil der Blutproben vor dem Einfrieren die zellulären Blutbestandteile vom Plasma getrennt.

#### **Bestimmung der Parasitämie vor Ort**

Den Kindern, die bis hierhin die Studienkriterien erfüllten, wurde von einer einheimischen Krankenschwester ein Minimum von 0,5 ml venösen Blutes in eine Ethylendiamintetrasäure (EDTA)-Monovette abgenommen. Davon wurden im Labor des Health-Centers zwei dicke Tropfen sowie ein Ausstrich mit je ca.  $5\ \mu\text{L}$  Blut, angefertigt und an der Luft getrocknet. Einer der beiden dicken Tropfen wurde unmittelbar mit 10 % Giemsa-Lösung in Titrisol Pufferkonzentrat für Pufferlösung mit einem pH von 7,2, 10 min lang gefärbt (Schnellfärbung), abgespült, mittels Haartrockner getrocknet und unmittelbar in Folge mikroskopisch mit 1000 facher Vergrößerung durch zwei Doktoranden auf Parasiten untersucht und ausgezählt.

Ein Präparat wurde als negativ deklariert, wenn auf 200 Leukozyten kein Parasit gesehen wurde. Bei vorhandener Parasitämie wurde die Anzahl der Parasiten auf 200 Leukozyten ausgezählt, oder, bei hohen Parasitendichten, bis maximal 500 Parasiten mit entsprechender Leukozytenzahl. Jedes Gesichtsfeld wurde komplett ausgezählt. Bei der Beurteilung einer Parasitendichte aus dem dicken Tropfen wird von einer durchschnittlichen Leukozytenanzahl von 8000 / $\mu$ L Blut ausgegangen. In Abhängigkeit von der zu bearbeitenden Probenzahl dauerte der Zeitraum von Vorstellung bis zur Diagnosestellung etwa eine Stunde.

Hämoglobin-Konzentrationen wurden anhand des HemoCue-Photometers gemessen [106].

Zwei weitere dicke Tropfen wurden am Abend mit 4 % Giemsa-Lösung 30 min lang gefärbt, abgespült und über Nacht an der Luft getrocknet. Eines dieser Präparate diente der Kontrollauszählung zu einem späteren Zeitpunkt nach Beendigung der Studie. Bei der Kontrollauszählung wurde ein dicker Tropfen erst als negativ deklariert, wenn auf 500 Leukozyten kein Parasit gesehen wurde. Ansonsten erfolgte die Auszählung wie oben beschrieben. Bei der zweiten Auszählung ist aufgrund der längeren Färbezeit der dicken Tropfen mit 4 % Giemsa-Lösung die Färbung in ihrer Qualität besser, und die Auszählung damit genauer. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse der zweiten Auszählung verwendet.

Das andere Präparat wurde an der Universität Nijmegen (Dr. T. Bousema) auf die Anzahl von Gametozyten/1000 Leukozyten ausgezählt. Das Ergebnis wurde ebenso auf 8000 Leukozyten hochgerechnet, entsprechend Gametozyten/ $\mu$ L Blut.

Der Blutausstrich wurde ebenfalls zu einem späteren Zeitpunkt zunächst mit 100 % Methanol fixiert, mit 4 % Giemsa-Lösung 30 min lang gefärbt, abgespült und über Nacht getrocknet. Diese Präparate wurden für eine eventuelle spätere Kontrolle der PCR-Ergebnisse zur Speziesbestimmung gelagert.

## **Weiterverarbeitung der Blutproben**

Die Blutproben im EDTA-Röhrchen wurden ebenfalls zum Teil sofort, zum Teil am selben Abend im Labor des Bulpeila Health Centers durch die Doktoranden verarbeitet: 180  $\mu$ L EDTA-Blut wurden mit 180  $\mu$ L Stabilisierungspuffer AS 1 versetzt. Dies ermöglicht die Lagerung der Proben für bis zu drei Monate bei Raumtemperatur. Diese Proben dienten der nachfolgenden DNA-Extraktion. Weitere 100  $\mu$ L EDTA-Blut wurden in 1,5 ml Röhrchen

(Vollblutaliquots) pipettiert und eingefroren. Das restliche EDTA-Blut wurde durch Zentrifugieren in Plasma und Sediment getrennt und für eventuelle spätere Analysen ebenfalls eingefroren.

Alle Blutproben wurden gekühlt bzw. eingefroren und nach Ablauf der Studie nach Berlin in das Institut für Tropenmedizin überführt.

#### **2.4.4 Aufklärung und Einwilligung**

Wenn ein Kind die vorgenannten, routinemäßigen Diagnostikverfahren durchschritten hatte und alle Einschlußkriterien erfüllte, wurde den Eltern oder Bevollmächtigten mündlich und schriftlich Sinn und Ablauf der Studie, sowie die Bedingungen zum Einschluß in die Studie erklärt und ihre Einwilligung per Unterschrift eingeholt. Aufgrund der in der ländlichen Studienregion hohen Rate an Analphabetismus wurden die Unterschriften fast ausschließlich per Daumenabdruck geleistet. Eine Aufklärung zur Studie sowie die sinngemäße mündliche Übersetzung des Informationsschreibens waren jederzeit durch einen die jeweilige Stammessprache beherrschenden Team-Mitarbeiter und unter Anwesenheit eines Zeugen gegeben.

#### **2.4.5 Therapie**

Die Studie wurde doppelblind (s.u.) und Plazebo-kontrolliert durchgeführt. Die Zuteilung der Studienkinder zu einem Therapiearm A, B oder C erfolgte über eine im Sechserblock erstellte, computergenerierte Randomisierungsliste.

Die Kinder wurden einem der folgenden Therapie-Arme zugeteilt:

- **Arm 1:**

- Sulphadoxin (25 mg/kg KG)/Pyrimethamin (1,25 mg/kg KG) als Einzeldosis (Fansidar, Roche, Schweiz), plus
- Amodiaquin-Plazebo (Park-Davis, Senegal), einmal am Tag über drei Tage, plus
- Artesunat-Plazebo (Dafra Pharma, Belgien), einmal am Tag über drei Tage

- **Arm 2:**

- Sulphadoxin (25 mg/kg KG)/Pyrimethamin (1,25 mg/kg KG) als Einzeldosis (Fansidar, Roche, Schweiz), plus
- Amodiaquin (Camoquine, Park-Davis, Senegal), 10 mg/kg KG einmal am Tag über drei Tage, plus
- Artesunat-Plazebo (Dafra Pharma, Belgien), einmal am Tag über drei Tage

- **Arm 3:**

- Sulphadoxin (25 mg/kg KG)/Pyrimethamin (1,25 mg/kg KG) als Einzeldosis (Fansidar, Roche, Schweiz), plus
- Amodiaquin-Plazebo (Park-Davis, Senegal), einmal am Tag über drei Tage, plus
- Artesunat (Arinate, Dafra Pharma, Belgien), 4 mg/kg KG einmal am Tag über drei Tage

Die Amodiaquin- und Artesunat-Plazebos entsprachen den Originalen in Aussehen, Größe und Geschmack und wurden wie die Vera durch die Hersteller zur Verfügung gestellt.

Jedem Kind wurde eine Studiennummer zugeordnet und dessen Daten auf einen Erhebungsbogen übertragen. Die Daten wurden von Name und Adresse der Studienteilnehmer abgekoppelt und anhand dieser Studiennummer ausgewertet.

Auf die Medikamenteneinnahme folgte eine mindestens dreißigminütige Beobachtungszeit. Bei Erbrechen wurde die Medikamenteneinnahme wiederholt. Weiteres Erbrechen führte zum Ausschluß aus der Studie; das Kind wurde zur parenteralen Therapie ins Krankenhaus gebracht oder vor Ort mit Artesunat (Plasmotrim, AS, mepha, Schweiz), 10 mg/kg KG in Zäpfchenform, an Tag 0, und 5 mg/kg KG an Tag 1 und 2, sowie Sulphadoxin-Pyrimethamin (25/1,25 mg/kg KG) als Einzeldosis (Fansidar, Roche, Schweiz) an Tag 2 therapiert. Diese Patienten wurden ebenfalls medizinisch betreut bis Fieber und Parasitämie nicht mehr nachweisbar waren.

## **Verblindung**

Die Medikamenten-Ausgabe erfolgte über eine unabhängige Person, die alleinig Einblick in die Randomisierungsliste hatte, ohne den Code zu kennen, und die nicht in die Ergebnis-



analysen involviert wurde. Ein unabhängiger Monitor, in diesem Fall eine im Krankenhaus arbeitende Doktorandin, die nicht an der Durchführung dieser Studie beteiligt war, wahrte den Code. Nur im Notfall, wenn die Kenntnis der verabreichten Therapie für das weitere klinische Vorgehen und für das Wohlergehen des jeweiligen Kindes essentiell wurde, sollte eine Entblindung für diesen Fall durch die Hauptverantwortlichen erfragt werden können. Diese Situation kam in dieser Studie nicht vor.

### **Kinder mit Hypo- bzw. Hyperparasitämie**

Kinder mit Parasiten  $\leq 2000/\mu\text{L}$  Blut wurden mit einmaliger Gabe von SP 25/1,25 mg/kg KG und CQ-Sirup 25 mg/kg KG behandelt. Kinder mit einer Hyperparasitämie, definiert als  $\geq 200\ 000$  Parasiten/ $\mu\text{L}$  Blut wurden mit Artesunat Zäpfchen 10 mg/kg KG (Plasmotrim, Mepha, Schweiz) sofort und 5 mg/kg KG abends am 1. Tag, und 5 mg/kg KG morgens am darauffolgenden Tag, sowie mit SP 25/1,25 mg/kg KG am dritten Tag behandelt. Die Kinder wurden betreut, bis keine Parasiten mehr im Blut nachgewiesen werden konnten und das Fieber verschwunden war.

## **2.5 Studienablauf**

Die Studienkinder wurden standardisiert an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 und 28 nach oben beschriebenen Kriterien untersucht: Temperaturmessung, klinische Untersuchung, Blutabnahme mit Bestimmung der Parasitenzahl. Es erfolgte keine Blutabnahme an Tag 1, da keine relevanten Parasitenveränderungen erwartet wurden [20]. Es erfolgte eine klinische Vorstellung und Blutabnahme an allen anderen als den regulären Untersuchungstagen, wenn Fieber aufgetreten war, als mögliches erstes Indiz für ein klinisches Therapieversagen. Therapiert wurde an den Tagen 0, 1 und 2. Paracetamol wurde bei axillärer Temperatur  $\geq 38,0$  °C an den Tagen 0, 1 und 2 gegeben.

Der Hämoglobingehalt des Blutes wurde an den Tagen 0, 14 und 28, und an allen anderen Tagen im Falle von Fieber bestimmt, sowie bei Verdacht auf schwere Anämie bei Blässe, Schwäche und Müdigkeit oder anderer Erkrankung.

Für die Auswertung der Studie war es unabdingbar, die Patienten an den vorgeschriebenen Terminen erscheinen zu lassen, nicht einen Tag früher oder später. Um dies sicher zu gewähr-

leisten, wurden die Eltern bzw. Bevollmächtigten einen Tag vorher, oder gegebenenfalls am selben Tag von Mitarbeitern an ihren Termin erinnert. So konnte die Studientreue optimiert werden.

## 2.6 Klassifizierung des Therapie-Ergebnisses

Der Therapieverlauf wurde nach 14 und nach 28 Tagen beurteilt. Das Therapieansprechen wurde nach klinischen und parasitologischen Kriterien in folgende Gruppen klassifiziert:

- **ETF** (engl., early treatment failure):
  - Entwicklung von Warnsymptomen oder schwerer Malaria an den Tagen 1, 2 oder 3, mit Parasitämie
  - Parasitämie an Tag 2 > als an Tag 0
  - Parasitämie und axilläre Temperatur  $\geq 37,5$  °C an Tag 3
  - Parasitämie an Tag 3  $\geq 25$  % als an Tag 0
- **LCF** (engl., late clinical treatment failure):
  - Entwicklung von Warnsymptomen oder schwerer Malaria von Tag 4 bis einschließlich Tag 14 bzw. Tag 28 mit Parasitämie, ohne vorhergehendes Auftreten von ETF
  - Axilläre Temperatur  $\geq 37,5$  °C und Parasitämie von Tag 4 bis einschließlich Tag 14 bzw. Tag 28, ohne vorhergehendes Auftreten von ETF
- **LPF** (engl., late parasitological treatment failure):
  - Axilläre Temperatur  $\leq 37,5$  °C und Parasitämie von Tag 4 bis einschließlich Tag 14 bzw. Tag 28, ohne vorhergehendes Auftreten von ETF oder LCF
- **ACPR** (engl., adequate clinical and parasitological response):
  - Keine Parasitämie bis Tag 14 bzw. Tag 28, unabhängig von axillärer Temperatur, ohne vorhergehendes Auftreten von ETF, LCF oder LPF

Alle Therapieversager der Klasse ETF und LCF wurden am selben Tag mit Mefloquin 15 mg/kg KG und 10 mg/kg KG nach 24 h behandelt und weiter betreut, bis die Malaria

ausgeheilt war. Die Studie war damit für sie beendet. Therapieversager der Klasse LPF wurden in kürzeren Zeitabständen in Abhängigkeit von ihrem klinischen Erscheinungsbild wiedergesehen und untersucht, in der Regel jeden Tag. Sie wurden erst therapiert, wenn klinische Symptome auftauchten wie zum Beispiel Fieber. An Tag 28 wurden diese Kinder aus ethischen Gründen auch ohne klinische Symptome mit Mefloquin therapiert.

Kinder, die im Verlauf der Studie eine schwere Malaria entwickelten, wurden nach rektaler Gabe von Artesunat 10 mg/kg KG sofort in die Klinik zur Weiterbehandlung überwiesen.

## 2.7 Ergänzende Laborarbeiten, Institut für Tropenmedizin Berlin, Charité

Nach im Folgenden beschriebener Methode wurde DNA aus den Blutproben extrahiert. Diese diente als Grundlage für die PCR, mit der zunächst die verschiedenen Plasmodienarten zur Detektion der Mischinfektionen identifiziert wurden. Zudem wurden mittels PCR die verschiedenen *P. falciparum* Stämme durch die Bestimmung der dafür kodierenden, hochpolymorphen Gene *msp1* und *msp2* charakterisiert. Diese Charakterisierung ermöglichte die Unterscheidung einer Neuinfektion von einer Rekrudescenz zum Zeitpunkt des Therapieversagens.

### 2.7.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit dem QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Hierbei werden mit Hilfe von Guanidiniumhydrochlorid und Proteinase K die zellulären Bestandteile des Blutes lysiert. Freiliegende DNA wird an Silika-Moleküle gebunden, mehrmals mit alkoholischen Lösungsmitteln gewaschen und schließlich in wässriger Lösung gelöst [107].

Es wurden 180  $\mu\text{L}$  des Gemisches aus Blut und Stabilisierungspuffer AS 1 mit 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K und 40  $\mu\text{L}$  AS2 versetzt und gründlich durchmischt (Vortexgerät, Heidolph). Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei 56 °C. Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  absolutes Ethanol zugesetzt und wieder gründlich gemischt. Diese Mixtur wurde nun in ein QIAmp Zentrifugationsröhrchen mit Zentrifugationshülse pipettiert und für 1 min bei 8000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Dem folgte die Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  AW-Puffer und wieder eine

Zentrifugation über eine Minute bei 8000 U/min. Diese Prozedur wurde mit einer dreiminütigen Zentrifugation bei 14000 U/min wiederholt. Die bei der Zentrifugation in die Hülle gedrückte Lösung wurde jedesmal verworfen. Schließlich wurden die Proben jeweils mit 100  $\mu\text{L}$  AE-Elutionspuffer versetzt und wiederum einminütig bei 8000 U/min zentrifugiert, was zur Eluierung der an den Silika-Filter gebundenen Nukleinsäuren führt.

Durch dieses Verfahren konnten ca. 6  $\mu\text{g}$  genomische DNA gewonnen werden, welche entweder sofort zur PCR eingesetzt, oder bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wurde.

## 2.7.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Methode der PCR wurde in vorliegender Studie nach dem Protokoll von Snounou *et al.* 1993 durchgeführt um gemischte Infektionen unter den Studienteilnehmern zu detektieren und auszuschließen [108].

Ein weiteres PCR-Verfahren diente der Unterscheidung von Neuinfektionen und Rekrudescenzen. So konnte die ausgeprägte genetische Diversität von *P. falciparum* zur Unterscheidung von Rekrudescenz und damit Therapieversagen, und Neuinfektion durch einen zu Beginn der Studie nicht die Infektion verursachenden Stamm genutzt werden. Dazu wurden von jedem Kind jeweils die Blutprobe von Tag 0, also vor Therapiebeginn, und die Blutprobe vom Tag des Therapieversagens untersucht.

Mit der PCR ist eine hochsensible Methode entwickelt worden, kleinste Mengen von DNA zu vervielfältigen und damit nachweisbar zu machen. Sie funktioniert nach dem Prinzip der DNA Replikation in Lebewesen.

Ausgehend von einer DNA-Konzentration von ca. 30 ng/ $\mu\text{L}$  wurde 1  $\mu\text{L}$  als Matrize für die PCR eingesetzt, sowie zwei passende synthetische Oligonukleotide, sogenannte Primer, die als Anfangsstruktur an die zu replizierenden komplementären Basenstränge jeweils an das 5'- und 3'- Ende binden, ein Nukleotidgemisch und eine temperaturstabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase).

Die DNA wird durch Erhitzen auf  $94\text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert, es entsteht einzelsträngige DNA. Anschließend wird die Temperatur auf etwa  $55\text{ }^\circ\text{C}$  abgesenkt, so dass die Primer mit dem komplementären Teil des DNA-Stranges hybridisieren. Diese Oligonukleotide werden von

der *Taq*-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese des komplementären Basenstranges benötigt. Durch Temperaturerhöhung auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase, kann diese mit dem Verlängern des komplementären Basenstranges durch Anhängen der Nukleotide beginnen. Diese Abfolge von Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung wird in mehreren Zyklen wiederholt. In einem abschließenden Reaktionsschritt über fünf Minuten bei dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase wird die Reaktion abgeschlossen.

### 2.7.3 *m*sp1 und *m*sp2

Zur Darstellung der unterschiedlichen Allele für *m*sp1 und *m*sp2 wurden die Genabschnitte mittels PCR in zwei Schritten (äußere und innere PCR) vervielfältigt, und schließlich mittels Gel-Elektrophorese unter UV-Strahlung dargestellt. Zur Darstellung der jeweiligen polymorphen Genabschnitte wurde das von Snounou et al. [109] beschriebene Protokoll verwendet. Hierbei wird zunächst durch eine äußere PCR ein Stück DNA, welches die Sequenzen von *m*sp1 und *m*sp2 enthält, amplifiziert. Dazu wurden Oligonukleotidpaare für konservierte Sequenzen, die die polymorphe Region umspannen, angewendet. Darauf folgt mit einer inneren PCR (nested-PCR) die Amplifizierung der polymorphen Allele von *m*sp1 und *m*sp2 mit den dem jeweiligen Allel zugehörigen Primerpaaren. Untersucht wurden jeweils die Blutprobe von Tag 0 vor der Therapie im Vergleich mit jener bei Therapieversagen, bei der zum ersten Mal wieder Parasiten auftraten.

- *m*sp1

**Äußere:** M1-OF 5'-CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG-3'

M1-OR 5'-CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA-3'

**K1:** M1-KF 5'-AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC-3'

M1-KR 5'-GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA-3'

**Mad20:** M1-MF 5'-AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC-3'

M1-MR 5'-ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC-3'

**RO33:** M1-RF 5'-TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG-3'

M1-RR 5'-CATCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC-3'

- *msp2*:

**Äußere:** M2-OF 5'-ATGAAGGTAATTAACATTGTCCTATTATA-3'

M2-OR 5'-CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT-3'

**FC27:** M2-FCF 5'-AATACTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA-3'

M2-FCR 5'-TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC-3'

**3D7/IC:** M2-ICF 5'-AGGAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT-3'

M2-ICR 5'-GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG-3'

## Äußere PCR

Die äußere PCR zur Amplifizierung der konservierten DNA-Abschnitte wurde für *msp1* und *msp2* gemeinsam durchgeführt. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

1. PCR-Puffer: 2,5  $\mu$ L
2. Gelatine 1 mg/ml: 2,5  $\mu$ L
3. dNTPs: 3,125 nMol
4. Primer M1-OF, M2-OF: jeweils 4 fMol
5. Primer M1-OR, M2-OR: jeweils 4 fMol
6. H<sub>2</sub>O: 19  $\mu$ L
7. Taq-Polymerase: 1 U

Von diesem Ansatz wurden jeweils 24  $\mu$ L mit 2  $\mu$ L DNA versetzt. Diese Arbeit fand unter sterilen, DNA-freien Bedingungen auf einer PCR-Bank statt.

Folgender Temperaturzyklus wurde für die äußere PCR verwendet: Eine erste Denaturierung über 5 min bei 95 °C. Darauf folgten in einem 35fachen Zyklus: 60 sek bei 94 °C (kurze Denaturierung), 120 sek bei 58 °C (Hybridisierung), 120 sek bei 72 °C (Verlängerung). Es folgte eine abschließende Verlängerung von 10 min bei 72 °C.

## Innere PCR

Für die innere PCR wurden entsprechend der Allelfamilien K1, Mad20, Ro33, Fc27, IC fünf unabhängige PCRs mit den jeweiligen Primerpaaren durchgeführt. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

1. PCR-Puffer: 5  $\mu$ L
2. Gelatine 1 mg/ml: 5  $\mu$ L
3. dNTPs: 8,75 nMol
4. Primer MSP1: K1, MAD, RO/ MSP2: FC, IC, nested forward: 8 fMol
5. Primer MSP1: K1, MAD, RO/ MSP2: FC, IC, nested reverse: 8 fMol
6. H<sub>2</sub>O: 38  $\mu$ L/Probe
7. Taq-Polymerase: 1,5 U

Von diesem Ansatz wurden jeweils 49  $\mu$ L mit 1  $\mu$ L DNA des äußeren PCR-Produktes versetzt.

Folgender Temperaturzyklus wurde für die innere PCR verwendet: Eine erste Denaturierung über 5 min bei 95 °C. Darauf folgten in einem 30fachen Zyklus: 60 sek bei 94°C (Denaturierung), 120 sek bei 63 °C (Hybridisierung), 120 sek bei 72 °C (Verlängerung). Es folgte eine abschließende Elongationszeit von 5 min bei 72 °C.

### 2.7.4 Gel-Elektrophorese

Anschließend wurden die Längenpolymorphismen der einzelnen Allele von *msp1* und *msp2* durch Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht und ausgewertet. Hierbei macht man sich die negative Ladung von DNA-Molekülen, die unter Spannung von der Kathode zur Anode wandern, zunutze. Bei der Gel-Elektrophorese wandern die DNA-Fragmente durch die feinen Poren des Gels. Die Laufgeschwindigkeit hängt von der angelegten Spannung, der Porengröße und der Länge der DNA-Fragmente ab. Dementsprechend wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als große. Mit Hilfe von DNA-Standards, die mit aufgetrennt wurden, konnte die Länge der jeweilig untersuchten DNA-Fragmente abgelesen werden.

## Protokoll

Zur Herstellung des Gels wurden 3 g GTG-Agarose-Gel mit 100 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle ca. 3 min aufgeköcht. Diese Flüssigkeit wurde mit 1  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromid versetzt, in eine Gelkammer gegeben und zum Aushärten 1 Stunde bei +4 °C gekühlt. Das nun feste Gel wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Es wurden jeweils 7  $\mu\text{L}$  PCR-Reaktionsprodukt der inneren PCR mit 1  $\mu\text{L}$  Bromphenolblau versetzt und in die Substrattaschen des 3 %igen GTG-Agarose-Gels pipettiert. Als Referenz zum Ablesen der Basenpaarlängen wurden rechts und links jeweils die äußere Tasche mit einem Basenpaar-Längenstandard gefüllt. Für *msp1* wurde ein 50 Basenpaar-Marker gewählt, für die längeren *msp2* Allele ein 100 Basenpaar-Marker. Schließlich wurde für 45-60 min eine Spannung von 60 V für *msp1* und 80 V für *msp2* angelegt. Die Banden wurden anschließend auf einer UV-Licht-Platte sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera abgelichtet.

Die Basenpaar-Längen der gepaarten Allele wurden per Augenmaß miteinander verglichen.

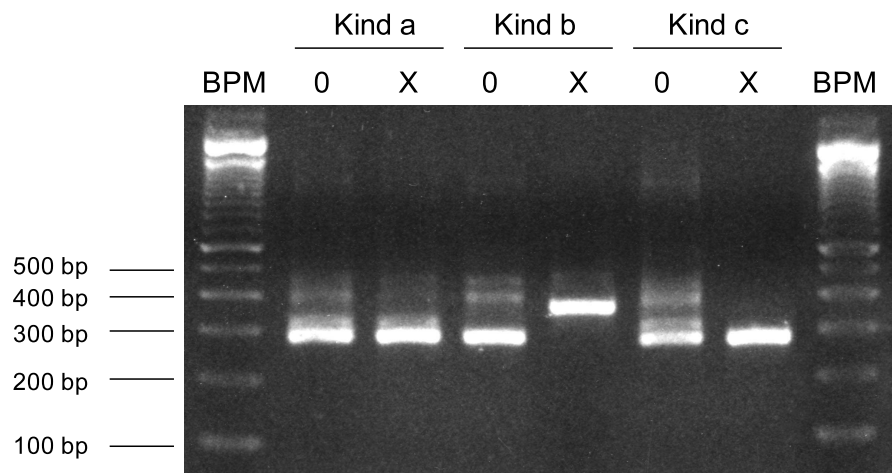


Abbildung 2.1: Darstellung von *msp1*- und *msp2*- Allelen durch Gel-Elektrophorese; Basenpaarbanden Kind a, b und c an Tag 0 und am Tag des Therapieversagens: Kind a und Kind c: Rekrudescenz, Kind b Reinfektion

## 2.8 Datenanalyse

Die Analyse der Therapieergebnisse erfolgte per Protokoll. Demnach wurden die Ergebnisse nur derjenigen Kinder in die statistischen Berechnungen miteinbezogen, die an den jeweiligen



Verlaufskontroll-Tagen noch in der Studie waren. Die Studie hatte dabei eine Power von 80 % bei einem Konfidenzintervall von 95 % zur Eruierung von Unterschieden bzgl der Heilungsra-  
ten  $\geq 14$  % zwischen den drei Therapiearmen, eine Therapieversagerquote von  $\leq 10$  % für das  
effektivste der Therapieregime vorausgesetzt. Häufigkeiten wurden mit Hilfe des  $\chi^2$ -Testes  
oder des Fisher Exact Testes bestimmt, kontinuierliche Variablen mit Hilfe des Student t-  
Tests, des Mann-Whitney U-Testes, oder mittels Varianzanalyse-Tests oder Kruskal-Wallis  
Tests, je nach Anwendbarkeit. Ein P-Wert von  $< 0,05$  bezeichnete eine statistischen Signifi-  
kanz.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Therapiegruppen

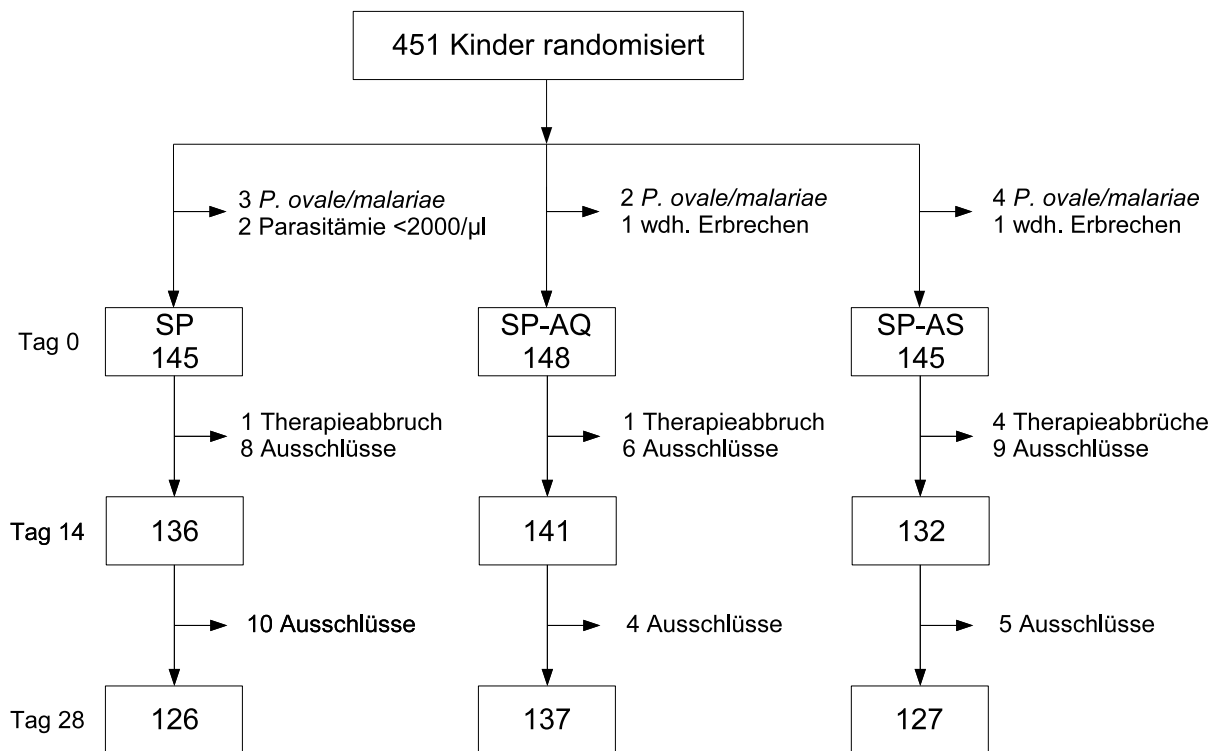


Abbildung 3.1: **Studienteilnehmer**; SP, Sulphadoxin-Pyrimethamin; AQ, Amodiaquin; AS, Artesunat

451 Kinder mit unkomplizierter Malaria konnten vom 23. August bis zum 21. November 2002 in die Studie aufgenommen werden. Sie wurden in einen der drei Therapiearme randomisiert,

wonach 151 Kinder mit SP allein und jeweils 150 Kinder mit SP in Kombination mit AQ, und in Kombination mit AS therapiert wurden (Abbildung 3.1).

Dreizehn Kinder mussten aus folgenden Gründen aus der Studienanalyse ausgeschlossen werden: Fünf wiesen Mischinfektionen mit zusätzlich *P. malariae* und vier mit zusätzlich *P. ovale* auf. Bei Zweien wurde im Nachhinein eine Parasitämie unter 2000/ $\mu$ L festgestellt, und zwei weitere erbrachen wiederholt die Medikation. Es blieb eine Gesamtzahl von 438 Studienkindern.

Die Kenndaten dieser Kinder unterschieden sich unwesentlich voneinander (Tabelle 3.1).

Studienkinder	Therapiegruppe		
	SP	SP-AQ	SP-AS
Zahl	145	148	145
Anzahl Mädchen (%)	75 (51,7)	72 (48,6)	68 (46,9)
Altersmedian in Monaten (Bereich)	27 (6-59)	27 (6-59)	25 (6-59)
Gewichtsmedian in kg (Bereich)	10,2 (5,5-19,1)	10,0 (5,1-17,4)	10,0 (5,8-16,6)
Mittlere Temperatur in °C (Bereich)	38,8 (37,5-41,0)	38,8 (37,5-41,0)	38,9 (37,5-41,0)
Parasitendichte, geom. Mittel in $\mu$ L (Bereich)	36649 (2068-175333)	36684 (2308-193920)	35619 (3080-179130)
Mittleres Hämoglobin in g/dL (Bereich)	8,1 (5,0-12,9)	7,9 (5,5-12,2)	8,9 (5,0-11,7)
Berichtete und beobachtete Symptome vor Therapie, Anzahl (%)			
Fieberanamnese	145 (100)	148 (100)	145 (100)
Husten	75 (51,7)	69 (46,6)	78 (53,8)
Erbrechen	74 (51,0)	78 (52,7)	73 (50,3)
Durchfall	17 (11,7)	25 (16,9)	24 (16,6)
Bauchschmerzen	4 (2,8)	5 (3,4)	7 (4,8)
Hautausschlag	3 (2,1)	1 (0,7)	5 (3,4)

Tabelle 3.1: **Kenndaten der Studienpopulation;** SP, Sulphadoxin-Pyrimethamin; AQ, Amodiaquin; AS, Artesunat

## 3.2 Studienausschlüsse und Therapieabbrüche

Die Anzahl der Studienkinder verringerte sich während des Studienverlaufes durch Ausschlüsse und Abbrüche nach 14 Tagen auf 93 % der Ausgangszahl (409/438), und auf 89 % (390/438) nach 28 Tagen. Sechs der initial 438 Studienkinder (1,4 %) hatten im Verlauf der ersten 14 Tage durch unerklärtes Nichterscheinen die Therapie und damit auch die Studie abgebrochen: Davon waren 4 Therapieabbrüche in der SP-AS-Therapiegruppe, und jeweils

1 Therapieabbruch in der SP-Gruppe und der SP-AQ-Gruppe (Abbildung 4.1, nicht signifikant). Weitere Therapieabbrüche waren in den weiteren 2 Wochen nicht zu verzeichnen, die Rate der Therapieabbrüche blieb somit unter 10 %.

### **Nach 14 Tagen**

17 Kinder entwickelten in den ersten 14 Tagen zusätzlich fieberhafte Erkrankungen, davon hatten fünf Kinder Masern, fünf eine Otitis media, zwei fieberhafte Durchfälle, vier eine Pneumonie und eines eine Bronchitis. Art und Anzahl der Erkrankungen unterschieden sich zwischen den Studienarmen nicht (Abbildung 4.1). Die Kinder wurden analog der o.g. Ausschlusskriterien aus der Studie ausgeschlossen und entsprechend behandelt. Sieben Kinder entwickelten eine schwere Anämie, definiert durch einen Hb-Abfall  $<5$  g/dL, ohne Parasitämie, jeweils zwischen dem 3. und 8. Tag. Drei dieser Kinder waren in der SP-Gruppe eingeteilt, zwei Kinder jeweils in der SP-AQ- und SP-AS-Gruppe. Aufgrund mangelnder Klassifizierbarkeit wurden sie aus der Studie ausgeschlossen.

### **Nach 28 Tagen**

Nach 28 Tagen betrug die Zahl der Ausschlüsse aus der Studie aufgrund fieberhafter Erkrankungen 42 Kinder. Zusätzlich zu den 24 bereits bis Tag 14 ausgeschlossenen Kindern bekamen 13 Kinder Masern, eines eine Otitis media, zwei fieberhafte Durchfälle und eines eine Bronchitis. Alle Kinder waren zum Zeitpunkt des Ausschlusses aparasitämisch, bis auf eines aus der SP-Gruppe, welches an Tag 19 zusätzlich zu einer Otitis media eine Parasitämie von 80 Parasiten/ $\mu$ L aufwies. Es wurde sowohl gegen die Malaria, als auch gegen die Otits behandelt. Da die Unterscheidung eines klinischen von einem parasitologischen Therapieversagens in diesem Fall nicht möglich ist, wurde dieses Kind aus der Studie ausgeschlossen. Die Anzahl der Ausschlüsse und der Therapieabbrecher zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Therapiegruppen.

Es traten im Verlauf der Studie keine schweren Nebenwirkungen auf, die auf die Studienmedikation zurückzuführen gewesen wären. Fünf Kinder aus der SP-Gruppe, sowie zwei aus der SP-AQ- und eines aus der SP-AS-Gruppe entwickelten milde, selbstlimitierende Hautsymptome wie Pruritus oder einen leichten Ausschlag.

### 3.3 Auswertung der Ergebnisse

Therapieergebnis	Therapiegruppe		
	SP	SP-AQ	SP-AS
14 Tage Verlauf			
ETF % (n/N)	5,2 (7/136)	1,4 (2/141)	0,8 (1/132)
LCF % (n/N)	0 (0/136)	0 (0/141)	0 (0/132)
LPF % (n/N)	8,8 (12/136)	0,7 (1/141)*	2,2 (3/132)* †
ACPR % (n/N)	86,0 (117/136)	97,9 (138/141)*	97,0 (128/132)*
28 Tage Verlauf			
ETF % (n/N)	5,6 (7/126)	1,5 (2/137)	0,8 (1/127)*
LCF % (n/N)	4,0 (5/126)	0 (0/137)*	3,2 (4/127)
LPF % (n/N)	21,4 (27/126)	7,3 (10/137)*	11,0 (14/127)*
ACPR % (n/N)	69,0 (87/126)	91,2 (125/137)*	85,0 (108/127)*
28 Tage Verlauf, PCR-korrigiert			
ETF % (n/N)	5,6 (7/126)	1,5 (2/137)	0,8 (1/127)*
LCF % (n/N)	3,2 (4/126)	0 (0/137)	0 (0/127)
LPF % (n/N)	19,0 (24/126)	4,4 (6/137)*	4,7 (6/127)*
ACPR % (n/N)	72,2 (91/126)	94,1 (129/137)*	94,5 (120/127)*

Tabelle 3.2: **Klassifikation des Therapieergebnisses**; Präsentation der Kumulativdaten, d.h., dass Therapieversager bis Tag 14 auch in die Zählung bis Tag 28 miteingerechnet sind. Prozentangaben sind gerundet, so dass 100 % Quoten in der Summe erreicht wurden. SP, Sulphadoxin-Pyrimethamin; AQ, Amodiaquin; AS, Artesunat; ETF, frühes Therapieversagen; LCF, spätes klinisches Therapieversagen; LPF, spätes parasitologisches Therapieversagen; ACPR, adäquates klinisches und parasitologisches Therapieversagen. \* Signifikanter Unterschied zur SP-Gruppe ( $p < 0,05$ ); † 2 Neuinfektionen einschließend, PCR-korrigierte Ergebnisse: LPF, 0,8 % (1/132), ACPR, 98,5 % (130/132).

#### 3.3.1 Auswertung nach 14 Tagen

Bereits zwei Wochen nach Therapie waren signifikant bessere Heilungsraten unter SP-AQ und SP-AS als unter Therapie mit SP allein zu beobachten (jeweils >95 % versus >85 %). Etwa ein Drittel aller Therapieversager in der SP-Gruppe waren ETF. Insgesamt war die Anzahl an ETF unter Therapie mit SP allein deutlich höher als unter Therapie mit SP-AQ oder SP-AS. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Anzahl der LPF war unter Therapie mit SP signifikant höher als unter SP-AQ oder SP-AS. Keines der Studienkinder mit Therapieversagen entwickelte innerhalb dieser 14 Tage ein LCF, unabhängig von der Therapieart.

### **3.3.2 Auswertung nach 28 Tagen**

Bei den Ergebnissen nach 28 Tagen wurde zwischen mikroskopischen und PCR-korrigierten Ergebnissen unterschieden. Erstere beschreiben den Anteil an Therapieversagen ohne Unterscheidung zwischen Neuinfektionen und Rekrudeszenzen, zweitere den Anteil an Therapieversagern nach Ermittlung von Neuinfektionen mittels PCR.

#### **Mikroskopisch**

Betrachtet man die mikroskopischen Therapieversagerraten, zeigte die Therapie mit SP-AQ mit über 90 % ACPR die beste Wirksamkeit, und SP allein mit weniger als 70 % ACPR weiterhin die schlechteste Wirksamkeit. SP-AS unterschied sich von SP-AQ mit einer um nur 6 % niedrigeren Heilungsrate. Beide Kombinationsregime waren signifikant besser wirksam als SP allein.

Unter Therapie mit SP-AQ traten keine LCF auf. Die Zahl der LCF war unter Therapie mit SP allein und mit SP-AS etwa gleich. Der Unterschied bzgl. der LCF unter Therapie mit SP allein und SP-AQ war signifikant.

Unter Therapie mit SP allein traten etwa doppelt so viele LPF auf, wie unter Therapie mit SP-AS, und etwa dreimal so viele LPF wie unter Therapie mit SP-AQ. Zählt man die Anzahl der ETF, LCF und LPF im jeweiligen Therapiearm zusammen, zeigen sich unter SP allein knapp viermal so viele Therapieversagen wie unter SP-AQ, und doppelt so viele Therapieversagen wie unter SP-AS.

#### **PCR-korrigiert**

In allen Fällen von Therapieversagen wurde zusätzlich mittels PCR unterschieden, ob am Tag des Therapieversagens derselbe Stamm wie am Tag der Aufnahme (Rekrudeszenz) vorlag, oder eine Neuinfektion mit einem neuen Stamm, oder beides. Eine Neuinfektion wurde nicht als Therapieversagen interpretiert und den ACPR zugeordnet (siehe Tabelle 2). Lag beides vor, wurde es als Therapieversagen klassifiziert.

Hierauf zeigten nach PCR-Korrektur SP-AQ und SP-AS, mit jeweils 94 % und 95 % ACPR, eine gleich gute Wirksamkeit gegen unkomplizierte Malaria in Tamale. SP allein wies mit

20% Therapieversagen der behandelten Kinder weiterhin ein signifikant schlechteres Ergebnis auf, als die Kombinationstherapien.

Der Anteil an Neuinfektionen an den mikroskopisch klassifizierten Therapieversagen in allen drei Therapiearmen zusammengenommen betrug nach 14 Tagen 8 % (2/26), nach 28 Tagen 29 % (20/70). Demnach wurden in einem Zeitraum von 28 Tagen etwa ein Drittel aller mikroskopisch evaluierten Therapieversagen fälschlicherweise als solche bestimmt.

Die Zahl der Neuinfektionen war unter Therapie mit SP-AS mit 12 Neuinfektionen dreimal so hoch wie die Zahl der Neuinfektionen in den anderen beiden Therapiearmen, wie die folgende Auflistung zeigt:

SP-Gruppe        3,2 % (4/126)

SP-AQ-Gruppe    2,9 % (4/137)

SP-AS-Gruppe    9,4 % (12/127)

Zudem traten 2 Neuinfektionen unter SP-AS bereits innerhalb von 14 Tagen auf (2 LPF). Weder unter SP-AQ, noch unter SP allein traten im Zeitraum von 14 Tagen Neuinfektionen auf.

Das Verhältnis von Neuinfektionen zu Therapieversagern war unter Therapie mit SP-AS mit 63 % Neuinfektionen signifikant höher als unter SP allein (10 %,  $p=0,0001$ ) oder unter SP-AQ (33 %,  $p=0,1$ ).

### **3.4 Parasiten- und Fieberbeseitigung, Hb-Entwicklung**

In Abb. 3.2 ist der proportionale Anteil an parasitärischen Kindern an den jeweilig untersuchten Tagen aufgezeigt. Es zeigt sich, dass der Anteil der parasitärischen Kinder unter der Behandlung mit SP-AS an Tag zwei und drei signifikant niedriger als in den anderen beiden Therapiegruppen war, an Tag drei sogar gegen null ging, während in der SP- und der SP-AQ-Gruppe noch über 20 % der Kinder noch parasitärisch waren. Der Anteil parasitärischer Kinder an Tag zwei unter Therapie mit SP-AQ war signifikant höher als unter Therapie mit SP allein. An Tag drei war der Anteil unter SP-AQ und SP allein nahezu gleich. Der weitere Verlauf der Kurve korreliert mit den bereits oben beschriebenen Ergebnissen für parasitologische Therapieversager.

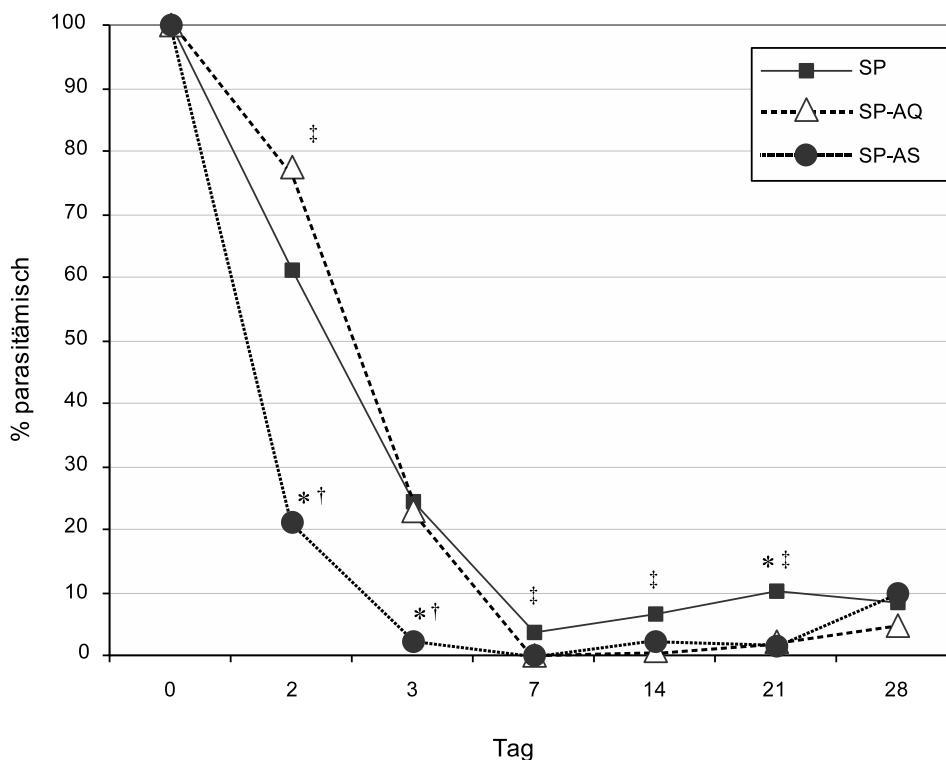


Abbildung 3.2: **Anteil parasitämischer Kinder nach Behandlung**; SP, Sulphadoxin-Pyrimethamin; AQ, Amodiaquin; AS, Artesunat; \* SP-AS vs SP,  $p < 0,05$ ; † SP-AS vs SP-AQ,  $p < 0,05$ ; ‡ SP-AQ vs SP,  $p < 0,05$ .

Fieber war neben Einschlußkriterium auch der Diagnoseparameter eines klinischen Therapieversagens. Von Interesse war die Geschwindigkeit, in der die jeweiligen Therapieregime ein Kind von Fieber befreien, als Indiz für die klinische Wirksamkeit der Medikation. Die in Abb. 3.3 aufgezeigten Proportionen febriler Kinder zeigt im Vergleich zu den beiden Kombinationstherapien einen signifikant höheren Anteil febriler Kinder an Tag eins, zwei und auch noch an Tag drei unter Therapie mit SP allein.

Ein weiterer Anhalt für ein gutes Therapieansprechen ist das hämatologische Ansprechen im Sinne eines Hb - Anstieges. Der individuelle Anstieg des Hb im Median war an Tag 14 in der SP-Gruppe signifikant niedriger (0,3 g/dl; Bereich -2,7 bis 3,3) als in der SP-AQ-Gruppe (0,7 g/dL; Bereich -3,2 bis 3,1;  $p=0,03$ ) und deutlich, wenn auch nicht signifikant, niedriger als in der SP-AS-Gruppe (0,4 g/l; -2,8 bis 3,3;  $p=0,4$ ). Der Hb-Wert am Ende der Studie nach 28 Tagen in den drei Therapiearmen unterschied sich nur unwesentlich voneinander (SP: 0,9 g/dl; -1,6 bis 5,3; SP-AQ: 1,4 g/dl; -2,7 bis 4,3; SP-AS: 1,3 g/dl; -1,8 bis 4,8).



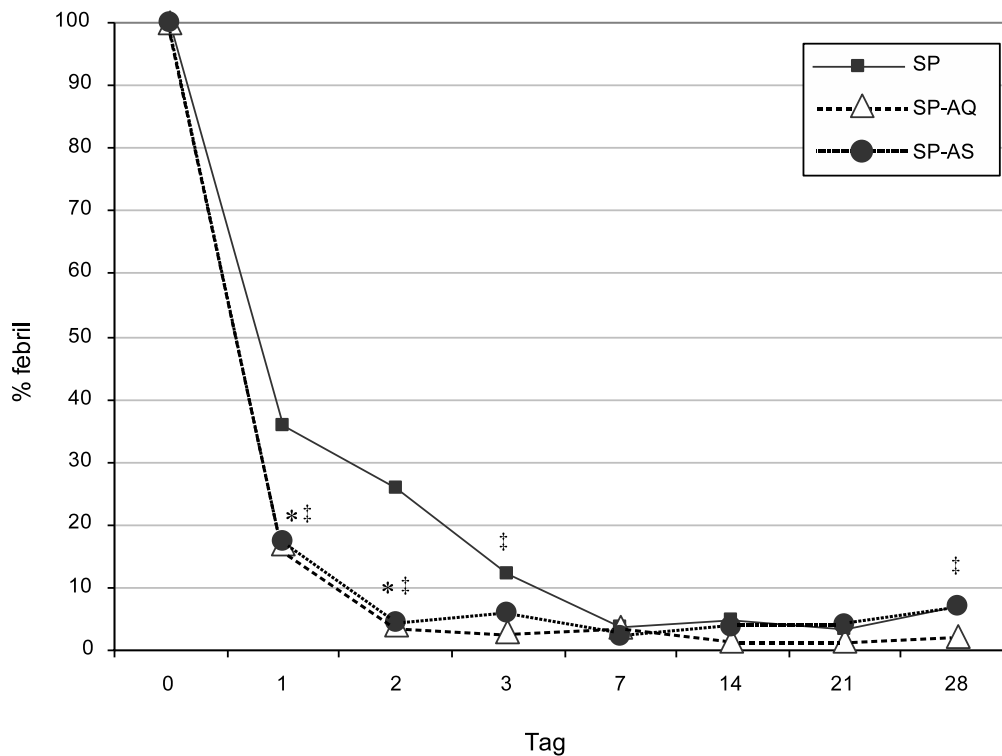


Abbildung 3.3: **Anteil fieberhafter Kinder nach Therapie**; SP, Sulphadoxin-Pyrimethamin; AQ, Amodiaquin; AS, Artesunat; \* SP-AS vs SP,  $p < 0,05$ ; † SP-AS vs SP-AQ,  $p < 0,05$ ; ‡ SP-AQ vs SP,  $p < 0,05$ .

### 3.5 Gametozyten

Es wurden mikroskopisch sowohl die Gametozytenprävalenz, als auch die Gametozytendichten in Gametozyten/ $\mu\text{L}$  an Tag null und Tag sieben in den drei Therapiegruppen miteinander verglichen. Die Gametozytenprävalenz und -dichte am Tag der Aufnahme wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Therapiegruppen auf, wie Tabelle 3.3 zeigt. Auf alle Studienkinder bezogen betrug die Gametozytenprävalenz insgesamt 17,3 % (78/450), die Gametozytendichte im geometrischen Mittel 41,4 Gametozyten/ $\mu\text{L}$  (95 % Konfidenzintervall, 33,1 - 51,7).

Die höchste Gametozytenprävalenz zeigte sich in der SP-Gruppe an Tag sieben mit einem mehr als dreimal so hohen Anteil an Gametozytenträgern wie an Tag null. In der SP-AQ Gruppe verdoppelte sich posttherapeutisch der Anteil der gametozytenträgenden Kinder, in der SP-AS Gruppe trugen anteilig etwa genausoviele Kinder Gametozyten wie zu Beginn der Behandlung. Vergleicht man die Gametozytenprävalenz unter den drei Therapiearmen an

Tag sieben, trugen fast doppelt so viele Kinder in der SP Gruppe wie in der SP-AQ-Gruppe und mehr als dreimal so viele Kinder wie in der SP-AS-Gruppe Gametozyten (siehe Tabelle 3.3). Die Unterschiede der Kombinationsregime untereinander, sowie jeweils im Vergleich mit SP allein waren signifikant ( $p < 0,001$  in allen Vergleichen).

Bezüglich der Gametozytendichten war in der SP-Gruppe im Mittel eine Verdoppelung dieser an Tag sieben im Vergleich zu Tag null zu sehen, während unter den Kombinationsregimen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gametozytendichten an Tag null und sieben zu verzeichnen waren. Im Vergleich der drei Therapieregime untereinander an Tag sieben war die Gametozytendichte im SP-Arm signifikant höher als im SP-AQ- ( $p < 0,001$ ) oder SP-AS-Arm ( $p = 0,004$ ). Der Unterschied zwischen den beiden Kombinationstherapien dagegen war nicht signifikant ( $p = 0,9$ ).

Parasitendichte, Alter, Geschlecht sowie die vorherige Einnahme von Chloroquin hatten keinen Einfluß auf die Relation zwischen Therapie und Gametozytenprävalenz oder -dichte an Tag sieben.

	Therapiegruppe		
	SP	SP-AQ	SP-AS
G-Prävalenz, % (n/N) d0	18,0 (27/150)	15,3 (23/150)	18,7 (28/150)
G-Prävalenz, % (n/N) d7*	63,5 (66/104)	33,9 (40/118)	14,7 (15/102)
G-Dichte, gM, (95 % CI) d0	50,3 (34,2-74,0)	42,4 (26,0-69,0)	33,5 (24,0-46,8)
G-Dichte, gM, (95 % CI) d7	105,9 (72,9-153,9)	34,4 (26,7-44,3)†	38,5 (20,2-73,4)‡

Tabelle 3.3: **Gametozytenprävalenz und -dichte an den Tagen 0 (bei Rekrutierung) und 7 (posttherapeutisch)**; SP, Sulphadoxin-Pyrimethamin; AQ, Amodiaquin; AS, Artesunat; G, Gametozyten; gM, geometrisches Mittel; 95 % CI, 95 % Konfidenzintervall; \*  $p < 0,001$  in allen Vergleichen (SP/SP-AQ, SP/SP-AS, SP-AS/SP-AQ); † Vergleich mit SP allein,  $p < 0,001$ ; ‡ Vergleich mit SP allein,  $p = 0,004$ .

# Kapitel 4

## Diskussion

Zunächst werden Aspekte bzgl. des in vorliegender Studie angewandten Protokolls und der vor Ort gegebenen Rahmenbedingungen beschrieben. Es folgt die Diskussion der Ergebnisse und der sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen.

### 4.1 Diskussion von Studienprotokoll und Rahmenbedingungen

Die Ergebnisse einer Wirksamkeitsprüfung von Medikamenten bleiben nicht unbeeinflusst von Faktoren, die von der eigentlichen Wirksamkeit der Medikamente unabhängig sind. Im Folgenden sollen Einflüsse des standardisierten Studienprotokolls sowie der Bedingungen des Studienumfeldes diskutiert werden.

#### 4.1.1 Studienprotokoll

Die vorliegende Studie orientierte sich an dem 1996 durch die WHO erstellten Protokoll zur Untersuchung der Wirksamkeit von Malariamedikamenten gegen unkomplizierte Malaria tropica [104].

Ziel der WHO sind regelmäßige Wirksamkeitsprüfungen aktueller Malariamedikamente zur Sicherung eines anhaltenden Nutzens dieser, bzw. zur rechtzeitigen Aufdeckung intolerabler Resistenzprofile unter einer Standardtherapie, die einen Therapiewechsel notwendig machen.

Ebenso ist es Ziel, alternative Therapieregime in ihrer Wirksamkeit zu prüfen. Demzufolge sollen solche Wirksamkeitsstudien die Leitlinienerstellung zur Therapie der unkomplizierten Malaria auf nationaler Ebene unterstützen.

Das WHO-Protokoll von 1996 wurde für die vorliegende Studie ergänzend modifiziert, diese Änderungen entsprachen im Wesentlichen denen des Protokolls von 2003 [20], das dem Studienteam bereits vor Durchführung der Untersuchung vorlag.

## **28-Tage-Protokoll**

Der Zeitraum der Verlaufskontrollen wurde auf 28 Tage verlängert. Ein 14-Tage-Protokoll in Regionen intensiver Transmissionsraten unterschätzt den Anteil an Therapieversagern, unabhängig von der Art des Malariamedikamentes. Mehrere Studien konnten dieses belegen [67, 110, 111, 112]. Dies trifft sowohl für lang- als auch für kurzwirksame Medikamente zu, und hängt u.a. mit deren Parasiten-Reduktionsrate (PRR) zusammen, also der Anzahl der durch das Medikament eliminierten Parasiten pro asexuellem Zyklus. Einen weiteren Einfluß haben die Eliminationshalbwertszeit der jeweiligen Medikamente sowie die zum Zeitpunkt der Therapie vorliegende Parasitendichte [113]. In vorliegender Studie war in allen Therapiearmen der Anteil an Rekrudeszenzen nach 28 Tagen wesentlich höher als nach 14 Tagen. Unter Medikamenten mit einer geringen PRR und einer langen Eliminationshalbwertszeit, wie z.B. SP, dauert es länger, bis resistente Stämme zum Vorschein kommen. Bei hohen Parasitendichten besteht die Gefahr, dass das langsam wirkende und langsam eliminierte Medikament in seinen Blutkonzentrationen unter die therapeutische Schwelle fällt, bevor alle Parasiten eliminiert sind. Die Folge sind Rekrudeszenzen. In beiden Fällen sähe man die Rekrudeszenzen erst nach 14 Tagen.

## **Unterscheidung Rekrudeszenz und Neuinfektion**

Je nach Definition der „effektiven Malariatherapie“ stellt sich in einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen die Problematik der Unterscheidung von Neuinfektionen und Rekrudeszenzen. Man hat festgestellt, dass Kinder in Hochendemiegebieten bis zu dreimal am Tag einen infektiösen Stich erleiden können [18]. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kind in hochendemischen Regionen erneut infiziert wird und innerhalb von 28 Tagen nach Therapie an Malaria erkrankt sehr hoch. Dabei spielt zunächst keine Rolle, ob diese zweite

Malaria-Episode durch einen von Vorneherein gegen das noch im Blut kursierende Medikament resistenten Parasitenstamm erfolgt, oder ob sensible Parasiten auf subtherapeutische Medikamentespiegel treffen, was v.a. in der zweiten Hälfte der Beobachtungszeit der Fall sein könnte. In beiden Fällen würde mittels PCR eine Neuinfektion detektiert, welche ohne diese Unterscheidung fälschlicherweise als Rekrudescenz und damit Therapieversagen gedeutet würde. Die betroffenen Kinder leiden, unabhängig davon ob es ein neuer oder ein rekrudescender Stamm ist, innerhalb eines Monats, an einer zweiten Episode Malaria. Folglich ist es klinisch gesehen eigentlich irrelevant ob diese zweite Episode einer Neuinfektion oder einem Therapieversagen zugrunde liegt. Daher werden in der Literatur wie auch hier sowohl PCR-korrigierte als auch -unkorrigierte Heilungsraten angegeben, um die biologisch korrekte Rate an ACPR als auch die für die betroffenen Kinder klinisch wichtige Heilungsrate abschätzen zu können.

Bei der Interpretation der Ergebnisse nach 28 Tagen wäre es in Hochendemiegebieten folglich wichtig neben der Wirksamkeit der jeweils untersuchten Medikamente auch deren prophylaktische Fähigkeiten zu evaluieren, mit Hilfe derer Neuinfektionen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes verhindert werden könnten. Ihr Auftreten ist von der regionalen Resistenzrate und von der PRR der untersuchten Medikamente abhängig.

### **Schwere Anämie**

In vorliegender Studie wurden sieben Kinder mit schwerer Anämie zwischen Tag drei und acht ausgeschlossen. Fieber und Parasitämie bestanden nicht. Diese sieben Kinder erfüllten keines der im Protokoll genannten Klassifizierungsmöglichkeiten und wurden deshalb ausgeschlossen.

Bei einem Mädchen dieser sieben Kinder lag eine homozygote Form der aber an sich milden A-Form von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (G6PD) vor. Eine Medikamenten-nebenwirkung im Sinne einer SP-induzierten Hämolyse kann folglich nicht ausgeschlossen werden. Bei einer Prävalenz von drei Prozent homozygoten G6PD-Mangels in Ghana [114] erscheint das Problem SP-induzierter Hämolyse jedoch nicht gewichtig.

Anämie ist eine klassische Folge wiederholter Malariainfektionen und subklinischer Parasitämien sowie Knochenmarkdepression durch repetitive Infekte [18]. Der Hämoglobinwert des in einem Malariaendemiegebiet häufig bis regelhaft anämischen Kindes, das aufgrund mit der

Malaria einhergehenden Durchfalls und Erbrechen meist zusätzlich dehydriert ist, erscheint häufig initial unecht „hoch“. Die medikamentöse Therapie ruft eine zusätzliche Hämolyse der befallenen Erythrozyten hervor, gleichzeitig wird das Kind aktiv rehydriert und nimmt unter der einsetzenden klinischen Besserung wieder vermehrt Nahrung und Flüssigkeit zu sich. Dass demzufolge der Hämoglobinwert unter Therapie zunächst weiter abfällt ist vorstellbar, ohne dass es bedeuten muss, dass die Therapie unwirksam ist. In Hochendemiegebieten, in denen durch Adaptationsmechanismen die Toleranz gegenüber sehr niedrigen Hb-Werten höher ist, als z.B. in Niedrigendemiegebieten, könnte es sinnvoll sein zur Definition der schweren Anämie unter Therapie zusätzlich klinische Aspekte mit einfließen zu lassen.

### **4.1.2 Rahmenbedingungen der Studie**

Ein Merkmal des Studiengebietes, wie es für weiteste Teile Afrikas der Fall ist, ist die Armut der Region. Fehlende Infrastruktur und Bildung mit einem hohen Anteil an Analphabetismus der Bevölkerung sind unter anderem die Folge.

#### **Begrenzung der Mittel**

In vorliegender Studie konnte zusätzlich zu den o.g. Protokollvorschlägen durch Randomisierung, Doppelverblindung und Plazebokontrolle die Zuverlässigkeit der Ergebnisse sichergestellt werden. Mit Hilfe eines großen Teams konnte der Ablauf von Rekrutierung und Folgeuntersuchungen über 28 Tage optimiert werden. Plazebokontrollen, Doppelverblindung und eine große Teamzahl, mikroskopische und genetische Untersuchungen, Gewährleistung der Instandhaltung von Gerätschaften und geschultes Personal führen zu einem Kostenaufwand, der in Nordghana durch das dortige Gesundheitswesen oder durch die lokale Universität allein nicht finanzierbar ist. Studien zur regelmäßigen Überwachung der Wirksamkeit der Standardmedikamente sollten idealerweise einfachen Protokoll-Strukturen folgen, wie von der WHO empfohlen [20], und werden dennoch weiterhin lange von finanzieller Unterstützung durch internationale Organisationen abhängig sein.

Folglich wird es zur Kontrolle der Malaria weiterhin über einen langen Zeitraum hinweg ein abhängiges Verhältnis zwischen den südlich der Sahara gelegenen Ländern Afrikas und den Industrienationen geben.

## **Ausschluss aufgrund fieberhafter Erkrankungen**

Die verhältnismäßig hohe Anzahl an gewöhnlichen Infektionskrankheiten, häufig einhergehend mit Mangelernährung, spiegeln den hohen Grad an Kindermorbidität in der Region von Tamale wider [103, 115].

Mit 44 Kindern mussten unerwartet viele Kinder aus dieser Studie ausgeschlossen werden. Hauptgrund waren fieberhafte Infektionen wie Pneumonien, Dysenterien und gegen Ende der Studie eine Ansteckungswelle mit Masern, welche zum Ausschluss von 16 Kindern führte. Solch eine Epidemie konnte bei schlechten Isolierungsmöglichkeiten in dem Gesundheitszentrum kaum verhindert werden. Sie spiegelt die schlechte Durchimpfung der Kinder gegen Masern wider.

## **Kooperation**

Ghana zählt weiterhin zu den friedlichsten und kooperationsbereitesten Ländern Westafrikas und bietet dadurch Forschungsgruppen und (nicht)staatlichen Organisationen friedliche Bedingungen für Forschungsprojekte. Dennoch muss auch in dieser Region mit Kooperationsproblemen mit den lokalen Institutionen gerechnet werden. Letztendlich haben diese dazu geführt, dass das Projekt Normap, dem die vorliegende Studie unterlag, im Jahre 2006 beendet wurde.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Im Jahr 2000 haben Ehrhardt *et al.* in Tamale parasitologisches Therapieversagen in 57 % binnen 14 Tagen nach Therapie mit CQ aufzeigen können [7]. Nach dem 2003 aktualisierten WHO-Protokoll soll eine neue Standardtherapie etabliert werden, wenn in Gebieten mit hoher Transmissionsrate eine parasitologische Therapieversagerrate von mehr als 25 %, oder eine klinische Therapieversagerrate von  $\geq 15$  % vorliegen [20]. 2006 verschärfte die WHO diese Leitlinien. Hiernach sollte eine Standardmedikation gegen Malaria dann geändert werden, wenn ihre Therapieversagerrate 10 % übersteigt. Das neue Standardmedikament sollte durchschnittlich mindestens 95 % Heilungsraten erreichen. Ein Partnermedikament als Bestandteil einer Kombinationstherapie sollte Heilungsraten von weniger als 80 % nicht unterschreiten [19]. Bereits nach den WHO-Kriterien von 2003 war zum dem Zeitpunkt der

Studiendurchführung die Einführung eines neuen Standardmedikamentes für die Region von Tamale indiziert.

Die vorliegende Studie war zu dem Zeitpunkt der Durchführung im Jahr 2002 die erste Therapiestudie in Westafrika, welche Plazebo-kontrolliert und doppelblind SP, SP-AQ und SP-AS miteinander verglich. Primärer Endpunkt war die Wirksamkeit der drei Therapieoptionen im Vergleich. Sekundäre Endpunkte waren Evaluation von Parasiten- und Fieberbeseitigung, sowie Hb-Entwicklung unter Therapie.

Die Untersuchungen ergaben kurz zusammengefasst folgende Ergebnisse:

1. SP allein zeigte mit 28 % Therapieversagen eine signifikant schlechtere Wirksamkeit als die beiden Kombinationsregime. Zudem war es diesen auch in Fieberbeseitigung, Parasitenbeseitigung und Hb-Entwicklung unterlegen. Hiernach ist SP allein als Standardmedikament gegen die unkomplizierte Malaria tropica im Studiengebiet und nach WHO-Leitlinien obsolet.
2. SP-AQ und SP-AS zeigten nach Ausschluß der Neuinfektionen gleichgute Ergebnisse mit Heilungsraten von jeweils 95 % und 94 %. Damit erfüllten sie weitestgehend die WHO-Vorgaben für ein neues Standardmedikament gegen die unkomplizierte Malaria tropica.
3. Unter Therapie mit SP-AS traten dreimal so viele Neuinfektionen auf wie unter Therapie mit SP allein oder SP-AQ.
4. SP-AS bewirkte eine schnellere Parasitenbeseitigung als SP-AQ. Bzgl. der Fieberbeseitigung und Hb-Entwicklung erzielten beide Kombinationsregime gleichgute Ergebnisse.

#### **4.2.1 Vergleich der Therapieregime**

Trotz ähnlich guter Wirksamkeit gegen *P. falciparum* weisen die beiden Kombinationsregime in ihren Eigenschaften Unterschiede auf, die sie für den Einsatz in bestimmten Regionen mehr oder weniger prädestinieren. Im Folgenden sollen die Eigenschaften von SP, SP-AQ und SP-AS, sowie die sich daraus ergebenden Vor- und Nachteile diskutiert werden. Anschließend sollen die Therapieregime im Lichte der Entwicklungen der letzten Jahre sowie des aktuellen Forschungsstandes und der Entwicklungen der Malariapolitik diskutiert werden.



## Sulphadoxin-Pyrimethamin

Für SP konnte in vorliegender Studie gezeigt werden, dass es als Alternative zu CQ aufgrund einer bereits ausgeprägten Resistenzrate ungeeignet ist. 2002 konnten Driessen *et al.* in Zentralghana ebenfalls eine Therapieversagerrate von 26 % innerhalb von 28 Tagen unter SP aufzeigen [116].

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, vermutet man nach neuen Erkenntnissen die Ausbreitung desselben gegen SP resistenten Haplotypen asiatischen Ursprungs westwärts nach Afrika [62]. Mockenhaupt *et al.* (2005) konnten diesen resistenten Genotyp in der hiesigen Patientenpopulation unter den Therapieversagern ebenfalls nachweisen [117]. Die ausgeprägte Resistenzlage gegen SP hat sich, zunächst in Südostasien und später in Afrika, im Vgl. zu CQ in einem relativ kurzen Zeitraum gebildet [118]. Nach neuen Erkenntnissen kommen ursächlich hierfür mehrere Faktoren in Frage: Ein hoher Gen-Fluß im Sinne einer interkontinentalen Ausbreitung dieses resistenten Haplotypen, eine kontinuierliche Selektion resistenter Parasitenstämme durch verbreitete Verabreichung von SP, sowie deren Eigenschaft einer gesteigerten Gametozytogenese mit konsekutiver Steigerung der Übertragung in Gebieten mit hohen Transmissionsraten [62].

2004 wurde in Ghana sowie in vielen Ländern Afrikas die intermittierende präventive Therapie mit SP von Malaria in der Schwangerschaft (IPTp, engl.: intermittent preventive treatment in pregnancy) eingeführt [119]. Mockenhaupt *et al.* (2008) konnten nach der Untersuchung von *P. falciparum*-Isolaten schwangerer Frauen aus den Jahren 1998, 2000 und 2006 eine Verdoppelung der Prävalenz der mit SP assoziierten *dhfr*-Triplemutationen von 1998 bis 2006 zeigen. Dabei unterschied sich 2006 die Prävalenz der Resistenzmutation in den Isolaten von Frauen in frühem Gestationsalter, von Erstgebärenden und von Frauen, die bereits in vorangegangenen Schwangerschaften IPTp erhalten hatten, kaum voneinander [120]. Dies läßt vermuten, dass IPTp nicht zu einer weiteren Selektion mutierter Parasitenstämme beiträgt. Fatal ist diese Entwicklung im Hinblick auf das Versagen von SP als Malariaprophylaxe bei schwangeren Frauen und vor dem Hintergrund weitgehend fehlender Alternativen für eine medikamentöse IPTp [120, 121].

Um hohe Therapieversagerraten zu vermeiden und um die Entwicklung von Resistenzen durch Selektion nicht zu fördern, sollte nach WHO-Empfehlung ein Partnermedikament eines Kombinationsregimes Heilungsraten von 80 % nicht unterschreiten [19]. SP zeigte in der

Region von Tamale eine Heilungsrate von 72 % und in Zentralghana von 74 % [116]. Damit ist SP nach WHO auch als Bestandteil einer Kombinationstherapie in Ghana nicht mehr geeignet. Um eine Selektion von resistenten Parasitenstämmen zu vermeiden und SP für die IPTp zu erhalten, müßte das Medikament in Ghana aus dem Verkehr gezogen und höchstens noch für die IPTp genutzt werden. Dieses durchzusetzen erscheint schwierig.

Im Folgenden soll u.a. diskutiert werden, ob die genannte 80 %-Grenze für eine Kombination mit AS und AQ gleichermaßen sinnvoll ist.

### **Sulphadoxin-Pyrimethamin - Artesunat**

SP-AS zeichnete sich in vorliegender Studie neben seiner guten Wirksamkeit durch eine schnelle Parasitenbeseitigung aus, was auch viele andere Studien für Artemisinine belegen konnten [110, 111, 122, 123, 124]. Diese Eigenschaft erklärt am ehesten den niedrigen Anteil an ETF unter Therapie mit SP-AS.

Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit erzwingen Artemisinine die Kombination mit einem weiteren Medikament. Studien, die die Wirksamkeit einer Artemisinin-Monotherapie untersuchten, zeigten, dass AS über mindestens sieben Tage gegeben werden muss, um eine Malaria tropica erfolgreich zu behandeln. Ein vorzeitiger Abbruch dieser langen Therapie, provoziert durch schnelle Besserung der klinischen Symptome, führt zu hohen Therapieversagerraten, ohne dass Resistenzen bestehen müssen [125, 126].

White *et al.* (1999) postulieren, dass Artemisinine aufgrund der schnellen Parasitenbeseitigung trotz der kurzen Eliminationshalbwertszeit mit einem Medikament kombiniert werden können, gegen das bereits Resistenzen bestehen. In Südostasien hat die Kombination von AS mit MQ sogar wieder zur Abnahme der Resistenzraten gegen MQ geführt [94]. Dies setzt jedoch entweder niedrige Transmissionsraten oder niedrige Resistenzraten gegen das Kombinationsmedikament voraus [94, 122]. Das Risiko, dass ein resistenter Stamm, trotz schneller Parasitenbeseitigung durch das Artemisinin, zufällig selektiert wird und damit auf das länger wirksame Medikament trifft, gegen das er resistent ist, wird als gering eingeschätzt, solange die Resistenzrate in der jeweiligen Region gering ist. Dies veranschaulicht den Einfluß der Resistenzrate auf die Wirksamkeit von ACT. Das Risiko, dass eine Person wenige Tage nach Therapiebeginn mit einem (teil)resistenten Parasitenstamm neuinfiziert wird, wenn das Artemisinin bereits eliminiert ist und die Spiegel des langsam eliminierten Medikamentes noch

abfallen, wird als gering eingeschätzt, solange die Transmissionsraten gering sind [94]. Letzterer Punkt ist für weite Teile Asiens der Fall, in Afrika eher nicht. In dem beschriebenen Kontext ist die hohe Rate an Neuinfektionen unter SP-AS in vorliegender Studie bedenklich. Sie weist hin auf eine zu hohe Resistenzrate, um SP in diesem Hochendemiegebiet noch mit AS kombinieren zu können.

Andere Studien in hochendemischen Gebieten Afrikas mit bereits bestehenden Resistenzen gegen u.a. SP zeigten ähnliche Ergebnisse für verschiedene Kombinationsregime [127]. Hieraus folgt, dass die Kombination SP-AS im hochendemischen Ghana mit bestehender SP-Resistenz als neues Standardmedikament gegen unkomplizierte Malaria als ungeeignet anzusehen wäre. Eine weitverbreitete Anwendung hätte wahrscheinlich eine weitere Selektion und Verschärfung von SP-Resistenzen zur Folge, was SP in der Kombination SP-AS, wie auch als Medikament der IPTp, bald wirkungslos machen würde. Die Kombination SP-AS käme dann einer dreitägigen AS-Monotherapie gleich, die Rekrudenzraten würden kontinuierlich steigen, ohne dass es Resistenzen im eigentlichen Sinne gegen AS geben muß. Folglich würden die Kinder wieder häufiger an Malaria erkranken, sei es nun an einer neuen Infektion, oder an einer wiederaufflammenden vorhergegangenen. Zudem würde SP mit der Zeit für die IPTp ausfallen. Womöglich wäre es eine Frage der Zeit, bis sich Resistenzen gegen AS ausbilden, das in Kombination mit SP quasi als Monotherapeutikum fungierte. Ein anschauliches Beispiel für diese Entwicklungsform zeigen die Länder Ostafrikas, in denen SP-AS die Kriterien der WHO nicht mehr erfüllt und als Standardtherapie innerhalb weniger Jahre obsolet geworden ist [128, 129].

Einige weitere Nachteile von Artemisininen wurden bereits zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie im Jahr 2002 diskutiert, und sind in den vergangenen vier bis fünf Jahren offensichtlich geworden:

1. Artemisinine sind im Vergleich zu CQ, SP oder AQ wesentlich teurer, so kosten Chinin, CQ, SP und AQ 0,13 - 0,2 US-Dollar, subventionierte ACTs dagegen 0,5 - 3 US-Dollar pro Therapie [3]. Für die Bevölkerung sind selbst subventionierte ACTs somit teurer als die zuvor erhältlichen Medikamente. Für die nationalen Gesundheitssysteme betroffener Länder können dagegen weitreichende finanzielle Mittel für die Beschaffung durch den Global Fund bereitgestellt werden. Die Mehrzahl der Malariabehandlungen findet jedoch weiterhin außerhalb der regulären Gesundheitssysteme statt [130]

2. Artemisinine sind auf dem afrikanischen Kontinent noch nicht überall erhältlich wie Chinin, CQ, SP oder AQ. Es muß zunächst in ausreichenden Mengen produziert, und schließlich der breiten Bevölkerung zugänglich gemacht werden [131, 132]. Auch dies ist mit hohen Kosten und zeitlichem Verzug bei der Umsetzung verbunden.

3. Im Januar 2009 sind erste Resistenzen gegen AS an der thailändisch-kambodschanischen Grenze gesichert worden [89]. Auf dem afrikanischen Kontinent gibt es bislang dafür noch keinen Anhalt. Betrachtet man die Entwicklungen in der Geschichte der Malariatherapie der letzten Jahrzehnte, besonders im Hinblick auf SP und auf die Entwicklungen in Südostasien, ist die Befürchtung, dass sich die südostasiatischen AS-Resistenzen interkontinental westwärts ausbreiten, nicht unbegründet [62, 133].

### **Sulphadoxin-Pyrimethamin - Amodiaquin**

Wie in vorliegender Studie konnte SP-AQ auch in anderen Studien eine gute Wirksamkeit gegen *P. falciparum* bescheinigt werden, sowohl in Regionen mit, als auch ohne vorbestehende Resistenzen gegen SP oder AQ [67, 112]. PCR-korrigiertes und unkorrigiertes Ergebnis für SP-AQ unterschieden sich in vorliegender Studie kaum. Es kam zu signifikant weniger Neuinfektionen als unter SP-AS. Dieser Vorteil konnte andernorts ebenfalls beobachtet werden [110, 111]. Man vermutet, dass durch die im Vgl. zu AS längere Halbwertszeit von AQ ein Teil der Neuinfektionen durch gegen SP resistente Stämme verhindert werden, und umgekehrt [134]. Zudem scheint die Wirkung beider langsam eliminierten Medikamente auszureichen um die gegen das jeweilige Partnermedikament resistenten Parasiten zu beseitigen [134, 135, 136, 137]. Folglich birgt SP-AQ zwei Vorteile gegenüber SP-AS: Es schützt länger vor einer Neuinfektion, und es verhindert die Selektion von resistenten Stämmen gegen SP oder AQ, wodurch das Reservoir der SP- bzw AQ-resistenten Stämme in der Region möglicherweise klein gehalten werden kann. Da allerdings sowohl gegen SP allein als auch gegen AQ allein bereits Resistenzen in Ghana bekannt sind [116, 138], drängt sich die Frage auf, wie lange es dauern wird, bis SP-AQ durch Selektion von Stämmen, die gegen beide Medikamente resistent sind, unwirksam wird. In weiten Teilen Ostafrikas ist diese Kombination bereits nicht mehr ausreichend wirksam und ACT unterlegen [128].

Ein wesentlicher Vorteil von SP-AQ gegenüber SP-AS liegt in der Erhältlichkeit und Er-schwinglichkeit von SP und AQ. Beide Medikamente sind bereits überall in Afrika erhältlich

und müssen nicht erst massenhaft produziert werden. Sie sind erheblich kostengünstiger als alle ACT [3]. SP-AQ zeigte sich hinsichtlich seiner Fieberbeseitigung ebenso effektiv wie SP-AS. Dies konnte in anderen Studien ebenfalls beobachtet werden [111] und wird am ehesten auf die antiinflammatorische Wirkung von AQ zurückgeführt. Bzgl. der Parasitenbeseitigung war SP-AQ deutlich langsamer wirksam als SP-AS. Dennoch scheint, wie in vorliegender und in anderen Studie beobachtet, das Risiko, unter SP-AQ ein ETF zu entwickeln, sehr gering [110, 111].

SP-AQ ist von einigen Studiengruppen bereits 2002 als geeignete Interimslösung propagiert worden [67, 112]. Kayentao et al. (2009) konnten in Mali für SP-AQ im Vgl. zu ACT sogar höhere Heilungsraten aufzeigen [134]. Auch in anderen Ländern Westafrikas konnte eine vergleichbar gute und teilweise bessere Wirksamkeit von SP-AQ im Vgl. zu ACT gezeigt werden [135, 136, 139]. Diese Ergebnisse sprächen für die Einsetzbarkeit von SP in Kombination mit einem Partnermedikament, das eine ähnlich lange Eliminationshalbwertszeit aufweist. Die Tatsache, dass weniger Rekrudeszenzen und weniger Neuinfektionen unter SP-AQ auftreten, zeigt, dass die resistenten Stämme erfolgreich unterdrückt, und zudem die betroffenen Kinder über einen längeren Zeitraum vor einer weiteren Malaria geschützt werden. Dies gilt jedoch v.a. für hochendemische Regionen. Zudem sind die regionalen Unterschiede auch hier groß, was eine Evaluation von SP-AQ für jede Region individuell bedingt.

## **Nebenwirkungen**

Die Therapieregime in vorliegender Studie wurden insgesamt gut vertragen. Es wurden keine schweren medikamenteninduzierten Nebenwirkungen beobachtet. Weder gab es klinisch einen Anhalt für medikamenteninduzierte Hepatitis oder schwere anhaltende Neutropenie unter Therapie mit AQ, noch gab es einen Anhalt für toxische kutane Nebenwirkungen unter Therapie mit SP, noch für Nebenwirkungen irgendeiner Art nach AS-Einnahme. Auf laborchemische Kontrollen musste aufgrund mangelnder Ressourcen verzichtet werden. Bereits in anderweitig durchgeführten Studien spielten schwere Nebenwirkungen dieser Medikamente keine Rolle [122, 126]. SP und AQ, welche als Chemoprophylaxe aufgrund ihrer bekannten schweren Nebenwirkungen vom deutschen Markt genommen wurden, haben sich in der Kurzzeittherapie als nebenwirkungsarm erwiesen. Von einer Anwendung von AQ oder SP als Malariaphylaxe mit einhergehenden längeren Behandlungszeiträumen wird abgeraten

[35, 92]. Für AS sind bislang keine Nebenwirkungen bekannt, mit Ausnahme berichteter Fälle von Ototoxizität in Mosambik [80], die andernorts jedoch noch nicht beobachtet werden konnten. Die Tatsache dass Nebenwirkungen für AS noch weitestgehend unbekannt sind, fordert eine besondere Aufmerksamkeit gegenüber diesem Medikament.

## **Gametozytämie**

In der vorliegenden Studie waren Gametozytenprävalenz und -dichte unter SP allein sieben Tage nach Therapiebeginn signifikant angestiegen. Vorangegangene Studien konnten das gleiche Phänomen beobachten, eine kausale Erklärung für die gesteigerte Gametozytengese gibt es bislang nicht und ist dem Medikament SP eigen [17, 75, 122].

Im Vergleich zu SP allein konnte posttherapeutisch sowohl unter SP-AQ als auch unter SP-AS eine signifikant niedrigere Gametozytenprävalenz und -dichte gesehen werden. Für sich betrachtet war unter SP-AQ die Gametozytenprävalenz nach sieben Tagen tendenziell angestiegen. Unter SP-AS blieb die Gametozytenprävalenz etwa gleich, was die Hemmung der Gametozytengese durch Artemisinine widerspiegelt [74, 75]. Demzufolge hatten unter SP-AS weniger Kinder nach Therapie Gametozyten als vor der Therapie. Unter SP-AQ hatten mehr Kinder nach Therapie Gametozyten als vor Therapie, insgesamt waren es jedoch weniger Kinder als unter SP allein. Bezüglich der Gametozytendichte waren ebenfalls beide Kombinationsregime SP gegenüber überlegen. Entgegen der Erwartungen auf der Grundlage von Beobachtungen anderer Studien, die eine Reduktion der Gametozytendichte unter SP-AS, nicht aber unter SP-AQ feststellten, wurde in vorliegender Studie unter SP-AS ein tendenzieller Anstieg und unter SP-AQ ein tendenzieller Abfall der Gametozytendichte unter Therapie festgestellt.

Eine Reduktion der Gametozytenprävalenz und -dichte führt nachgewiesenermaßen zu einer Reduktion der Infektivität gegenüber den Moskitos, und damit zu einer Reduktion der Transmissionsraten [17, 75, 122]. Durch die im Vgl. zu SP allein posttherapeutisch geringere Prävalenz und Dichte von Gametozyten unter den beiden Kombinationsmedikamenten sind diese einer Therapie mit SP allein vorzuziehen. Allerdings können aus der vorliegenden Studie keine Aussagen zur Vitalität der Gametozyten abgeleitet werden.

## 4.2.2 Entwicklungen seit 2000

Im Folgenden sollen die Entwicklungen der letzten Jahre geschildert und die Rolle der untersuchten Kombinationsregime vor dem Hintergrund dieser Entwicklungen und anderer Faktoren erneut eruiert werden.

Bereits in den neunziger Jahren wurde der globale Einsatz von ACT anstelle von CQ oder SP in den Tropen von Experten propagiert und diskutiert [94, 96, 97, 98]. Im Jahr 2001 fand in Abuja, Nigeria, ein Gipfel zu Malaria statt, an dem sich die Führungskräfte aller afrikanischen Staaten zu der Bekämpfung von Malaria bekannten. 2001 gab die WHO die Empfehlung heraus, ACT als Standardmedikation dort einzuführen, wo aktuelle Standardtherapieregime nicht mehr ausreichend gegen unkomplizierte Malaria wirksam sind. In den darauffolgenden Jahren wurden auf der Suche nach besseren Standardtherapien gegen die Malaria tropica viele Studien zur Evaluation von ACT im Vergleich zu traditionellen Medikamenten durchgeführt [110, 111, 122, 126, 127, 134, 136, 139, 140]. Eine systematische Durchschau von in den letzten 10 Jahren durchgeführten Therapiestudien bestätigte insgesamt die Effektivität von ACT, wies aber auf gewisse Einschränkungen und große regionale Unterschiede hin. In Ostafrika konnten intolerable Therapieversagerraten nicht nur für SP-AQ, sondern auch für SP-AS und in Tansania sogar für AQ-AS gezeigt werden [128, 129]. Im Gegensatz dazu wurden in Mosambik, Madagaskar und einigen Staaten Westafrikas, darunter auch Ghana, gleichgute Ergebnisse für SP-AQ, SP-AS und AQ-AS nachgewiesen [134, 135, 136, 137, 139, 141].

Bis Februar 2009 hatten 40 der südlich der Sahara gelegenen Länder Afrikas ihre Standardmedikation auf ACT umgestellt. Von den heute weltweit von der WHO empfohlenen ACT als Standardtherapie der unkomplizierten Malaria (Artemether-Lumefantrin (ALT), AQ-AS, AS-MQ und SP-AS) ist AQ-AS aktuell die am zweithäufigsten angewandte [124]. Zwang *et al.* verglichen in 26 zwischen 1999 und 2006 in südlich der Sahara gelegenen Ländern Afrikas durchgeführten Therapiestudien AQ-AS mit anderen ACT in ihrer PCR-korrigierten Wirksamkeit. Sie konnten eine gute Wirksamkeit von AQ-AS im Vgl. zu anderen ACT bestätigen, beleuchteten aber ebenso die erheblichen regionalen Unterschiede bzgl. ihrer Wirkung [124]. Bis heute haben insgesamt 16 Länder Afrikas die Kombination AQ-AS als Standardtherapie gegen unkomplizierte Malaria eingeführt [142]. Dazu gehört seit 2005 auch Ghana [143].

In Ghana wurde AQ-AS vom Nationalen Malaria-Kontroll-Programm nach geschätzten Fak-

toren wie Wirksamkeit, Therapietreue, Nebenwirkungen, benötigter Quantität, Kosten-Nutzen-Effekt und Auswirkungen auf die lokale Industrie ausgewählt [143]. Zu dem Zeitpunkt gab es für Ghana keine publizierten Studien zur Wirksamkeit dieser Kombination, ebensowenig wusste man etwas über die Resistenzlage gegen AQ als Monotherapie. Koram *et al.* zeigten 2005 in Nord- und Ost-Ghana für AQ-AS und ALT PCR-korrigierte Heilungsraten von 100 % bzw. 98 % an 105 untersuchten Kindern [137]. Oduro *et al.* stellten 2007 in Nordghana für AQ eine Heilungsrate von 48 % nach 28 Tagen fest, allerdings ohne PCR-Korrektur [138]. 2008 haben Koram *et al.* in einer multizentrischen Studie für AQ-AS in Ghana regional starke Unterschiede festgestellt [144]. Eine Aussage bzgl. der Wirksamkeit kann ohne die noch ausstehende Auswertung der PCR-Korrekturen dieser Studie jedoch nicht zuverlässig gemacht werden. In Tamale erbrachten AQ und AQ-AS Ende 2005 PCR-korrigierte Heilungsraten über 28 Tage von 88,9 % bzw. 91,2 % [Mockenhaupt *et al.*, unveröffentlicht].

AQ-AS scheint demzufolge in Ghana, wenn auch mit regionaler Variabilität, eine wirksame Kombination zu sein, wobei aktuelle Daten mit Unterscheidung von Neuinfektionen und Rekrudeszenzen fehlen. Es besteht aber die Möglichkeit, dass SP-AQ im Vgl. zu AQ-AS bei ebenso wenig Rekrudeszenzen effektiver vor Neuinfektionen schützt [134, 145].

Anfang diesen Jahres konnten erste Resistenzen gegen Artemisinine in Südostasien belegt werden. Südostasien, insbesondere West-Kambodscha an der Grenze zu Thailand, war bislang Vorreiter bzgl. der Resistenzentwicklung von *P. falciparum* gegen Malariamedikamente. So sind dort und in einigen Teilen Südamerikas zum ersten Mal Resistenzen gegen CQ und SP aufgetreten [118]. Neben inadäquater Herstellung im Sinne von wenig wirksamen, illegal produzierten Gemischen sowie inadäquater, nicht standardisierter Verabreichung von Malariamedikamenten, ist am ehesten die dort verbreitete Anwendung von Artemisininen als Monotherapie verantwortlich für die nun entstandenen Resistenzen [89]. Die Artemisinin-Monotherapie hat sich auf dem afrikanischen Kontinent noch nicht etabliert. Auch wenn für AQ-AS seit neuestem ein fixes Kombinationspräparat existiert, ist dieses Präparate teurer als die einzelnen Medikamente und in Ländern Afrikas südlich der Sahara noch nicht in Anwendung. Das Weglassen des langsamer wirksamen Partnermedikamentes sowie Resistenzen gegen das langsam eliminierte Partnermedikament entspräche einer Artemisinin-Monotherapie. Es besteht die Sorge, dass sich, wie zuvor bei SP beobachtet, auch Resistenzen gegen die Artemisinine interkontinental westwärts ausbreiten und in absehbarer Zeit zu Unwirksamkeit von ACT führen [133].



Programme in Äquatorial Guinea, Äthiopien, Ruanda, Sambia und Sansibar haben gezeigt, dass unter einer Abdeckung von 50 - 60 % der Bevölkerung mit ACT und Insektizid-behandelten Moskitonetzen die Prävalenz von Malariainfektionen und die Mortalität von Kindern innerhalb von 12 bis 36 Monaten um 20 - 25 % fallen können [146, 147]. Andere Studien konnten in den letzten Jahren unter ACT und Vektorkontrollmaßnahmen ebenfalls eine signifikante Senkung der Malariamorbidität und - mortalität erreichen [148, 149]. Dennoch betrifft dies vorwiegend kleinere Staaten, in denen Prozeduren wie Leitlinienänderungen, Finanzierung von und Abdeckung der Bevölkerung mit neuen Medikamenten sowie Umsetzung neuer Malaria-Kontroll-Programmen offensichtlich besser realisierbar sind als in größeren Staaten Afrikas.

Vor dem Hintergrund der bereits beobachteten Wirksamkeitsabnahme einiger ACT in Ostafrika [129], der neu aufgetretenen Resistenzen gegen Artemisinine und des Mangels an alternativen Substanzgruppen könnte man retrospektiv betrachtet die Frage stellen, ob SP-AQ als Interimslösung vor der Einführung von ACT in Ghana und einigen anderen Ländern Afrikas südlich der Sahara nicht die rationalere Wahl gewesen wäre.

### **4.2.3 Herausforderungen der Malaria-Kontrolle**

Die Malaria-Kontrolle unterliegt nicht nur den Herausforderungen der Findung wirksamer Medikamente und der strategischen Vermeidung von Resistenzentwicklungen. Zu einer effektiven Malaria-Kontrolle gehört z.B. eine effektive Vektorkontrolle mit der Propagierung und Verteilung von Insektizid-behandelten Moskitonetzen, dem Sprühen von Insektiziden in den Häusern und Informationsweiterleitung an die Bevölkerung. Die Einführung und Umsetzung neuer Leitlinien zur Malariatherapie und Vektorkontrolle auf nationaler Ebene ist finanziellen und organisatorischen Hindernissen ausgesetzt. Die in großen internationalen Gremien beschlossenen Prozesse zur Optimierung der Malariakontrolle haben sich hinsichtlich ihrer Umsetzung in den letzten 10 Jahren als komplex, langwierig und kostspielig erwiesen. Dazu gehören die Einführung neuer Leitlinien in nationalen Gremien [150, 151, 152, 153], Anfrage und Genehmigung finanzieller Unterstützung durch den Global Fund und die Weltbank [154, 155], Informationsweiterleitung an die lokalen Sektoren, deren breite Abdeckung mit den neuen Medikamenten und Insektizid-behandelten Moskitonetzen sowie Schulungen zu deren Anwendung [156, 157]. In einigen Fällen scheiterte die Umsetzung neuer Leitlinien

trotz evidenzbasierter Indikation nach WHO-Empfehlungen an der Anfrage internationaler finanzieller Unterstützung [130, 154]. Das Resultat ist die Weiterführung der herkömmlichen Standardtherapien mit CQ bzw. SP, oder die vollständig eigene Finanzierung von ACT durch den betroffenen Staat. Hinzu kommen lokale Hindernisse, wie inadäquate Diagnostik von Malaria bei unzureichender technischer Ausstattung und wenig geschultem Personal. Selbst nach erfolgreicher Implementierung von ACT führen Nebenwirkungen, unklare Rezepturen und Informationsdefizite zu deren inadäquater Verabreichung.

Die genannten Faktoren könnten lang- oder kurzfristig zu Resistenzentwicklungen gegen die neuen Standardmedikamente führen. Wie kann nun Malariakontrolle mit dem Ziel anhaltender Senkung von malariabedingten Morbiditäts- und Mortalitätsraten in den betroffenen Regionen und Bevölkerungsgruppen in Afrika südlich der Sahara vor den genannten Hintergründen langfristig und effektiv realisiert werden?

Die Abschaffung von ACT und die Einführung von SP-AQ als Interimslösung in bestimmten Regionen wäre eine Möglichkeit, ist jedoch schwierig zu realisieren.

Ein wichtiger nächster Schritt ist die Beseitigung der Artemisinin-Resistenzen in West-Kambodscha an der Grenze zu Thailand. Gelingt diese nicht, wird ACT ihre Effektivität sowohl in Asien als auch in Afrika voraussichtlich verlieren, noch bevor sie ihre Wirkung zur Senkung von malariainduzierter Morbidität und Mortalität entfalten konnte. Der Aufruf hierzu ist bereits formuliert worden und erste mathematische Modelle zu dessen Realisierung wurden bereits erstellt [133]. Unumgänglich erscheint die Entwicklung völlig neuer Medikamente gegen Malaria. Neue Substanzklassen könnten die Resistenzentwicklungen weiter hinauszögern. Eine weitere Option besteht in der Wirkungsverstärkung aktueller Malariamedikamente. Dies könnte durch die Entwicklung von Synergisten, sogenannte „resistance reverser“ (engl.: Resistenzumkehrer), erreicht werden [158]. So wie man für CQ in Kombination mit dem Antihistaminikum Chlorphenamin eine bessere Wirksamkeit gegen resistente *P. falciparum*-Parasiten festgestellt hat [159], konnte man z.B. für das erste vollsynthetische Malariamedikament, Methylenblau, eine antiparasitäre Wirkung gegen *P. falciparum* nachweisen sowie eine synergistische Wirkung und einen starken gametozidalen Effekt in Kombination mit ACT [160, 161, 162].

Für die erfolgreiche Umsetzung der genannten Punkte zur Senkung von malariabedingten Morbiditäts- und Mortalitätsraten im Afrika südlich der Sahara sind schnelles und effizientes

Handeln, eine gute Kooperation der betroffenen Nachbarländer miteinander sowie mit den internationalen Partnern, eine gute Koordination von Programmen sowie eine ausreichende, zuverlässige Finanzierung notwendig.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Kombination von SP mit AQ, als auch von SP mit AS in der Region von Tamale, Nordghana, wirksame Alternativen für eine CQ-ersetzende Standardmedikation zur Behandlung der unkomplizierten Malaria sind. SP allein zeigte sich als ungeeignet. Betrachtet man die beiden untersuchten Therapiekombinationen hinsichtlich ihrer Wirkungsprofile und vor dem Hintergrund der Entwicklungen der letzten 10 Jahre, nämlich Resistenzentwicklung von AS und schwierige und langwierige Umsetzung neuer Therapieleitlinien in südlich der Sahara gelegenen Ländern Afrikas, könnte SP-AQ eine geeignetere Alternative als SP-AS sein. Zur Evaluation der Wirksamkeit von SP-AQ und dem derzeit als Standardtherapie eingeführten AQ-AS müssten aktuelle vergleichende Studien durchgeführt werden. Zugleich sollten jedoch alternative Lösungen untersucht werden, um langfristig eine Reduktion malariainduzierter Morbidität und Mortalität in Ghana und in Afrika zu erreichen.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Malaria ist mit einer globalen Inzidenzrate von etwa 247 Millionen klinischen Fällen pro Jahr und einer Mortalitätsrate von etwa einer Million pro Jahr die bedeutendste parasitäre Erkrankung weltweit. Am meisten davon betroffen sind Kinder unter fünf Jahren im Afrika südlich der Sahara. Nach dem zweiten Weltkrieg war Chloroquin (CQ) weltweit das Mittel der Wahl in der Behandlung der Malaria. Seit den siebziger Jahren jedoch wurden weltweit zunehmend Resistenzen von *Plasmodium falciparum* gegen CQ beobachtet. So wurde im Jahr 2000 in der Region von Tamale in Nordghana gezeigt, dass bei Kindern mit unkomplizierter Malaria tropica die Therapie mit CQ in 57 % der Fälle versagte.

Die vorliegende Studie untersuchte im Jahr 2002 mögliche Alternativen zu CQ für die Therapie der unkomplizierten Malaria in Tamale. In einer randomisierten, Plazebo-kontrollierten und doppelblinden Studie wurde die Wirksamkeit von Sulphadoxin-Pyrimethamin (SP) allein sowie in Kombination mit Amodiaquin (AQ) oder Artesunat (AS) bei 451 Kindern zwischen 6 und 59 Monaten mit unkomplizierter Malaria tropica geprüft. Die Studie folgte dem 2003 durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) publizierten Protokoll. Die 451 Kinder wurden in drei Therapiearme randomisiert (SP, SP-AQ, SP-AS). Die klinische und parasitologische Therapieantwort wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Die Unterscheidung von Rekrudeszenzen und Neuinfektionen erfolgte durch die Typisierung der hochpolymorphen parasitären *msp1*- und *msp2*-Gene.

Nach 28 Tagen betrug die Heilungsraten nach Ausschluss der Neuinfektionen 72,2 % für SP, 94,1 % für SP-AQ und 94,5 % für SP-AS. Dies zeigt eine signifikant bessere Wirkung der beiden Kombinationstherapien gegenüber SP allein ( $p < 0,001$ ). Die Parasitenbeseitigung

war unter SP-AS schneller und die Anzahl der frühen Therapieversager niedriger als unter SP oder SP-AQ. Gametozytenprävalenz und -dichte waren sieben Tage nach Therapie unter SP am höchsten und unter SP-AS am niedrigsten. SP-AS zeigte aber die höchste Anzahl an Neuinfektionen bis Tag 28 der Nachbeobachtung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass – gemäss den Leitlinien der WHO – SP in der Region von Tamale zur Therapie der unkomplizierten *Malaria tropica* nicht empfohlen werden kann. SP-AQ und SP-AS hingegen sind mit Heilungsraten von >90 % gut wirksame Alternativen. Dabei bot SP-AS die Vorteile einer schnellen Parasitenbeseitigung und einer effektiven Gametozytizität, während SP-AQ eine geringere Anzahl später Neuinfektionen zeigte sowie kostengünstiger und vor Ort erhältlich war.

Seit den neunziger Jahren werden weltweit Artemisinin-basierte Kombinationstherapien (ACT) zur Behandlung der unkomplizierten *Malaria propagiata*. 2005 wurde in Ghana trotz mangelhafter Datenlage Amodiaquin-Artesunat (AQ-AS) landesweit als Mittel der Wahl in der Therapie der unkomplizierten *Malaria tropica* eingeführt. Die folgenden Jahre zeigten jedoch, dass die Umsetzung neuer Leitlinien sowie die Einführung neuer Standardmedikamente in Afrika oft langwierige Prozesse sind, mit womöglich negativem Einfluß auf die Ausbreitung von Resistenzen. Im Januar 2009 wurden in Südostasien erste Resistenzen gegen die Artemisinine aufgedeckt. Es besteht die Befürchtung, dass sich diese Resistenzen interkontinental westwärts ausbreiten, wie es bereits für SP-Resistenzen beobachtet wurde. Die Unwirksamkeit von ACT wäre eine verheerende Folge.

Vor den geschilderten Hintergründen stellt sich heute die Frage, ob SP-AQ eine mögliche Interimslösung zu ACT hätte sein können. Ob SP-AQ heute gleichgute Heilungsraten wie im Jahr 2002 aufweist, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Zugleich sollten alternative Lösungen, wie die Entwicklung von Artemisinin-Synergisten und von völlig neuen Medikamentengruppen untersucht werden, um langfristig eine Reduktion malariainduzierter Morbidität und Mortalität in Ghana und in Afrika zu erreichen.

# Literaturverzeichnis

- [1] C. Lawrence. Laveran remembered: malaria haemozoin in leucocytes. *Lancet*, 353(9167):1852, 1999.
- [2] B. S. Kakkilaya. Sir Ronald Ross (1857-1932), 2006. <http://www.malariasite.com/malaria/ross.htm>.
- [3] UNICEF and WHO. Africa malaria report, 2003. [http://www.rollbackmalaria.org/amd2003/amr2003/amr\\_toc.htm](http://www.rollbackmalaria.org/amd2003/amr2003/amr_toc.htm).
- [4] K. K. Tetteh and S. D. Polley. Progress and challenges towards the development of malaria vaccines. *BioDrugs*, 21(6):357–73, 2007.
- [5] Stanley C. Oaks, Violaine S. Mitchell, Greg W. Pearson, and Charles C.J. Carpenter, editors. *Malaria: Obstacles and Opportunities*. 1991.
- [6] E. Onori. The problem of plasmodium falciparum drug resistance in africa south of the sahara. *Bull World Health Organ*, 62 Suppl:55–62, 1984.
- [7] S. Ehrhardt, F. P. Mockenhaupt, P. Agana-Nsiire, A. Mathieu, S. D. Anemana, K. Stark, R. N. Otchwemah, and U. Bienzle. Efficacy of chloroquine in the treatment of uncomplicated, plasmodium falciparum malaria in northern ghana. *Ann Trop Med Parasitol*, 96(3):239–47, 2002.
- [8] J. G. Breman. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg*, 64(1-2 Suppl):1–11, 2001.
- [9] B. Greenwood. What can the residents of malaria endemic countries do to protect themselves against malaria? *Parassitologia*, 41(1-3):295–9, 1999.
- [10] P. L. Alonso, S. W. Lindsay, J. R. Armstrong, M. Conteh, A. G. Hill, P. H. David, G. Fegan, A. de Francisco, A. J. Hall, F. C. Shenton, and et al. The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of gambian children. *Lancet*, 337(8756):1499–502, 1991.
- [11] B. M. Greenwood, K. Bojang, C. J. Whitty, and G. A. Targett. Malaria. *Lancet*, 365(9469):1487–98, 2005.
- [12] World Health Organization. World malaria report 2005. *Document WHO/HTM/MAL/2005.1102*. World Health Organization, Geneva, 2005.

- [13] E. A. Afari, M. Appawu, S. Dunyo, A. Baffoe-Wilmot, and F. K. Nkrumah. Malaria infection, morbidity and transmission in two ecological zones southern ghana. *Afr J Health Sci*, 2(2):312–315, 1995.
- [14] World Health Organization. World malaria report 2008. *Document WHO/HTM/GMP/2008.1. World Health Organization, Geneva*, 2008.
- [15] R. Rosenberg, R. A. Wirtz, I. Schneider, and R. Burge. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(2):209–12, 1990.
- [16] Thomas Loescher Lang and Werner. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Kapitel 2, S.7-33*. Georg Thieme Verlag, 2000.
- [17] V. Robert, H. P. Awono-Ambene, J. Y. Le Hesran, and J. F. Trape. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated plasmodium falciparum malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am J Trop Med Hyg*, 62(2):210–6, 2000.
- [18] Nicholas J. White. *Manson’s Tropical Diseases, Chapter 73: Malaria, p.1201-1300*. Saunders, 2008.
- [19] WHO. Guidelines for the treatment of malaria, 2006, <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006>.
- [20] World Health Organization. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Document WHO/HTM/RBM/2003.50. World Health Organization, Geneva*, 2003.
- [21] J. F. Trape. The public health impact of chloroquine resistance in africa. *Am J Trop Med Hyg*, 64(1-2 Suppl):12–7, 2001.
- [22] B. J. Brabin, M. Ginny, J. Sapau, K. Galme, and J. Paino. Consequences of maternal anaemia on outcome of pregnancy in a malaria endemic area in papua new guinea. *Ann Trop Med Parasitol*, 84(1):11–24, 1990.
- [23] A. Y. Kitua, T. Smith, P. L. Alonso, H. Masanja, H. Urassa, C. Menendez, J. Kimario, and M. Tanner. Plasmodium falciparum malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health*, 1(4):475–84, 1996.
- [24] R. W. Snow, I. Bastos de Azevedo, B. S. Lowe, E. W. Kabiru, C. G. Nevill, S. Mwanukusye, G. Kassiga, K. Marsh, and T. Teuscher. Severe childhood malaria in two areas of markedly different falciparum transmission in east africa. *Acta Trop*, 57(4):289–300, 1994.
- [25] F. N. Binka, S. S. Morris, D. A. Ross, P. Arthur, and M. E. Aryeetey. Patterns of malaria morbidity and mortality in children in northern ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(4):381–5, 1994.

- [26] T. Smith, I. Felger, A. Kitua, M. Tanner, and H. P. Beck. Dynamics of multiple plasmodium falciparum infections in infants in a highly endemic area of tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93 Suppl 1:35–9, 1999.
- [27] T. Smith, I. Felger, M. Tanner, and H. P. Beck. Premunition in plasmodium falciparum infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93 Suppl 1:59–64, 1999.
- [28] M. Tanner, H. P. Beck, I. Felger, and T. Smith. The epidemiology of multiple plasmodium falciparum infections. 1. general introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93 Suppl 1:1–2, 1999.
- [29] I. Felger, T. Smith, D. Edoh, A. Kitua, P. Alonso, M. Tanner, and H. P. Beck. Multiple plasmodium falciparum infections in tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93 Suppl 1:29–34, 1999.
- [30] T. Smith, I. Felger, H. P. Beck, and M. Tanner. Consequences of multiple infection with plasmodium falciparum in an area of high endemicity. *Parassitologia*, 41(1-3):247–50, 1999.
- [31] K. Tanabe, M. Mackay, M. Goman, and J. G. Scaife. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite plasmodium falciparum. *J Mol Biol*, 195(2):273–87, 1987.
- [32] J. A. Smythe, M. G. Peterson, R. L. Coppel, A. J. Saul, D. J. Kemp, and R. F. Anders. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 39(2):227–34, 1990.
- [33] G. Peyerl-Hoffmann, T. Jelinek, A. Kilian, G. Kabagambe, W. G. Metzger, and F. von Sonnenburg. Genetic diversity of plasmodium falciparum and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in west uganda. *Trop Med Int Health*, 6(8):607–13, 2001.
- [34] F. Robert, F. Ntoumi, G. Angel, D. Candito, C. Rogier, T. Fandeur, J. L. Sarthou, and O. Mercereau-Puijalon. Extensive genetic diversity of plasmodium falciparum isolates collected from patients with severe malaria in dakar, senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(6):704–11, 1996.
- [35] August Stich and Martin Schlitzer. Drugs for treatment and prophylaxis of malaria (wirkstoffe zur therapie und prophylaxe der malaria). *Chemotherapie Journal*, 17:37–56, 2008.
- [36] K. S. Mnyika and C. M. Kihamia. Chloroquine-induced pruritus: its impact on chloroquine utilization in malaria control in dar es salaam. *J Trop Med Hyg*, 94(1):27–31, 1991.
- [37] H. Gama, A. Ismael, F. Sitoi, A. Matola, H. Barros, and N. Lunet. Factors associated with chloroquine induced pruritus during malaria treatment in mozambican university students. *Gac Sanit*, 23(4):306–310, 2009.



- [38] H. O. AlKadi. Antimalarial drug toxicity: a review. *Chemotherapy*, 53(6):385–91, 2007.
- [39] Neequaye. In vivo chloroquine-resistant falciparum malaria in western africa. *Lancet*, 1(8473):153–4, 1986.
- [40] A. Djimde, O. K. Doumbo, J. F. Cortese, K. Kayentao, S. Doumbo, Y. Diourte, A. Dicko, X. Z. Su, T. Nomura, D. A. Fidock, T. E. Wellems, C. V. Plowe, and D. Coulibaly. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, 344(4):257–63, 2001.
- [41] P. G. Bray, R. E. Martin, L. Tilley, S. A. Ward, K. Kirk, and D. A. Fidock. Defining the role of pfcr1 in plasmodium falciparum chloroquine resistance. *Mol Microbiol*, 56(2):323–33, 2005.
- [42] M. K. Laufer, P. C. Thesing, N. D. Eddington, R. Masonga, F. K. Dzinjalama, S. L. Takala, T. E. Taylor, and C. V. Plowe. Return of chloroquine antimalarial efficacy in malawi. *N Engl J Med*, 355(19):1959–66, 2006.
- [43] M. B. Reed, K. J. Saliba, S. R. Caruana, K. Kirk, and A. F. Cowman. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in plasmodium falciparum. *Nature*, 403(6772):906–9, 2000.
- [44] A. B. Sidhu, A. C. Uhlemann, S. G. Valderramos, J. C. Valderramos, S. Krishna, and D. A. Fidock. Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*, 194(4):528–35, 2006.
- [45] B. K. Abuaku, K. A. Koram, and F. N. Binka. Antimalarial drug use among caregivers in ghana. *Afr Health Sci*, 4(3):171–7, 2004.
- [46] A. Djimde, C. V. Plowe, S. Diop, A. Dicko, T. E. Wellems, and O. Doumbo. Use of antimalarial drugs in mali: policy versus reality. *Am J Trop Med Hyg*, 59(3):376–9, 1998.
- [47] E. K. Ansah, J. O. Gyapong, I. A. Agyepong, and D. B. Evans. Improving adherence to malaria treatment for children: the use of pre-packed chloroquine tablets vs. chloroquine syrup. *Trop Med Int Health*, 6(7):496–504, 2001.
- [48] S. Ehrhardt, F. P. Mockenhaupt, T. A. Eggelte, P. Agana-Nsiire, K. Stollberg, S. D. Anemana, R. N. Otchwemah, and U. Bienzle. Chloroquine blood concentrations and molecular markers of chloroquine-resistant plasmodium falciparum in febrile children in northern ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97(6):697–701, 2003.
- [49] N. J. White. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, 113(8):1084–92, 2004.
- [50] K. Stepniewska and N. J. White. Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(5):1589–96, 2008.

- [51] W. R. Taylor and N. J. White. Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf*, 27(1):25–61, 2004.
- [52] A. M. Baca, R. Sirawaraporn, S. Turley, W. Sirawaraporn, and W. G. Hol. Crystal structure of mycobacterium tuberculosis 7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J Mol Biol*, 302(5):1193–212, 2000.
- [53] P. Wang, C. S. Lee, R. Bayoumi, A. Djimde, O. Doumbo, G. Swedberg, L. D. Dao, H. Mshinda, M. Tanner, W. M. Watkins, P. F. Sims, and J. E. Hyde. Resistance to antifolates in plasmodium falciparum monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol*, 89(2):161–77, 1997.
- [54] P. Wang, M. Read, P. F. Sims, and J. E. Hyde. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite plasmodium falciparum is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol*, 23(5):979–86, 1997.
- [55] G. Rastelli, W. Sirawaraporn, P. Sompornpisut, T. Vilaivan, S. Kamchonwongpaisan, R. Quarrell, G. Lowe, Y. Thebtaranonth, and Y. Yuthavong. Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, wr99210 and their analogues with plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: structural basis of antifolate resistance. *Bioorg Med Chem*, 8(5):1117–28, 2000.
- [56] J. Yuvaniyama, P. Chitnumsub, S. Kamchonwongpaisan, J. Vanichtanankul, W. Sirawaraporn, P. Taylor, M. D. Walkinshaw, and Y. Yuthavong. Insights into antifolate resistance from malarial dhfr-ts structures. *Nat Struct Biol*, 10(5):357–65, 2003.
- [57] C. V. Plowe. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol*, 206(Pt 21):3745–52, 2003.
- [58] C. Roper, R. Pearce, B. Bredenkamp, J. Gumede, C. Drakeley, F. Mosha, D. Chandramohan, and B. Sharp. Antifolate antimalarial resistance in southeast africa: a population-based analysis. *Lancet*, 361(9364):1174–81, 2003.
- [59] C. Roper, R. Pearce, S. Nair, B. Sharp, F. Nosten, and T. Anderson. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*, 305(5687):1124, 2004.
- [60] A. M. McCollum, A. C. Poe, M. Hamel, C. Huber, Z. Zhou, Y. P. Shi, P. Ouma, J. Vulule, P. Bloland, L. Slutsker, J. W. Barnwell, V. Udhayakumar, and A. A. Escalante. Antifolate resistance in plasmodium falciparum: multiple origins and identification of novel dhfr alleles. *J Infect Dis*, 194(2):189–97, 2006.
- [61] D. Ndiaye, J. P. Daily, O. Sarr, O. Ndir, O. Gaye, S. Mboup, C. Roper, and D. F. Wirth. Defining the origin of plasmodium falciparum resistant dhfr isolates in senegal. *Acta Trop*, 99(1):106–11, 2006.

- [62] O. Maiga, A. A. Djimde, V. Hubert, E. Renard, A. Aubouy, F. Kironde, B. Nsimba, K. Koram, O. K. Doumbo, J. Le Bras, and J. Clain. A shared asian origin of the triple-mutant dhfr allele in plasmodium falciparum from sites across africa. *J Infect Dis*, 196(1):165–72, 2007.
- [63] J. T. Bousema, L. C. Gouagna, A. M. Meutstege, B. E. Okech, N. I. Akim, J. I. Githure, J. C. Beier, and R. W. Sauerwein. Treatment failure of pyrimethamine-sulphadoxine and induction of plasmodium falciparum gametocyaemia in children in western kenya. *Trop Med Int Health*, 8(5):427–30, 2003.
- [64] C. O. Obonyo, E. A. Juma, B. R. Ogutu, J. M. Vulule, and J. Lau. Amodiaquine combined with sulfadoxine/pyrimethamine versus artemisinin-based combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in africa: a meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101(2):117–26, 2007.
- [65] P. Olliaro, C. Nevill, J. LeBras, P. Ringwald, P. Mussano, P. Garner, and P. Brousseau. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet*, 348(9036):1196–201, 1996.
- [66] R. G. Ridley. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415(6872):686–93, 2002.
- [67] D. Schellenberg, E. Kahigwa, C. Drakeley, A. Malende, J. Wigayi, C. Msokame, J. J. Aponte, M. Tanner, H. Mshinda, C. Menendez, and P. L. Alonso. The safety and efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, and their combination in the treatment of uncomplicated plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 67(1):17–23, 2002.
- [68] S. Krishna and N. J. White. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 30(4):263–99, 1996.
- [69] P. A. Phillips-Howard and L. J. West. Serious adverse drug reactions to pyrimethamine-sulphadoxine, pyrimethamine-dapsone and to amodiaquine in britain. *J R Soc Med*, 83(2):82–5, 1990.
- [70] M. Foley and L. Tilley. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther*, 79(1):55–87, 1998.
- [71] E. Hsu. Reflections on the 'discovery' of the antimalarial qinghao. *Br J Clin Pharmacol*, 61(6):666–70, 2006.
- [72] N. J. White. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(7):1413–22, 1997.
- [73] C. J. Woodrow, R. K. Haynes, and S. Krishna. Artemisinins. *Postgrad Med J*, 81(952):71–8, 2005.

- [74] R. N. Price, F. Nosten, C. Luxemburger, F. O. ter Kuile, L. Paiphun, T. Chongsuphajaisiddhi, and N. J. White. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet*, 347(9016):1654–8, 1996.
- [75] G. Targett, C. Drakeley, M. Jawara, L. von Seidlein, R. Coleman, J. Deen, M. Pinder, T. Doherty, C. Sutherland, G. Walraven, and P. Milligan. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of plasmodium falciparum to anopheles gambiae. *J Infect Dis*, 183(8):1254–9, 2001.
- [76] R. L. Clark, T. E. White, A. Clode S, I. Gaunt, P. Winstanley, and S. A. Ward. Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 71(6):380–94, 2004.
- [77] R. L. Clark, S. A. Lerman, E. M. Cox, W. E. Gristwood, and T. E. White. Developmental toxicity of artesunate in the rat: comparison to other artemisinins, comparison of embryotoxicity and kinetics by oral and intravenous routes, and relationship to maternal reticulocyte count. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 83(4):397–406, 2008.
- [78] R. L. Clark, A. Arima, N. Makori, Y. Nakata, F. Bernard, W. Gristwood, A. Harrell, T. E. White, and P. J. Wier. Artesunate: developmental toxicity and toxicokinetics in monkeys. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 83(4):418–34, 2008.
- [79] G. Schmuck, E. Roehrdanz, R. K. Haynes, and R. Kahl. Neurotoxic mode of action of artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(3):821–7, 2002.
- [80] S. Toovey and A. Jamieson. Audiometric changes associated with the treatment of uncomplicated falciparum malaria with co-artemether. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(5):261–7; discussion 268–9, 2004.
- [81] F. Nosten and N. J. White. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl):181–92, 2007.
- [82] J. Golenser, J. H. Waknine, M. Krugliak, N. H. Hunt, and G. E. Grau. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol*, 36(14):1427–41, 2006.
- [83] P. G. Bray, S. A. Ward, and P. M. O’Neill. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr Top Microbiol Immunol*, 295:3–38, 2005.
- [84] R. K. Haynes and S. Krishna. Artemisinins: activities and actions. *Microbes Infect*, 6(14):1339–46, 2004.
- [85] S. R. Meshnick. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol*, 32(13):1655–60, 2002.
- [86] S. Krishna, A. C. Uhlemann, and R. K. Haynes. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist Updat*, 7(4-5):233–44, 2004.

- [87] U. Eckstein-Ludwig, R. J. Webb, I. D. Van Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, P. G. Bray, S. A. Ward, and S. Krishna. Artemisinins target the serca of plasmodium falciparum. *Nature*, 424(6951):957–61, 2003.
- [88] E. Legrand, B. Volney, J. B. Meynard, O. Mercereau-Puijalon, and P. Esterre. In vitro monitoring of plasmodium falciparum drug resistance in french guiana: a synopsis of continuous assessment from 1994 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(1):288–98, 2008.
- [89] A. M. Dondorp, F. Nosten, P. Yi, D. Das, A. P. Phyto, J. Tarning, K. M. Lwin, F. Ariey, W. Hanpithakpong, S. J. Lee, P. Ringwald, K. Silamut, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, T. Herdman, S. S. An, S. Yeung, P. Singhasivanon, N. P. Day, N. Lindegardh, D. Socheat, and N. J. White. Artemisinin resistance in plasmodium falciparum malaria. *N Engl J Med*, 361(5):455–67, 2009.
- [90] I. M. Hastings and W. M. Watkins. Intensity of malaria transmission and the evolution of drug resistance. *Acta Trop*, 94(3):218–29, 2005.
- [91] I. M. Hastings, W. M. Watkins, and N. J. White. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1420):505–19, 2002.
- [92] P. G. Kremsner and S. Krishna. Antimalarial combinations. *Lancet*, 364(9430):285–94, 2004.
- [93] N. J. White. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist Updat*, 1(1):3–9, 1998.
- [94] N. J. White, F. Nosten, S. Looareesuwan, W. M. Watkins, K. Marsh, R. W. Snow, G. Kokwaro, J. Ouma, T. T. Hien, M. E. Molyneux, T. E. Taylor, C. I. Newbold, 2nd Ruebush, T. K., M. Danis, B. M. Greenwood, R. M. Anderson, and P. Olliaro. Averting a malaria disaster. *Lancet*, 353(9168):1965–7, 1999.
- [95] W. Peters. The prevention of antimalarial drug resistance. *Pharmacol Ther*, 47(3):499–508, 1990.
- [96] T. Doherty. Anti-malarial drugs for africa. *Lancet*, 356(9226):339–40, 2000.
- [97] J. Verdrager. Averting a malaria disaster. *Lancet*, 354(9187):1389–90, 1999.
- [98] F. I. Konotey-Ahulu. Averting a malaria disaster. *Lancet*, 354(9174):258, 1999.
- [99] C. Wongsrichanalai, S. Prajakwong, S. R. Meshnick, G. D. Shanks, and K. Thimasarn. Mefloquine—its 20 years in the thai malaria control program. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 35(2):300–8, 2004.
- [100] F. Nosten, C. Luxemburger, F. O. ter Kuile, C. Woodrow, J. P. Eh, T. Chongsuphaisiddhi, and N. J. White. Treatment of multidrug-resistant plasmodium falciparum malaria with 3-day artesunate-mefloquine combination. *J Infect Dis*, 170(4):971–7, 1994.

- [101] F. Nosten and P. Brasseur. Combination therapy for malaria: the way forward? *Drugs*, 62(9):1315–29, 2002.
- [102] J. K. Baird, M. J. Bangs, J. D. Maguire, and M. J. Barcus. Epidemiological measures of risk of malaria. *Methods Mol Med*, 72:13–22, 2002.
- [103] S. Ehrhardt, G. D. Burchard, C. Mantel, J. P. Cramer, S. Kaiser, M. Kubo, R. N. Otchwemah, U. Bienzle, and F. P. Mockenhaupt. Malaria, anemia, and malnutrition in african children—defining intervention priorities. *J Infect Dis*, 194(1):108–14, 2006.
- [104] World Health Organization. Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission. *Document WHO/Mal.96.1077*. World Health Organization, Geneva, 1996.
- [105] WHO. Severe falciparum malaria. world health organization, communicable diseases cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94 Suppl 1:S1–90, 2000.
- [106] H. von Schenck, M. Falkensson, and B. Lundberg. Evaluation of ”hemocue,ä new device for determining hemoglobin. *Clin Chem*, 32(3):526–9, 1986.
- [107] D. A. Gillespie and N. Hardman. Microbubbles in replicating nuclear deoxyribonucleic acid from physarum polycephalum. *Biochem J*, 183(2):477–80, 1979.
- [108] G. Snounou, S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong, and K. N. Brown. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 61(2):315–20, 1993.
- [109] G. Snounou, X. Zhu, N. Siripoon, W. Jarra, S. Thaithong, K. N. Brown, and S. Viriyakosol. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in plasmodium falciparum populations in thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93(4):369–74, 1999.
- [110] C. E. Rwagacondo, F. Niyitegeka, J. Sarushi, C. Karema, V. Mugisha, J. C. Dujardin, C. Van Overmeir, J. van den Ende, and U. D’Alessandro. Efficacy of amodiaquine alone and combined with sulfadoxine-pyrimethamine and of sulfadoxine pyrimethamine combined with artesunate. *Am J Trop Med Hyg*, 68(6):743–7, 2003.
- [111] G. Dorsey, D. Njama, M. R. Kanya, A. Cattamanchi, D. Kyabayinze, S. G. Staedke, A. Gasasira, and P. J. Rosenthal. Sulfadoxine/pyrimethamine alone or with amodiaquine or artesunate for treatment of uncomplicated malaria: a longitudinal randomised trial. *Lancet*, 360(9350):2031–8, 2002.
- [112] L. K. Basco, A. Same-Ekobo, V. F. Ngane, M. Ndounga, T. Metoh, P. Ringwald, and G. Soula. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine and the sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine combination against uncomplicated plasmodium falciparum malaria in young children in cameroon. *Bull World Health Organ*, 80(7):538–45, 2002.

- [113] N. J. White. The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends Parasitol*, 18(10):458–64, 2002.
- [114] F. P. Mockenhaupt, J. Mandelkow, H. Till, S. Ehrhardt, T. A. Eggelte, and U. Bienzle. Reduced prevalence of plasmodium falciparum infection and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous g6pd deficiency. *Trop Med Int Health*, 8(2):118–24, 2003.
- [115] F. P. Mockenhaupt, S. Ehrhardt, J. Burkhardt, S. Y. Bosomtwe, S. Laryea, S. D. Anemana, R. N. Otchwemah, J. P. Cramer, E. Dietz, S. Gellert, and U. Bienzle. Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern ghana. *Am J Trop Med Hyg*, 71(2):167–72, 2004.
- [116] G. J. Driessen, S. van Kerkhoven, B. J. Schouwenberg, G. Bonsu, and J. P. Verhave. Sulphadoxine/pyrimethamine: an appropriate first-line alternative for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in ghanaian children under 5 years of age. *Trop Med Int Health*, 7(7):577–83, 2002.
- [117] F. P. Mockenhaupt, J. Teun Bousema, T. A. Eggelte, J. Schreiber, S. Ehrhardt, N. Wasilew, R. N. Otchwemah, R. W. Sauerwein, and U. Bienzle. Plasmodium falciparum dhfr but not dhps mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern ghana. *Trop Med Int Health*, 10(9):901–8, 2005.
- [118] N. J. White. Malaria—time to act. *N Engl J Med*, 355(19):1956–7, 2006.
- [119] Ghana Health Service 2004. Antimalarial drug policy for ghana, 2004.
- [120] F. P. Mockenhaupt, G. Bedu-Addo, T. A. Eggelte, L. Hommerich, V. Holmberg, C. von Oertzen, and U. Bienzle. Rapid increase in the prevalence of sulfadoxine-pyrimethamine resistance among plasmodium falciparum isolated from pregnant women in ghana. *J Infect Dis*, 198(10):1545–9, 2008.
- [121] C. A. Clerk, J. Bruce, P. K. Affipunguh, N. Mensah, A. Hodgson, B. Greenwood, and D. Chandramohan. A randomized, controlled trial of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, or the combination in pregnant women in ghana. *J Infect Dis*, 198(8):1202–11, 2008.
- [122] L. von Seidlein, P. Milligan, M. Pinder, K. Bojang, C. Anyalebechi, R. Gosling, R. Coleman, J. I. Ude, A. Sadiq, M. Duraisingh, D. Warhurst, A. Allouche, G. Targett, K. McAdam, B. Greenwood, G. Walraven, P. Olliaro, and T. Doherty. Efficacy of artesunate plus pyrimethamine-sulphadoxine for uncomplicated malaria in gambian children: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet*, 355(9201):352–7, 2000.
- [123] I. Adam, A. Elbasit IE, S. M. Idris, E. M. Malik, and M. I. Elbashir. A comparison of the efficacy of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine with that of sulfadoxine-pyrimethamine alone, in the treatment of uncomplicated, plasmodium falciparum malaria in eastern sudan. *Ann Trop Med Parasitol*, 99(5):449–55, 2005.

- [124] J. Zwing, P. Olliaro, H. Barennes, M. Bonnet, P. Brasseur, H. Bukirwa, S. Cohuet, U. D'Alessandro, A. Djimde, A. Martensson, A. Yeka, C. Karema, J. P. Guthmann, S. Hamour, J. L. Ndiaye, C. Rwagacondo, I. Sagara, A. Same-Ekobo, S. Sirima, I. van den Broek, W. R. Taylor, G. Dorsey, and M. Randrianarivelojosia. Efficacy of artesunate-amodiaquine for treating uncomplicated *p. falciparum* malaria in sub-saharan africa: a multi-centre analysis. *Malar J*, 8(1):203, 2009.
- [125] S. R. Meshnick, T. E. Taylor, and S. Kamchonwongpaisan. Artemisinin and the anti-malarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*, 60(2):301–15, 1996.
- [126] M. Adjuk, A. Babiker, P. Garner, P. Olliaro, W. Taylor, and N. White. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet*, 363(9402):9–17, 2004.
- [127] T. K. Mutabingwa, K. Muze, R. Ord, M. Briceno, B. M. Greenwood, C. Drakeley, and C. J. Whitty. Randomized trial of artesunate+amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine+amodiaquine, chlorproguanil-dapsone and sp for malaria in pregnancy in tanzania. *PLoS One*, 4(4):e5138, 2009.
- [128] D. Sinclair, B. Zani, S. Donegan, P. Olliaro, and P. Garner. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD007483, 2009.
- [129] T. K. Mutabingwa, D. Anthony, A. Heller, R. Hallett, J. Ahmed, C. Drakeley, B. M. Greenwood, and C. J. Whitty. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet*, 365(9469):1474–80, 2005.
- [130] B. Kouyate, A. Sie, M. Ye, M. De Allegri, and O. Muller. The great failure of malaria control in africa: a district perspective from burkina faso. *PLoS Med*, 4(6):e127, 2007.
- [131] B. B. Kangwana, J. Njogu, B. Wasunna, S. V. Kedenge, D. N. Memusi, C. A. Goodman, D. Zurovac, and R. W. Snow. Malaria drug shortages in kenya: a major failure to provide access to effective treatment. *Am J Trop Med Hyg*, 80(5):737–8, 2009.
- [132] J. Njogu, W. Akhwale, D. H. Hamer, and D. Zurovac. Health facility and health worker readiness to deliver new national treatment policy for malaria in kenya. *East Afr Med J*, 85(5):213–21, 2008.
- [133] R. J. Maude, W. Pontavornpinyo, S. Saralamba, R. Aguas, S. Yeung, A. M. Dondorp, N. P. Day, N. J. White, and L. J. White. The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in cambodia. *Malar J*, 8:31, 2009.
- [134] K. Kayentao, H. Maiga, R. D. Newman, M. L. McMorro, A. Hoppe, O. Yattara, H. Traore, Y. Kone, E. A. Guirou, R. Saye, B. Traore, A. Djimde, and O. K. Doumbo. Artemisinin-based combinations versus amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated malaria in faladje, mali. *Malar J*, 8:5, 2009.



- [135] D. Menard, N. N. Andrianina, Z. Ramiandrasoa, A. Randriamanantena, N. Rasoari-lalao, M. Jahevitra, A. Ratsimbasa, L. Tuseo, and A. Raveloson. Randomized clinical trial of artemisinin versus non-artemisinin combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in madagascar. *Malar J*, 6:65, 2007.
- [136] F. Abacassamo, S. Enosse, J. J. Aponte, F. X. Gomez-Olive, L. Quinto, S. Mabunda, A. Barreto, P. Magnussen, A. M. Ronn, R. Thompson, and P. L. Alonso. Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and combination therapy with artesunate in mozambican children with non-complicated malaria. *Trop Med Int Health*, 9(2):200–8, 2004.
- [137] K. A. Koram, B. Abuaku, N. Duah, and N. Quashie. Comparative efficacy of antimalarial drugs including acts in the treatment of uncomplicated malaria among children under 5 years in ghana. *Acta Trop*, 95(3):194–203, 2005.
- [138] A. R. Oduro, T. Anyorigiya, K. Koram, F. Anto, P. Atobrah, and A. Hodgson. Amodiaquine in future combination treatment of malaria in ghana. *Trop Doct*, 37(3):154–6, 2007.
- [139] B. Faye, J. L. Ndiaye, D. Ndiaye, Y. Dieng, O. Faye, and O. Gaye. Efficacy and tolerability of four antimalarial combinations in the treatment of uncomplicated plasmodium falciparum malaria in senegal. *Malar J*, 6:80, 2007.
- [140] M. Adjuik, P. Agnamey, A. Babiker, S. Borrmann, P. Brasseur, M. Cisse, F. Cobelens, S. Diallo, J. F. Faucher, P. Garner, S. Gikunda, P. G. Kremsner, S. Krishna, B. Lell, M. Loolpapit, P. B. Matsiegui, M. A. Missinou, J. Mwanza, F. Ntoumi, P. Olliaro, P. Osimbo, P. Rezbach, E. Some, and W. R. Taylor. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated plasmodium falciparum malaria in african children: a randomised, multicentre trial. *Lancet*, 359(9315):1365–72, 2002.
- [141] I. Zongo, G. Dorsey, N. Rouamba, C. Dokomajilar, M. Lankoande, J. B. Ouedraogo, and P. J. Rosenthal. Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and combination therapy for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from burkina faso. *Am J Trop Med Hyg*, 73(5):826–32, 2005.
- [142] WHO. World health organization: Global anti-malarial drug policy database, africa, 2009, [http://www.who.int/malaria/amdp/amdp\\_afro.htm](http://www.who.int/malaria/amdp/amdp_afro.htm).
- [143] S. Niagia. Ghana battles drug-resistant malaria with artesunate. *Lancet*, 363(9418):1372, 2004.
- [144] K. Koram, L. Quaye, and B. Abuaku. Efficacy of amodiaquine/artesunate combination therapy for uncomplicated malaria in children under five years in ghana. *Ghana Med J*, 42(2):55–60, 2008.
- [145] A. Yeka, K. Banek, N. Bakayita, S. G. Staedke, M. R. Kamya, A. Talisuna, F. Kironde, S. L. Nsohya, A. Kilian, M. Slater, A. Reingold, P. J. Rosenthal, F. Wabwire-Mangen,

- and G. Dorsey. Artemisinin versus nonartemisinin combination therapy for uncomplicated malaria: randomized clinical trials from four sites in uganda. *PLoS Med*, 2(7):e190, 2005.
- [146] K. I. Barnes, D. N. Durrheim, F. Little, A. Jackson, U. Mehta, E. Allen, S. S. Dlamini, J. Tsoka, B. Bredenkamp, D. J. Mthembu, N. J. White, and B. L. Sharp. Effect of artemether-lumefantrine policy and improved vector control on malaria burden in kwazulu-natal, south africa. *PLoS Med*, 2(11):e330, 2005.
- [147] A. Bhattarai, A. S. Ali, S. P. Kachur, A. Martensson, A. K. Abbas, R. Khatib, A. W. Al-Mafazy, M. Ramsan, G. Rotllant, J. F. Gerstenmaier, F. Molteni, S. Abdulla, S. M. Montgomery, A. Kaneko, and A. Bjorkman. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in zanzibar. *PLoS Med*, 4(11):e309, 2007.
- [148] S. J. Ceesay, C. Casals-Pascual, J. Erskine, S. E. Anya, N. O. Duah, A. J. Fulford, S. S. Sesay, I. Abubakar, S. Dunyo, O. Sey, A. Palmer, M. Fofana, T. Corrah, K. A. Bojang, H. C. Whittle, B. M. Greenwood, and D. J. Conway. Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in the gambia: a retrospective analysis. *Lancet*, 372(9649):1545–54, 2008.
- [149] W. P. O’Meara, P. Bejon, T. W. Mwangi, E. A. Okiro, N. Peshu, R. W. Snow, C. R. Newton, and K. Marsh. Effect of a fall in malaria transmission on morbidity and mortality in kilifi, kenya. *Lancet*, 372(9649):1555–62, 2008.
- [150] R. Shretta, J. Omumbo, B. Rapuoda, and R. W. Snow. Using evidence to change antimalarial drug policy in kenya. *Trop Med Int Health*, 5(11):755–64, 2000.
- [151] G. M. Mubyazi and M. A. Gonzalez-Block. Research influence on antimalarial drug policy change in tanzania: case study of replacing chloroquine with sulfadoxine-pyrimethamine as the first-line drug. *Malar J*, 4:51, 2005.
- [152] N. Sipilanyambe, J. L. Simon, P. Chanda, P. Olumese, R. W. Snow, and D. H. Hamer. From chloroquine to artemether-lumefantrine: the process of drug policy change in zambia. *Malar J*, 7:25, 2008.
- [153] A. A. Amin, D. Zurovac, B. B. Kangwana, J. Greenfield, D. N. Otieno, W. S. Akhwale, and R. W. Snow. The challenges of changing national malaria drug policy to artemisinin-based combinations in kenya. *Malar J*, 6:72, 2007.
- [154] A. Attaran, K. I. Barnes, C. Curtis, U. d’Alessandro, C. I. Fanello, M. R. Galinski, G. Kokwaro, S. Looareesuwan, M. Makanga, T. K. Mutabingwa, A. Talisuna, J. F. Trape, and W. M. Watkins. Who, the global fund, and medical malpractice in malaria treatment. *Lancet*, 363(9404):237–40, 2004.
- [155] D McNeil. New drug for malaria pits us against africa, New York Times, 2002, <http://www.nytimes.com/2002/05/28/health/new-drug-for-malaria-pits-us-against-africa.html>.

- [156] C. Sayang, M. Gausseres, N. Vernazza-Licht, D. Malvy, D. Bley, and P. Millet. Treatment of malaria from monotherapy to artemisinin-based combination therapy by health professionals in urban health facilities in yaounde, central province, cameroon. *Malar J*, 8:176, 2009.
- [157] C. Sayang, M. Gausseres, N. Vernazza-Licht, D. Malvy, D. Bley, and P. Millet. Treatment of malaria from monotherapy to artemisinin-based combination therapy by health professionals in rural health facilities in southern cameroon. *Malar J*, 8:174, 2009.
- [158] T. J. Egan and C. H. Kaschula. Strategies to reverse drug resistance in malaria. *Curr Opin Infect Dis*, 20(6):598–604, 2007.
- [159] G. O. Gbotosho, C. T. Happi, A. Sijuade, O. A. Ogundahunsi, A. Sowunmi, and A. M. Oduola. Comparative study of interactions between chloroquine and chlorpheniramine or promethazine in healthy volunteers: a potential combination-therapy phenomenon for resuscitating chloroquine for malaria treatment in africa. *Ann Trop Med Parasitol*, 102(1):3–9, 2008.
- [160] K. Buchholz, R. H. Schirmer, J. K. Eubel, M. B. Akoachere, T. Dandekar, K. Becker, and S. Gromer. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(1):183–91, 2008.
- [161] A. Zoungrana, B. Coulibaly, A. Sie, I. Walter-Sack, F. P. Mockenhaupt, B. Kouyate, R. H. Schirmer, C. Klohe, U. Mansmann, P. Meissner, and O. Muller. Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from burkina faso. *PLoS One*, 3(2):e1630, 2008.
- [162] B. Coulibaly, A. Zoungrana, F. P. Mockenhaupt, R. H. Schirmer, C. Klohe, U. Mansmann, P. E. Meissner, and O. Muller. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. *PLoS One*, 4(5):e5318, 2009.

# Abkürzungsverzeichnis

P.	- Plasmodium
SP	- Sulphadoxin-Pyrimethamin
AQ	- Amodiaquin
AS	- Artesunat
CQ	- Chloroquin
MQ	- Mefloquin
ALT	- Artemether-Lumefantrin
ACT	- (engl. artemisinin-based combination therapy) Artemisinin-basierte Kombinationstherapie
DDT	- Dichlordiphenyltrichlorethan
MDR	- (engl. multi drug resistant) multiple Medikamentenresistenz
<i>Pfmdr1</i>	- (engl.: <i>Plasmodium falciparum</i> multi drug resistance 1) Gen für multiple Medikamentenresistenz 1 von <i>Plasmodium falciparum</i>
CRT	- Chloroquin-Resistenz-Transporter
G6PD	- Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
DHFR	- Dihydrofolsäurereduktase
DHPS	- Dihydropterinsäuresynthase
WHO	- (engl.: World Health Organisation) Weltgesundheitsorganisation
ETF	- (engl. early treatment failure) Frühes Therapieversagen
LPF	- (engl. late parasitological treatment failure) Spätes parasitologisches Therapieversagen
LCF	- (engl. late clinical treatment failure) Spätes klinisches Therapieversagen
ACPR	- (engl. adequate clinical and parasitological response) Adäquate klinische und parasitologische Therapieantwort

Hb	-	Hämoglobin
<i>msp1</i>	-	(engl. merozoite-surface-protein-1) Merozoiten-Oberflächenprotein-Gen 1
<i>msp2</i>	-	(engl. merozoite-surface-protein-2) Merozoiten-Oberflächenprotein-Gen 2
PCR	-	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
EDTA	-	Ethylendiamintetrasäure
PRR	-	Parasiten-Reduktionsrate
et al.	-	(lat. et alii) und andere
z.B.	-	zum Beispiel
bzgl.	-	bezüglich
bzw.	-	beziehungsweise
s.	-	siehe
s.o.	-	siehe oben
s.u.	-	siehe unten
u.a.	-	unter anderem
Vgl.	-	Vergleich
i.d.R.	-	in der Regel
ca.	-	circa
etc.	-	et cetera

# Bezugsquellenverzeichnis

## Geräte und Substanzen, Tamale, Ghana

- Thermometer (Scala Electronic GmbH)
- elektrische Waage
- Öl-Immersionmikroskop (Carl Zeiss)
- Photometer (Hemocue, Angelholm, Schweden)
- Diesel-betriebener Generator
- Ethylendiamintetrasäure (EDTA)-Monovette (S-Monovette Kalium-EDTA, 2,7 ml, Sartedt AG & Co.)
- 100 % Methanol
- 10 % und 4 % Giemsa-Lösung (Merck KGaA)
- Pufferlösung nach Weise (Merck KGaA)
- Stabilisierungspuffer AS 1, (Qiagen)

## Geräte und Substanzen, Berlin

### DNA-Extraktion

- QIAamp (R) DNA Blood Mini Kit (250) (Qiagen, Hilden)
- Proteinase K [20 mg/ml] in Aqua bidest

- Lyse-Puffer AS2 (Qiagen GmbH)
- absolutes Ethanol
- Waschpuffer AW: ethanolische Lösung von NaCl und Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan/HCl
- Elutionspuffer AE: wässrige Lösung von NaCl und Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan/HCl
- Pipetten (Gilson) 20  $\mu\text{L}$ ; 200 $\mu\text{L}$ ; 1000 $\mu\text{L}$
- Reaktionsgefäße (Sarstedt 1900 $\mu\text{L}$ ); Zentrifugationssäule-Silika-Filter; Auffanghülse (Qiagen)
- Zentrifuge (Labortechnik Fröbel, Wasserburg, Bodensee)
- Vortexgerät (Heidolph)

## PCR

- Pipetten (ABimed, Langenfeld)
- Reaktionsständer (Roth)
- Eisbehälter
- T3-Thermocycler (Biometra)
- 10 x PCR-Puffer (Amersham Pharmacia, Biosciences, Amsterdam)(10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0)
- dNTPs 25 mM (Invitrogen)
- Aqua ad injectabilia (DeltaSelectGmbH, Pfullingen, BRAUN, Braun Melsungen AG, Melsungen)
- PCR *Taq*-Polymerase 5 U/ $\mu\text{L}$  (Amersham Pharmacia, Biosciences, Amsterdam)
- Gelatine 1 mg/ml (Merck, Darmstadt)
- Primer: 20 nM (MWG-Biotech-AG)

## Gelelektrophorese

- Gelkammern (CTI; Roth, Karlsruhe; Biometra)
- Elektrophoresekammer
- Voltmeter (BioRad, Model200/2.0 Power Supply)
- Pipetten (Eppendorf)
- Polaroid-Kamera 667, schwarz-weiß
- High UV-Tisch (Biometra TI 1)
- 0,5 TBE-Puffer (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan/HCl (Invitrogen), Borsäure (Merck, Darmstadt), EDTA (Lancaster))
- Ethidiumbromid 0,1 % (Merck, Darmstadt)
- Bromphenolblau-Gemisch (Bromphenolblau (Sigma), Xylen cyanol (Merck), Glycerol (GIPCO BRL))
- Basenpaar-Längenstandard (Basepair-ladder): 50 bp (Amersham Pharmacia, Biosciences, Amsterdam), 100 bp (Invitrogen)
- NuSieve GTG (Genetic Technology Grade)-Agarose (Biozym)



# Erklärung

„Ich, Nasstasja Wassilew, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Randomisierte, doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Therapiestudie zu Sulphadoxin-Pyrimethamin allein und in Kombination mit Amodiaquin oder Artesunat bei unkomplizierter Malaria in Ghana“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 02. Oktober 2009

Nasstasja Wassilew

# Danksagung

Zunächst möchte ich dem verstorbenen Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Bienzle für die Überlassung des Themas danken.

Dank auch Herrn Prof. Dr. med. Frank P. Mockenhaupt für die Betreuung über nun doch ein paar Jahre, für seine kritischen Anmerkungen, seine Diskussionsbereitschaft und für die Ermöglichung eines schließlich zügigen Endspurtes.

Besonderen Dank meinem Mitstreiter und meinen Mitstreiterinnen in Ghana - Jonas, Jana, Franziska und Katharina - für die gute, intensive, gemeinschaftliche Zeit unter Curfew-Bedingungen. Dank an Henning, der, obwohl so weit weg, für mich in Ghana immer da war. Dank dem Bulpeila-Team - Steven, Hawa, Florence, Victoria, Mr. Bawa, Ibrahim, Munkaila, Nafisa, Dara, Lydia, Mohammed und Peter - für die gute Zusammenarbeit und den Spaß dabei, wir haben viel voneinander gelernt. Dank den Kindern, die an der Studie teilgenommen haben, und deren Eltern für ihre Bereitschaft und ihr Vertrauen.

Dank auch Bärbel Jakob und Suse Röwer aus dem Labor des Berliner Tropeninstitutes, für die geduldige Einweisung in die Welt der PCR und andere. Dank Linus für die geduldige Unterstützung beim Layout.

Besonderen Dank meinen lieben Eltern - Elisabeth und Sawko - für ihre zuverlässige Unterstützung auf vielen Ebenen, ihren Zuspruch und ihr Verständnis sowie meinen lieben Schwestern - Evgenija und Svetlana -, die immer da waren und sind. Lieben Dank auch Florian für sein Ohr, seinen Rat, seine strapazierfähige Geduld und seinen Optimismus, für sein Dasein in den letzten Monaten.

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

# Lebenslauf

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