

CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
Direktor: Professor Dr. med. Norbert Suttorp

Habilitationsschrift

Artemisinin-basierte Therapie der *Plasmodium falciparum*-Malaria in Afrika und Europa

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Florian Michael Kurth MSc
aus München

Eingereicht: August 2017

Dekan: Prof. Dr. Axel Radlach Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. E. C. Reisinger

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Löscher

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	4
1.1	Plasmodien-Entwicklungszyklus	4
1.2	Klinisches Bild der Malaria	5
1.2.1	Inkubationszeit	6
1.2.2	Unkomplizierte Malaria	6
1.2.3	Schwere Malaria	7
1.3	Epidemiologie	9
1.3.1	Aktuelle epidemiologische Entwicklung in Afrika	11
1.3.2	Epidemiologie in Europa.....	13
1.4	Therapie.....	14
1.4.1	Medikamentöse Therapie der unkomplizierten Falciparum-Malaria	14
1.4.2	Therapie der Non-falciparum-Malaria	16
1.4.3	Therapie der schweren Malaria.....	16
2	Eigene Arbeiten	19
2.1	Artemisinin-basierte Malariatherapie bei Kindern in Afrika	19
2.1.1	Pyronaridin-Artesunat Kombinationstherapie zur Behandlung von Kindern mit unkomplizierter Malaria in Gabun	19
2.1.2	<i>In vitro</i> Aktivität von Pyronaridin gegen <i>Plasmodium falciparum</i> in Gabun	29
2.1.3	Pädiatrische Darreichungsformen Artemisinin-basierter Kombinationstherapien bei Kindern mit Malaria – systematischer Review und Metaanalyse	36
2.2	Artemisinin-basierte Malariatherapie bei Migranten und Reiserückkehrern in Europa	46
2.2.1	Therapie der schweren Malaria in Europa	46
2.2.1.1	Ergebnisse der multizentrischen Beobachtungsstudie des Europäischen Netzwerkes für Tropen- und Reisemedizin (TropNet) zu schwerer Malaria in Europa.	46

2.2.1.2	Artesunat versus Chinin bei europäischen Patienten mit schwerer Malaria	59
2.2.2	Hämolyse nach oraler Artemisinin-basierter Kombinationstherapie bei unkomplizierter Malaria	64
3	Diskussion.....	71
3.1	Artemisinin-basierte Malariatherapie in Afrika	71
3.2	Artemisinin-basierte Malariatherapie in Europa	77
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	82
5	Literatur	84
6	Danksagung	93
7	Erklärung	94

1 Einleitung

Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung - mehr als 3 Milliarden Menschen - lebt in Malaria-Risikogebieten. Trotz kontinuierlicher Fortschritte während der letzten Dekade im Bestreben, die Malaria-bedingte Morbidität und Mortalität zu senken, kommt es jährlich weltweit zu über 200 Millionen Fällen von Malaria (1). Die Zahl der Todesfälle wird aktuell auf 400.000 bis 700.000 pro Jahr geschätzt (1, 2). Damit ist die Malaria die bedeutendste parasitäre Erkrankung des Menschen und zählt zusammen mit Pneumonie, HIV/AIDS, infektiösen Durchfallerkrankungen und Tuberkulose zu den fünf wichtigsten Infektionskrankheiten (2).

Malaria wird verursacht durch eine Infektion mit Protozoen des Genus *Plasmodium*, die durch Stiche der weiblichen Anopheles-Mücke übertragen werden. *Plasmodium falciparum* ist für den Großteil der klinischen Fälle in Subsahara-Afrika und für 99% der Malaria-Todesfälle weltweit verantwortlich. Auch der überwiegende Teil der importierten Infektionen in Europa und USA wird durch *P. falciparum* hervorgerufen. Infektionen mit *P. vivax* sind vor allem in Südostasien und Südamerika prävalent und können ebenfalls schwere klinische Verläufe verursachen (3). Infektionen mit *P. ovale*, bzw. den sympatrischen Spezies *P. ovale curtisi* und *P. ovale wallikeri* (4), und *P. malariae* verlaufen hingegen in der Regel deutlich milder (5). In einigen Gegenden Südostasiens spielt der Erreger der Makaken-Malaria, *P. knowlesi*, eine Rolle als Krankheitserreger. Auch er kann beim Menschen schwere klinische Verläufe verursachen (6, 7).

1.1 Plasmodien-Entwicklungszyklus

Während der Blutmahlzeit des Vektors, der weiblichen Anopheles, gelangen Sporozoitien aus den Speicheldrüsen der Mücke in die menschliche Haut und von dort über die Blutbahn in die Leber. Hier invadieren sie Hepatozyten und treten in die erste asexuelle Vermehrungsphase ein. Während dieser sogenannten exo-erythrozytären

Schizogonie, die je nach Plasmodien Spezies zwischen 5,5 und 15 Tagen dauert, entstehen aus den Sporozoiten Gewebesporozonten, die anschließend rupturieren und jeweils bis zu 30.000 Merozoiten in die Blutbahn freisetzen (8, 9). Bei *P. vivax* und *P. ovale* kommt es im Rahmen der exo-erythrozytären Schizogonie zur Bildung von Hypnozoiten, die zunächst in eine Ruhephase eintreten und die Schizogonie erst nach Wochen oder Monaten fortsetzen. Da die wissenschaftliche Evidenz hierfür gering ist, wurde dieses Dogma – vor allem für *P. ovale* - in letzter Zeit mehrfach in Frage gestellt (5, 10, 11).

Die freigesetzten Merozoiten dringen rasch in zirkulierende Erythrozyten ein, in denen die zweite asexuelle Vermehrungsphase abläuft. Diese erythrozytäre Schizogonie dauert pro Zyklus ca. 24 (*P. knowlesi*), 48 (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*) oder 72 Stunden (*P. malariae*), in denen die Erreger die Entwicklung von jungen Ringformen über Trophozoiten zu Blutschizonten durchlaufen (12). Nach abgeschlossener Reifung rupturieren die Blutschizonten und setzen je nach Plasmodien Spezies jeweils zwischen 6 und 30 neue Merozoiten in die Blutbahn frei, die anschließend rasch neue Erythrozyten befallen und den asexuellen erythrozytären Zyklus fortsetzen. Ein kleiner Teil der Merozoiten entwickelt sich zu sexuellen Formen, den weiblichen und männlichen Gametozyten. Gelangen diese bei einer erneuten Blutmahlzeit der weiblichen Anopheles in deren Mitteldarm, kommt es dort zur Befruchtung und Bildung einer Zygote, die anschließend durch Reduktionsteilung als Ookinete und Oozyste eine Vielzahl an Sporozoiten hervorbringt. Diese wandern in die Speicheldrüsen der Mücke um von dort erneut auf den Menschen übertragen zu werden, wodurch sich der Lebenszyklus schließt (8, 9).

1.2 Klinisches Bild der Malaria

Das klinische Bild der Malaria weist eine enorme Bandbreite auf und reicht von der asymptomatischen Infektion bis zum hochakuten letalen Verlauf. Die Symptomatik ist abhängig von Plasmodien-Spezies und -Stamm, Alter, Immunität, genetischer

Disposition, Gesundheits- und Ernährungszustand des Patienten sowie dem Einfluss von Chemoprophylaxe und Therapie.

1.2.1 Inkubationszeit

Während der exo-erythrozytären Schizogonie ist die Infektion mit Plasmodien klinisch inapparent. Erste Symptome treten in der Regel auf, wenn die Parasitendichte im Blut 50/µl übersteigt. Dies ist meist nach 3 bis 4 erythrozytären Vermehrungszyklen der Fall. Für *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale* ergibt sich aus der Summation von 5,5-8 Tagen Gewebe-Schizogonie und 6-8 Tagen klinisch inapparenter erythrozytärer Vermehrung eine Inkubationszeit von ca. 11-16 Tagen. Mit zunehmender klinischer Semi-Immunität steigt die Parasitendichte, die ohne Symptome vom Infizierten toleriert wird. Zudem ist bei semi-immunen Patienten die Vermehrung der Plasmodien weniger effizient, sodass sich die Inkubationszeit zusätzlich verlängert. Die Inkubationszeit bei Monoinfektion mit *P. malariae* ist durch die langsamere Vermehrung dieser Spezies ebenfalls deutlich länger (13).

1.2.2 Unkomplizierte Malaria

Die klinische Symptomatik der Malaria ist wenig spezifisch. Fieber ist das häufigste Symptom, kann jedoch vor allem in der frühen Krankheitsphase und bei Semi-Immunen fehlen. Weitere häufige Beschwerden sind Abgeschlagenheit, Schwäche, Kopfschmerzen, Myalgien, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe. Die klassische klinische Präsentation mit schubweisem Fieber jeden 2. bzw. 3. Tag kann auf eine Malaria tertiana (*P. ovale* oder *P. vivax*) oder Malaria quartana (*P. malariae*) hindeuten. Die Regelmäßigkeit des Fiebers nimmt dabei durch die Synchronisation der Entwicklungszyklen im Verlauf der Infektion klassischerweise zu. Bei Infektionen mit *P. falciparum* bleiben die Fieberschübe meist unregelmäßig. Fieberkrämpfe sind besonders bei Kindern in Endemiegebieten häufig. In der klinischen Untersuchung sind im Verlauf der Erkrankung häufig Splenomegalie, Ikterus und klinische Zeichen der Anämie zu finden (8, 9).

1.2.3 Schwere Malaria

Patienten, die aufgrund einer Malaria keine oralen Medikamente zu sich nehmen können, eine hohe Parasitenlast aufweisen oder Fehlfunktionen von lebenswichtigen Organen entwickeln, haben ein erhöhtes Risiko an der Infektion zu versterben. Das Risiko hängt dabei von Alter, Immunität, Anzahl der betroffenen Organe, Ausmaß der Beeinträchtigung, Komorbiditäten und vom Zeitpunkt einer effektiven Therapie ab (14). Während schwere bzw. lebensbedrohliche Verläufe bei Infektionen mit *P. ovale*, *P. malariae* und *P. vivax* selten sind, kommen sie bei Infektionen mit *P. falciparum* - abhängig von der Endemizität - regelhaft vor (6, 15). Pathophysiologische Hauptursache hierfür ist die Eigenschaft von *P. falciparum*, durch die Zytoadherenz infizierter Erythrozyten an Gefäßendothelzellen Störungen der Mikrozirkulation hervorzurufen (16, 17). Für den Parasiten hat diese sogenannte Sequestration den Vorteil, der für ihn ungünstigen Passage durch die Milz zu entgehen (6, 18).

Es existieren zahlreiche Definitionen und Kriterien zur Klassifikation einer *P. falciparum* Infektion als komplizierte oder schwere Malaria. Nach einer in Subsahara-Afrika weit verbreiteten Definition des Severe Malaria in African Children (SMAC) Netzwerks gilt beispielsweise jede Malaria mit einer Parasitämie ≥ 5000 Parasiten/ μl als schwer, wenn die klinischen Symptome eine Hospitalisierung rechtfertigen (19). Auch außerhalb der Endemiegebiete unterscheiden sich die Definitionen abhängig von nationalen Empfehlungen zum Teil deutlich (20-22). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat seit 1986 verschiedene Definitionen von schwerer Malaria für epidemiologische und klinische Zwecke erarbeitet, die weit verbreitet und akzeptiert sind (14, 23, 24). Vor allem bezüglich des Kriteriums der Hyperparasitämie bei *P. falciparum* haben sich dabei zuletzt mehrfach relevante Änderungen ergeben. So galt in den Empfehlungen von 2010 abhängig von der Transmissionsintensität eine Parasitendichte von $>2\%$ befallene Erythrozyten bzw. 100.000 Parasiten pro μl oder $>5\%$ befallene Erythrozyten bzw. 250.000 Parasiten pro μl als hyperparasitäm, während aktuell unabhängig von der Endemizität $>10\%$ befallene Erythrozyten als Grenze angegeben werden. Die derzeit gültigen Charakteristika sind in der Tabelle dargestellt (14, 23, 24).

Tabelle: Kriterien für schwere Malaria nach den WHO Guidelines 2015 (14)

Bewusstseinstrübung	Glasgow Coma Scale <11 bei Erwachsenen Blantyre Coma Score <3 bei Kindern
Erschöpfung	Generalisierte Schwäche, sodass die Person nicht mehr sitzen, stehen oder ohne Hilfe laufen kann
Multiple Krampfanfälle	Mehr als 2 Krampfanfälle in 24 Stunden
Azidose	Base-Excess <-8 mmol/l oder Bikarbonat <15 mmol/l, oder Plasma Laktat >5mmol/l
Hypoglykämie	Blutzucker <40 mg/dl
Schwere Anämie	Hämoglobin <7 g/dl bei Erwachsenen Hämoglobin <5 g/dl bei Kindern jeweils mit >10.000/μl Parasitämie
Nierenversagen	Plasma-Kreatinin >3mg/dl oder Plasma-Harnstoff >120 mg/dl
Ikterus	Bilirubin >3 mg/dl mit >100.000/μl Parasitämie
Respiratorische Insuffizienz	Radiologische Zeichen eines Lungenödems oder Periphere Sauerstoffsättigung <92% mit Atemfrequenz >30/min
Blutungsneigung	Wiederkehrende oder verlängerte Blutung (Epistaxis, Venenpunktionsstellen, Mundschleimhaut, Haematemesis, Melaena)
Kreislaufversagen/Schock	Rekapillarierungszeit >3 Sek. ohne Hypotension Systolischer RR <80 mmHg bei Erwachsenen Systolischer RR <70 mmHg bei Kindern mit Zeichen einer peripheren Minderperfusion
Hyperparasitämie	<i>P. falciparum</i> Parasitämie >10 %

Für die schwere **Vivax-Malaria** gelten dieselben Kriterien, jedoch ohne Untergrenzen für die Parasitämie. Für die schwere Knowlesi-Malaria gelten ebenfalls oben angegebene Kriterien, jedoch wird bereits eine Parasitämie von >100.000/μl als Hyperparasitämie angesehen, beim Kriterium Ikterus gilt als Untergrenze eine Parasitämie >20.000/μl (14).

1.3 Epidemiologie

Die Malaria ist weltweit in den Regionen der tropischen Klimazone verbreitet. Ihr Vorkommen wird bestimmt von den Lebensbedingungen für Mensch, Parasit und Vektor. Vor allem für Parasit und Vektor werden diese durch warme Umgebungstemperaturen begünstigt. Historische Daten vom Beginn des 20. Jahrhunderts, vor der Zeit flächendeckender Malaria-Kontrollmaßnahmen, geben Hinweise, dass die 60°F (bzw. 15,6°C) Isothermen der Sommer-Monate eine natürliche Grenze für die Ausbreitung der Malaria darstellen. Die Verbreitung ist oft fokal mit großen Unterschieden zwischen nahegelegenen Gebieten. *P. vivax* hat die weiteste geographische Verbreitung und ist vor allem in Mittel- und Südamerika, Asien und Ozeanien prävalent. *P. falciparum* ist die vorherrschende Spezies in den tropischen Gebieten Afrikas. In Südamerika, der Karibik, Asien und Ozeanien entspricht seine Prävalenz in etwa der von *P. vivax*. *P. ovale* und *P. malariae* kommen vor allem im tropischen Afrika vor und sind insgesamt deutlich seltener als die anderen Spezies. Das Vorkommen von *P. knowlesi* beschränkt sich auf die Verbreitungsgebiete der Ringel- und Langschwanz-Makaken in Südostasien (1, 8, 9).

Zum Verständnis der Malaria-Transmission in Abhängigkeit von Mensch, Parasit und Vektor wird oft die auf den Arbeiten von Ronald Ross und George Macdonald basierende Formel

$$R_0 = \frac{ma^2p^n}{-r \log_e p}$$

herangezogen, bei der R_0 die Basis-Reproduktionsrate, m die Anzahl von Vektoren pro Mensch, a die Frequenz mit der ein Vektor einen Menschen sticht, p die tägliche Überlebenswahrscheinlichkeit eines Vektors, n die Dauer der parasitären Reifung im Vektor (sog. Sporogonie) und r die Heilungsrate beim Menschen darstellt (25). R_0 gibt an, wie viele weitere Personen im Mittel durch eine infektiöse Indexperson angesteckt werden.

Das Ross-Macdonald Model verdeutlicht den großen Einfluss der Lebensdauer des Vektors auf die Transmission, da diese abhängig von der Umgebungstemperatur in

10.-12. Potenz in die Berechnung eingeht. Es erklärt zudem die hohe Wirksamkeit des vor allem in Afrika prävalenten Vektors *Anopheles gambiae*, die auf dessen Langlebigkeit und Anthropophilie sowie der hohen Vektordichte basiert (8, 9, 25). Neben R_0 wird die entomologische Inokulationsrate (EIR) als Maß für die Malariatransmission verwendet, definiert als Anzahl infektiöser Moskitostiche pro Person pro Jahr. Sie variiert zwischen weniger als 1 Stich pro Person und Jahr in den meisten Gebieten mit instabiler Malariatransmission, beispielsweise in weiten Teilen Asiens, Zentral- und Südamerikas, und über 1.000 Stichen pro Person und Jahr in manchen Gebieten mit stabiler Transmission in Subsahara-Afrika (6, 26). Als Maß für die Malaria-Endemizität wird zudem als Näherungsparameter der Anteil von Kindern mit tastbarer Milz (sog. Milz-Rate) herangezogen, oder direkt die Infektionsprävalenz (*P. falciparum* Parasiten Rate PfPR, Anteil der Kinder mit positiver Parasitämie) bei Kindern im Alter zwischen 2 und 9 Jahren. Anhand dieser Maßzahlen werde Gebiete als hypoendemisch (<10 % Milz-Rate bzw. PfPR), mesoendemisch (11-50 % Milz-Rate bzw. PfPR), hyperendemisch (>50 % Milz-Rate bzw. PfPR) oder holoendemisch (>75 % Milz-Rate, bzw. >75 % PfPR bei Kindern zwischen 0 und 11 Monaten) klassifiziert (8, 27).

In holoendemischen Gebieten mit stabiler Transmission ist die Malaria Morbidität und Mortalität besonders während der Kindheit hoch. Kinder unter 5 Jahren tragen dort die Hauptkrankheitslast und sind von über 80 % der Malaria-bedingten Todesfälle betroffen. Infektionen in der Jugend und im Erwachsenenalter hingegen verlaufen durch Zunahme der erworbenen Immunität oft nur noch mit niedriger Parasitämie und oligo- bzw. asymptomatisch (1, 6, 28). Komplizierte bzw. tödliche Verläufe kommen bei Erwachsenen in holoendemischen Gebieten in der Regel nicht vor. In Gebieten mit instabiler Transmission und niedriger Endemizität ist die Ausbildung einer erworbenen Semi-Immunität verzögert oder fehlt gänzlich, sodass symptomatische Infektionen alle Altersgruppen betreffen. Veränderungen der Umgebungsbedingungen wie schwere Regenfälle, Migration oder Flucht, sowie Veränderungen der Malaria-Bekämpfungsmaßnahmen können in diesen Gebieten zum Auftreten epidemischer Malaria führen (29). Inwiefern bzw. wie rasch die erworbene Semi-Immunität mit abnehmender Re-Exposition zurückgeht, z.B. bei Verlassen der Endemiegebiete durch

Migration oder Abnahme der EIR durch verbesserte Kontrollmaßnahmen, ist nicht abschließend geklärt und Gegenstand aktueller Untersuchungen (30).

1.3.1 Aktuelle epidemiologische Entwicklung in Afrika

Über 90% der Malaria-Erkrankungen und -Todesfälle weltweit betreffen die WHO Region Afrika (1). In der Millenniumserklärung der Vereinten Nationen aus dem Jahr 2000 wurde das Ziel deklariert, bis 2015 die Ausbreitung von Malaria zum Stillstand zu bringen und eine Trendwende bzgl. der Inzidenz zu bewirken (20). In dieser Zeit hat sich die Bereitstellung von finanziellen Fördermitteln zur Malariabekämpfung weltweit in etwa verzwanzigfacht (1, 27). Die drei wesentlichen Säulen der Malaria-Kontrollprogramme sind dabei:

1. Insektizid-behandelte Moskitonetze (ITNs)
2. Innenraum-Besprühung mit Insektiziden (IRS)
3. Frühe Diagnostik und rasche medikamentöse Therapie.

Schätzungen aus dem Malaria Atlas Project zufolge hat die *P. falciparum* Infektionsinzidenz in den afrikanischen Endemiegebieten 2000-2015 um insgesamt 40% abgenommen, von 312 (95 % KI 253-427) auf 192 (95 % KI 135-265) pro 1.000 Personen pro Jahr (27). Dies entspricht für 2015 etwa 187 (95 % KI 132-259) Millionen klinischen Malariafällen in Afrika. Die *P. falciparum* Infektionsprävalenz bei Kindern zwischen 2 und 10 Jahren ($PfPR_{2-10}$) als Maßzahl für die Endemizität hat sich seit der Jahrtausendwende in etwa halbiert, von 33 % (95 % KI 31-35) im Jahr 2000 auf 16 % (95 % KI 14-19) im Jahr 2015. Der Anteil der afrikanischen Gebiete, die als holo- oder hyperendemisch klassifiziert werden, hat damit von 11,6 % bzw. 21,5 % im Jahr 2000 auf 1,4 % bzw. 7,9 % im Jahr 2015 abgenommen, wohingegen sich der Anteil der hypoendemischen Gebiete im selben Zeitraum von 27,0 % auf 49,7 % fast verdoppelt hat (27). Abbildung 1 zeigt eine graphische Darstellung der Verteilung der $PfPR_{2-10}$ in Afrika für die Jahre 2000 und 2015.

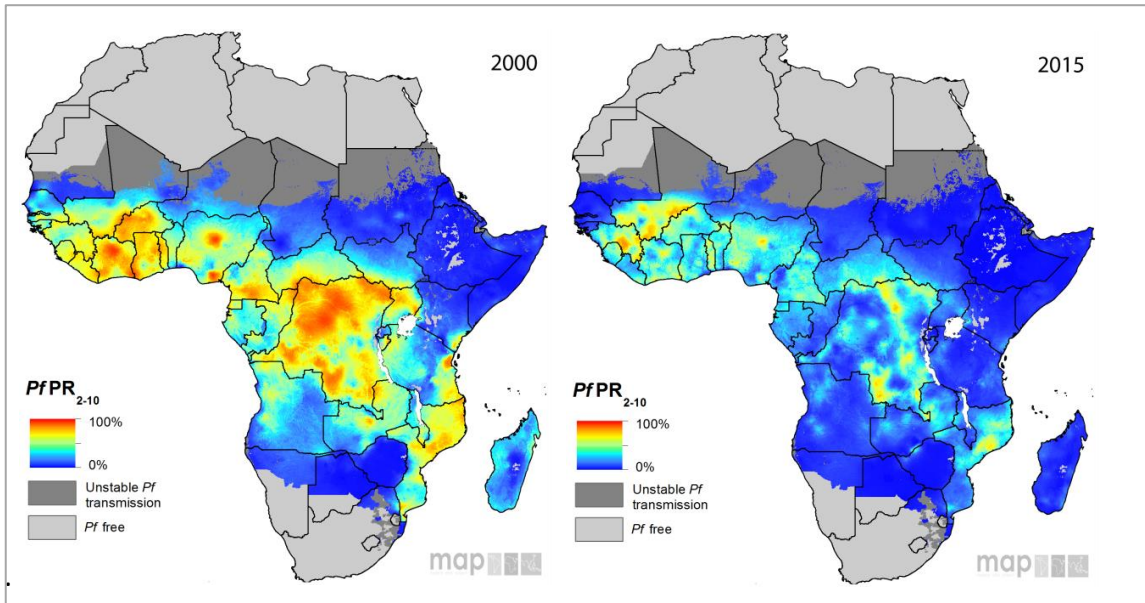


Abbildung 1: Geographische Verteilung der *P. falciparum* Infektionsprävalenz bei Kindern zwischen 2 und 10 Jahren ($PfPR_{2-10}$) in Subsahara-Afrika 2000 und 2015 (27). Abbildung des Malaria Atlas Projects (<http://www.map.ox.ac.uk/>) [Zugriff am: 5.7.2017] CreativeCommons Attribution 3.0 Unported License

Die Schätzungen der jährlichen Malaria-Todesfälle sind je nach verwendeter Methode sehr unterschiedlich (1, 31). Basierend auf den kombinierten Daten der Global Burden of Disease-Study (2) und des Malaria Atlas Project (32) ist für den Zeitraum zwischen 2000 und 2015 mit einer Abnahme der Malaria-Todesfälle in Höhe von 57 % (95 % KI 46-65) in Afrika auszugehen, von 12,5 (95 % KI 8,3-17,0) pro 10.000 im Jahr 2000 auf 5,4 (95 % KI 3,4-7,9) pro 10.000 im Jahr 2015. Dies entspricht für 2015 in etwa 631.000 (95 % KI 394.000-914.000) Todesfällen in Afrika (31). Nigeria und die Demokratische Republik Kongo haben mit jeweils 31 % bzw. 12 % den größten Anteil an diesen Todesfällen. Die Mortalitätsraten sind für 2015 in Mali (23,1 pro 10.000), Burkina Faso (17,6 pro 10.000), Sierra Leone (14,4 pro 10.000) und Mozambique (9,5 pro 10.000) am höchsten (31).

Trotz der abnehmenden Gesamt-Mortalität bleiben Kinder unter 5 Jahren die Hauptrisikopopulation für Malaria-bedingte Todesfälle in Afrika. Wie Abbildung 2 zeigt liegt der Anteil der Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren an den Gesamt-Todesfällen auch 2015 in den meisten Gebieten zwischen 60 % und 80 %.

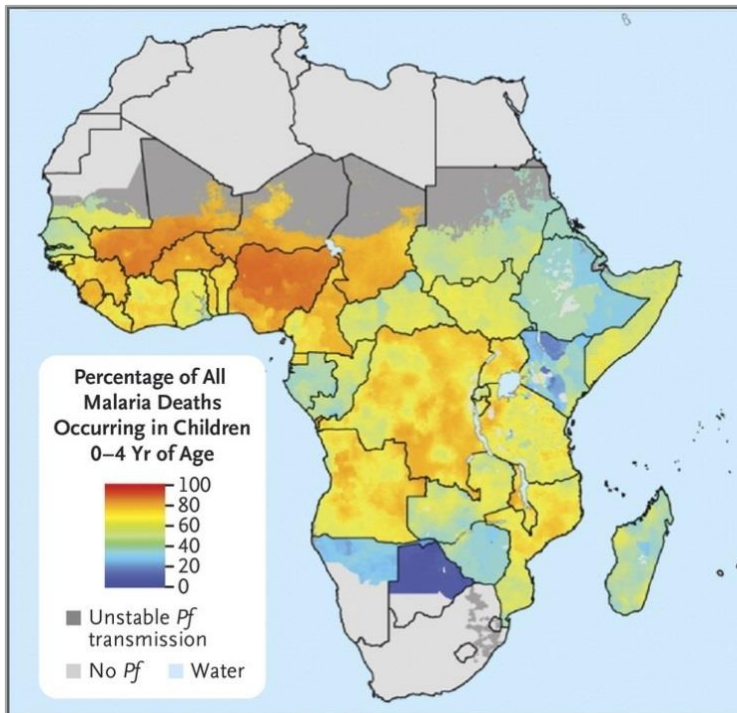


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der Malaria Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren in Subsahara-Afrika. Abbildung reproduziert mit Genehmigung aus (31). Copyright Massachusetts Medical Society.

1.3.2 Epidemiologie in Europa

Gemäß den Zahlen des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) werden in Europa jährlich zwischen 6.000 und 7.000 Malariafälle gemeldet (33). Diese Daten unterschätzen die wahren europäischen Fallzahlen, da die Fälle aus Italien, Deutschland, Dänemark, Liechtenstein und Island bislang nicht an das Europäische Surveillance System berichtet werden. Unter den europäischen Ländern hat Frankreich mit etwa 2.000 Fällen pro Jahr die höchste Inzidenz, gefolgt vom UK mit etwa 1.500 Fällen pro Jahr und der BRD mit etwa 1.000 Fällen pro Jahr. Die Fallzahlen sind über die vergangene Dekade weitestgehend konstant, der weltweite Rückgang der Malaria-Inzidenz in den Endemiegebieten spiegelt sich in der Häufigkeit importierter Fälle bislang nicht wieder (33). Beim Großteil der importierten Fälle handelt es sich um Infektionen mit *P. falciparum*. In den vergangenen Jahren wurde aus mehreren europäischen Ländern jedoch eine Zunahme von *P. vivax* Infektionen berichtet, die mit der Zunahme der Migration von Asylsuchenden aus Eritrea und vom Horn von Afrika in Verbindung steht (34, 35).

Mit Ausnahme weniger Berichte von autochthonen *P. vivax* Infektionen aus Griechenland und anderen südeuropäischen Ländern werden die in Europa auftretenden Fälle durch Reisen in Malaria-Endemiegebiete importiert (36). Betroffen sind im Wesentlichen zwei unterschiedliche Patientengruppen:

1. Patienten, die außerhalb von Endemiegebieten geboren wurden und aus touristischen oder beruflichen Gründen in Endemiegebiete reisen, und
2. Reisende mit Migrationshintergrund, die zum Besuch Ihrer Familienangehörigen und Freunde in ihre ehemalige Heimat in den Endemiegebieten zurückkehren (sog. „visiting friends and relatives“, VFR).

Während die Patienten in der ersten Gruppe in der Regel noch nie zuvor mit Malaria in Kontakt gekommen sind, verbleibt bei der zweiten Gruppe durch die Malaria-Exposition vor der Migration und durch regelmäßige Reisen in Endemiegebiete oft ein gewisses Maß an Semi-Immunität (22).

1.4 Therapie

Die rasche Behandlung mit einem wirksamen Chemotherapeutikum ist der wichtigste Bestandteil der Malaria-Therapie. Grundsätzlich kommt bei der unkomplizierten Malaria in der Regel eine orale Behandlung zum Einsatz, während die Therapie der schweren Malaria in der Regel parenteral erfolgt.

1.4.1 Medikamentöse Therapie der unkomplizierten Falciparum-Malaria

Die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT) ist derzeit die empfohlene Erstlinien-Behandlung der unkomplizierten Falciparum-Malaria in allen Malaria Endemiegebieten (14). Das Grundprinzip der simultanen Anwendung von zwei Wirkstoffen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen basiert dabei - wie in der Therapie von Tuberkulose, HIV und Tumorerkrankungen – auf drei Überlegungen: Erstens wird durch den Angriff von zwei unterschiedlichen biologischen Zielstrukturen die Wirksamkeit erhöht. Zweitens kann durch die Kombination zweier Wirkstoffe die Therapiedauer gegenüber einer Monotherapie verkürzt werden. Drittens wird die

Entstehung von resistenten Plasmodien-Stämmen verlangsamt. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Parasiten mit gleichzeitiger Resistenz gegen zwei Wirkstoffe dem Produkt der Wahrscheinlichkeiten des Auftretens der Einzelresistenzen entspricht, somit also um ein Vielfaches geringer ist als bei Monotherapie. Die zwei Wirkstoffe schützen sich also gegenseitig gegen Resistenzen (37, 38).

Fünf verschiedene ACTs werden derzeit von der WHO zur Therapie der unkomplizierten Falciparum-Malaria empfohlen: Artemether + Lumefantrin (A+L), Artesunat + Amodiaquin (A+AQ), Artesunat + Mefloquin (A+MQ), Artesunat + Sulfadoxin-Pyrimethamin (A+SP) und Dihydroartemisinin + Piperaquin (DHA+P) (14). In all diesen ACTs wird ein kurzwirksames Artemisinin-Derivat mit einem langwirksamen Partner-Wirkstoff kombiniert und über 3 Tage oral verabreicht. ACTs sollten vorzugsweise als sogenannte „fixed dose combinations“ verwendet werden, bei denen beide Wirkstoffe in derselben Tablette kombiniert sind (14, 39). Fixed dose Kombinationen sind mittlerweile für alle ACTs mit Ausnahme von A+SP verfügbar. ACTs gelten im Allgemeinen als sicher und gut verträglich und haben in zahlreichen Studien das von der WHO angestrebte Ziel einer PCR-korrigierten Heilungsrate >95 % an Tag 28 bewiesen (40).

Während sich die verschiedenen Artemisinin-Derivate der einzelnen ACTs nur geringfügig (in ihrer Lipophilie bzw. Hydrophilie) unterscheiden, bestehen bei den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Partner-Medikamente beträchtliche Unterschiede. So liegen die terminalen Eliminations-Halbwertszeiten von Lumefantrin und Sulfadoxin-Pyrimethamin jeweils im Bereich von 3-7 Tagen, während die von Mefloquin und Piperaquin im Bereich von etwa 3-4 Wochen liegen (41-44). Die Partnermedikamente Sulfadoxin-Pyrimethamin, Amodiaquin, Mefloquin und Piperaquin wurden und werden zum Teil weiterhin als eigenständige Monotherapien verwendet, mit der Gefahr einer rascheren Resistenzentwicklung. Lumefantrin hingegen fand bislang nie als Monotherapeutikum Verwendung (14).

1.4.2 Therapie der Non-falciparum-Malaria

Während Chloroquin in der Therapie der Falciparum-Malaria aufgrund zunehmender Resistenzen weltweit seit Ende des 20. Jahrhunderts kontinuierlich an Bedeutung verloren hat, galt es für die Non-falciparum-Malaria bis zuletzt weiterhin als Medikament der Wahl. Chloroquin-Resistenzen für *P. vivax* wurden erstmals 1989 in Papua Neuguinea beschrieben und kommen mittlerweile in nahezu allen *P. vivax*-Endemiegebieten vor (45, 46).

Für *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* ist die Datenlage aufgrund der niedrigeren Prävalenz dünn. Diese Plasmodien gelten generell als Chloroquin-sensibel, obgleich für *P. malariae* aus Sumatra erste Chloroquin-resistente Stämme berichtet wurden (47, 48). ACTs scheinen in der Behandlung von Non-falciparum-Spezies generell gut wirksam zu sein (5, 49, 50), sodass die WHO aktuell in Gebieten mit bekannter Chloroquin-Resistenz von *P. vivax* generell den Einsatz von ACTs zur Behandlung der Non-falciparum-Malaria empfiehlt (14). In Gebieten ohne bekannter Chloroquin-Resistenz von *P. vivax* werden weiterhin ACTs oder Chloroquin gleichermaßen empfohlen. Aufgrund der Häufigkeit von *P. falciparum* und *P. vivax* Koinfektionen bzw. von falscher Spezies-Diagnose wurde diese Empfehlung zuletzt häufig kontrovers diskutiert (6, 51). Zur Prävention von Rückfällen durch Hypnozoiten wird bei *P. vivax* und *P. ovale* zusätzlich zur Akuttherapie eine 14-tägige Behandlung mit Primaquin empfohlen (14).

1.4.3 Therapie der schweren Malaria

Die schwere Malaria ist ein medizinischer Notfall und erfordert eine rasche Therapie-Einleitung sowie intensive Überwachung und Betreuung. Von besonderer Bedeutung ist die schnellstmögliche Gabe eines wirksamen Malariamedikamentes. Wie mehrere große randomisiert-kontrollierte Studien (RCTs) in afrikanischen und asiatischen Endemiegebieten in den letzten Jahren gezeigt haben, ist die parenterale (intravenöse, i.v. oder intramuskuläre, i.m.) Therapie mit Artesunat der seit vielen Jahrzehnten etablierten Standardtherapie mit i.v. Chinin überlegen. So konnte bei erwachsenen

Patienten in Südostasien durch Artesunate eine Reduktion der Sterblichkeit um 35 % gegenüber Chinin gezeigt werden, die Sterblichkeit bei Kindern in Afrika verringerte sich um 22,5 % (9, 52, 53). Die parenterale Therapie mit Artesunat erfolgt am ersten Tag in 12-stündigem Abstand und anschließend alle 24 Stunden, bis der Patient orale Medikamente einnehmen kann. Die 24-stündige Gabe einer höheren Artesunat-Dosis (4 mg/kg) von Beginn an war in einer Studie bei afrikanischen Kindern dem konventionellen Schema mit Standarddosis (2,4 mg/kg) gleichwertig (19, 54). Für Kinder mit einem Körpergewicht <20 kg wurde in der aktuellen WHO-Leitlinie die empfohlene Dosis auf 3 mg/kg erhöht (55). Falls Artesunat nicht verfügbar ist, wird eine intramuskuläre Therapie mit Artemether empfohlen, das jedoch weniger rasch wirkt als Artesunat (56). Chinin sollte nach den aktuellen Empfehlungen der WHO bei schwerer Malaria nur noch verwendet werden, wenn keine Artemisinin-Derivate verfügbar sind (14). Für Patienten mit schwerer Malaria in ländlichen Gebieten, bei denen der Beginn einer parenteralen Therapie z.B. durch Transport mehrere Stunden verzögert wird und die keine oralen Medikamente einnehmen können, kann eine einmalige rektale Artesunat-Gabe die Prognose verbessern (57). Im Anschluss an eine parenterale Therapie sollte bei allen Patienten eine 3-tägige Standard-ACT zur vollständigen Elimination verbleibender Parasiten erfolgen.

Supportive Therapie-Maßnahmen haben einen unterschiedlichen Stellenwert. Während sich Glukokortikoide, Mannitol-Infusionen und eine prophylaktische Antikonvulsiva-Gabe als wirkungslos bzw. nachteilig erwiesen haben, ist die Empfehlung des frühzeitigen Einsatzes von Hämofiltration bzw. Hämodialyse bei Nierenversagen und metabolischer Azidose unumstritten (9).

Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten wird in der Regel bei Hämoglobinkonzentrationen unter 7 g/dl empfohlen, in afrikanischen Gebieten mit hoher Prävalenz von chronischer Anämie abhängig von der Verfügbarkeit von Blutkonserven bei Werten unter 5 g/dl. Bei nicht-semiimmunem erwachsenen Patienten sollten vor allem kardiale und pulmonale Komorbiditäten bei der Entscheidung für oder gegen eine Transfusion mit in Betracht gezogen werden. Hypoglykämien stellen eine häufige Komplikation bei schwerer Malaria dar, vor allem

unter Chinin-Therapie. Die Blutzuckerwerte sollten daher regelmäßig überwacht und ggf. durch Glukoseinfusionen stabilisiert werden.

Eine besondere Herausforderung stellt die Volumen-Supplementation dar. Eine Standard-Bolusgabe von i.v. Flüssigkeit mit oder ohne Albumin erhöht bei febrilen afrikanischen Kindern mit Hypotonie bei Malaria die Mortalität (58). Azidose und Nierenfunktion können durch liberale i.v. Volumen-Supplementation oftmals nur wenig beeinflusst werden, da sie meist eher durch Sequestration und daraus resultierender Mikrozirkulationsstörung bedingt sind, als durch Hypovolämie. Demgegenüber ist die Gefahr des Lungenödems bei liberaler Volumen-Supplementation deutlich erhöht (59).

2 Eigene Arbeiten

2.1 Artemisinin-basierte Malariatherapie bei Kindern in Afrika

2.1.1 Pyronaridin-Artesunat Kombinationstherapie zur Behandlung von Kindern mit unkomplizierter Malaria in Gabun

Ramharter M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp I, Bélard S, Schlie M, Kammer J, Koumba PK, Cisse B, Mordm uller B, Lell B, Issifou S, Oeuvray C, Fleckenstein L, Kreamsner PG. Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated falciparum malaria in pediatric patients in Gabon. Journal of Infectious Diseases, 09/2008, 911-9, 198

Kleinkinder in Subsahara-Afrika sind bezuglich Morbidität und Mortalität weltweit am schwersten von Malaria betroffen. Sie sind daher die Hauptzielgruppe bei der Entwicklung neuer Malariamedikamente. In dieser Phase II Studie wurden 60 gabunische Kinder im Alter von 2-14 Jahren in 4 Behandlungsgruppen über drei Tage mit unterschiedlichen Dosierungen (6:2, 9:3 und 12:4 mg/kg) einer Pyronaridin-Artesunat Kombinationstherapie behandelt. Neben drei Tabletten-Koformulierungen wurde eine spezielle pädiatrische Granulen-Darreichungsform in der Dosierung 9:3 mg/kg untersucht. Primäre Studienendpunkte waren Verträglichkeit, Sicherheit und Pharmakokinetik. Wirksamkeit war als sekundärer Endpunkt definiert.

Verträglichkeit und Sicherheit wurden in allen Dosisgruppen als gut bewertet. In der pharmakokinetischen Analyse zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Blut-/Plasma-Konzentrationen. Die Bioverfugbarkeit der pädiatrischen Granulen-Darreichungsform war vergleichbar zur entsprechenden Tabletten-Koformulierung. Die PCR-korrigierte Heilungsrate an Tag 28 in der Per-Protocol-Analyse war in allen 4 Behandlungsgruppen 100%.

Aufgrund dieser Phase II Ergebnisse wurde eine Weiterentwicklung der Pyronaridin-Artesunat Kombinationstherapie sowohl für die Tabletten-Koformulierung als auch für die pädiatrische Granulen-Koformulierung empfohlen.

<https://doi.org/10.1086/591096>

2.1.2 *In vitro*-Aktivität von Pyronaridin gegen *Plasmodium falciparum* in Gabun

Kurth F, Pongratz P, Bélard S, Mordm uller B, Kremsner PG, Ramharter M. In vitro activity of pyronaridine against Plasmodium falciparum and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays. Malaria Journal, 2009, 79-85, 8

Ex vivo Testungen von Antimalaria-Wirkstoffen liefern wichtige Informationen über die Sensitivität von Plasmodium-Isolaten gegenüber bekannten und neuen Malariamedikamenten. In dieser Arbeit wurden die *in vitro*-Aktivitäten von Pyronaridin, Artesunat, Chloroquin und Chinin an *P. falciparum* Isolaten von Malariapatienten in Lambaréné, Gabun, getestet. Für Pyronaridin geschah dies in diesem Gebiet erstmalig, parallel zur klinischen Entwicklung der Wirkstoffkombination Pyronaridin-Artesunat, die sich damals in der Phase II befand. Für die anderen Medikamente gab es bereits mehrere Voruntersuchungen aus Gabun. Methodisch wurden parallel der seit langem von der WHO etablierte Mikroskopie-basierte Schizonten-Maturations-Inhibition-Assay sowie der ELISA-basierte HRP-2 Assay durchgeführt und miteinander verglichen.

Pyronaridin zeigte eine hohe *in vitro* Aktivität gegen *P. falciparum* mit einer Cut-off-Konzentration im geometrischen Mittel von 9,3 nmol/l (95 % KI 5,2-13,9) und 50 %-effektiven Konzentrationen von 1,9 nmol/l (95 % KI 1,4-2,5) im WHO Test und 2,0 nmol/l (95 % KI 1,6-2,6) im HRP-2 Assay. Bei einem Isolat bestand eine verminderte *in vitro* Sensitivität gegenüber Artesunat. Die Resistenz-Niveaus von Chloroquin und Chinin waren denen der Voruntersuchungen vergleichbar. Die Ergebnisse der Testungen im WHO- und HRP-2 Assay zeigten eine gute Übereinstimmung.

Research

Open Access

***In vitro* activity of pyronaridine against *Plasmodium falciparum* and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays**

Florian Kurth*^{1,2,3}, Peter Pongratz^{1,2}, Sabine B elard^{1,2,4},

Benjamin Mordm uller^{1,2}, Peter G Kremsner^{1,2} and Michael Ramharter^{1,5}

Address: ¹Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambaréné, Gabon, ²Institute for Tropical Medicine, Department of Parasitology, University of Tübingen, Tübingen, Germany, ³Department of Paediatrics, University Hospital Carl Gustav Carus Dresden, Dresden, Germany, ⁴Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Freiburg, Freiburg, Germany and ⁵Department of Medicine I, Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Email: Florian Kurth* - florian.kurth@uniklinikum-dresden.de; Peter Pongratz - PPongratz@gmx.at; Sabine Bélard - sabinebelard@yahoo.de; Benjamin Mordm uller - benjamin.mordmueller@uni-tuebingen.de; Peter G Kremsner - peter.kremsner@uni-tuebingen.de; Michael Ramharter - michael.ramharter@meduniwien.ac.at

* Corresponding author

Published: 23 April 2009

Received: 18 November 2008

Malaria Journal 2009, 8:79 doi:10.1186/1475-2875-8-79

Accepted: 23 April 2009

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/79>

  2009 Kurth et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Pyronaridine, a Mannich base anti-malarial with high efficacy against drug resistant *Plasmodium falciparum*, is currently evaluated as a fixed dose combination with artesunate for the treatment of uncomplicated malaria. In this study, the *in vitro* activity of pyronaridine against clinical isolates of *P. falciparum* from Lambaréné, Gabon, was assessed in order to obtain baseline data on its activity prior to its future use in routine therapy. Moreover, follow-up assessment on the *in vitro* activity of chloroquine, artesunate and quinine was performed.

Methods: *In vitro* response of field isolates of *P. falciparum* to pyronaridine, chloroquine, artesunate and quinine was assessed using the traditional WHO microtest. In addition, the histidine-rich protein 2 (HRP-2) assay was performed and evaluated for its future implementation for follow-up of drug susceptibility testing.

Results: Pyronaridine exhibited a high *in vitro* activity against *P. falciparum*, with a geometric mean cut-off concentration of 9.3 nmol/l. Fifty percent effective concentrations were 1.9 nmol/l and 2.0 nmol/l in the WHO microtest and HRP-2 assay, respectively. Results matched closely *in vivo* findings from a recent clinical trial on pyronaridine-artesunate treatment. One isolate showed diminished sensitivity to artesunate. For chloroquine and quinine resistance levels were comparable to prior studies from Lambaréné. Results from the novel HRP-2 assay corresponded well to those obtained by the WHO microtest.

Conclusion: Pyronaridine is highly active in chloroquine-resistant parasites and seems a promising partner drug for artemisinin-based combination therapy in Africa.

Background

Malaria continues to be a major cause of morbidity and mortality in sub-Saharan Africa, particularly in young

children. Early detection and effective chemotherapy remain the cornerstones in its control [1]. The rapid development and spread of anti-malarial drug resistance has

made surveillance of drug sensitivity a high priority issue. In addition to assessing the activity of common anti-malarials against *Plasmodium falciparum* in routine surveys, the evaluation of new compounds against field isolates is of major importance for drug development.

In Lambaréné, Gabon, routine anti-malarial drug susceptibility monitoring has been performed since 1992 [2-5]. So far the WHO microtest – one of the longest used and best validated assays for the assessment of *in vitro* drug sensitivity under field conditions – has been used for this purpose [6]. Meanwhile, novel methods in drug susceptibility testing have been developed, such as the histidine-rich protein II (HRP-2) assay [7]. This method, based on HRP-2 measurement in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), is equally simple to implement, but considerably less labour intensive compared with the WHO microtest. Due to these advantages, the WHO microtest will be replaced for standard drug susceptibility monitoring in Lambaréné in the future by the novel HRP-2 assay. Previous findings from laboratory adapted clones and from different geographical regions suggest that results obtained by the HRP-2 assay be comparable with those obtained by the WHO microtest [7].

The anti-malarial agent pyronaridine is a Mannich base derivative of mepacrine, one of the earliest synthetic anti-malarials [8]. It is currently evaluated as a fixed dose combination with artesunate for the treatment of uncomplicated falciparum and vivax malaria in adult and paediatric patients [9]. Its anti-plasmodial activity involves interference with the glutathione-dependent detoxification of haem and targeting of β -haematin formation [10]. Reports from paediatric patients in Africa showed that pyronaridine is effective against chloroquine resistant strains of *P. falciparum in vivo* [9,11], yet data from South-East Asia indicate the potential for rapid development of resistance against pyronaridine, when used as monotherapy [12].

The present study aimed to assess the susceptibility of clinical *P. falciparum* field isolates from Lambaréné to pyronaridine in order to obtain baseline data on the activity of this for Africa yet novel anti-malarial drug prior to its widespread use in routine therapy. In addition the study was designed to assess the potential for the novel HRP-2 assay to replace the standard WHO microtest.

Methods

Study area and patients

The study was carried out at the Medical Research Unit of the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné, Gabon, in a region of stable, hyperendemic *P. falciparum* malaria transmission [13,14]. Patients attending the outpatient clinic between March and October 2006 were asked to

participate in the study if they met the following inclusion criteria: *P. falciparum* mono-infection with 1,000–100,000 asexual parasites per μ l blood, no schizontaemia, no signs or symptoms of severe malaria, and no history of intake of anti-malarial drugs in the preceding month. Information about age, sex, and duration of fever was collected on a questionnaire. Informed consent was obtained from participants or their legal representatives. The study was approved by the Ethics Committee of the International Foundation for the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné.

In vitro drug sensitivity assays

Two different methods of drug sensitivity testing were deployed in order to assess the susceptibility of fresh field isolates of *P. falciparum* to pyronaridine, artesunate, chloroquine and quinine. First, the standard World Health Organization *in vitro* microtest was used similar to previous reports, measuring drug-dependent inhibition of schizont maturation (SMI) within 24 hours by microscopic assessment [2-5]. Briefly, two millilitres of venous blood were mixed with complete parasite culture medium (RPMI 1640, 200 μ M hypoxanthine, 25 mM HEPES, 0.5% albumax, 2 mM l-glutamine) to a final concentration of 5% blood medium mixture (BMM). Ninety-six-well test plates were pre-dosed in ascending quantities of drugs, dosing each plate with all respective drugs for one isolate. Final drug concentrations were 0.5–365.9 nmol/l BMM for pyronaridine (Mr: 910.04), 0.1–85.8 nmol/l BMM for artesunate (Mr: 384.425), 0.8–51.2 μ mol/l blood for chloroquine (Mr: 515.867) and 55–3567 nmol/l BMM for quinine (Mr: 785.06). Artesunate, chloroquine and quinine were dissolved in 70% ethanol, pyronaridine was resuspended in distilled water. In accordance to the protocols distributed by the World Health Organization drug concentrations for chloroquine are expressed as related to blood due to their considerable accumulation in erythrocytes [6].

Fifty μ l BMM were transferred into scheduled wells and incubated at 37.5°C in candle jars. After 24 hours parasites were harvested and Giemsa-stained thick blood films were prepared. The number of mature schizonts was microscopically counted against 200 asexual parasites in each well. Tests were considered successful if at least 10% schizont maturation was observed in the drug-free control-well.

In addition, the HRP-2 assay was performed according to the published standard operational procedures [7]. Two ml of venous blood were mixed with parasite medium to a concentration of 3% BMM. Test plates were pre-dosed to the same final concentrations as in the WHO test and incubated for 72 hours at 37°C in candle jars. To test for successful *in vitro* parasite-growth, a thick blood smear of

one control-well was performed after 26 h. One non-treated 26 h sample was frozen to calculate background HRP-2 production. Parasite culture was judged successful if at least 10% parasites matured to schizonts at the 26-hour time point. After 72 h plates were freeze-thawed twice. Parasite growth, calculated from HRP-2 levels, was measured with an enzyme linked immunosorbent assay at an absorbent maximum of 450 nm.

Statistical analysis

Non-linear regression analysis with 4-parameter fits of log-concentration/response curves was used to determine individual inhibitory concentrations of the respective isolates. All regressions were checked manually. Cut off concentrations were calculated as geometric mean of the lowest individual concentrations with no mature schizont among 200 parasites in the WHO microtest. Nonparametric analysis was used for concentration data that was not normally distributed. A two-tailed Mann-Whitney-U-Test was performed in order to test for difference between the two drug sensitivity assays. All tests were performed at a two sided significance level of $\alpha = 0.05$.

Results

Ninety-five outpatients attending the Albert Schweitzer Hospital were included in this study. The patients' median age was three years, ranging from three month to 18 years, and 55% were female. Median asexual parasitaemia at presentation was 36,500 per μ l blood. In the schizont maturation microtest 32, 36, 34, and 32 out of 95 isolates yielded valid results for pyronaridine, chloroquine, artesunate and quinine, respectively. Twenty-five isolates fulfilled the criteria for successful parasite-culture in the HRP-2 assay and 15, 16, 12 and 14 were successfully employed for drug sensitivity testing, respectively. Post-hoc analysis of the unexpected low success rate of cultivation, especially in the HRP-2 assay, revealed that poor growth was associated with one lot of the commercially acquired medium. Those isolates were identified and excluded from the analysis. Table 1 shows 50 percent, 99

percent and cut-off concentrations of the tested drugs as obtained by the WHO microtest and HRP-2 assay.

Pyronaridine

Pyronaridine inhibited *in vitro* growth and schizont maturation in the WHO assay at a geometric mean cut-off concentration of 9.3 nmol/l BMM. The respective geometric mean EC₉₉ concentration in the HRP-2 assay was 9.0 nmol/l. In one isolate schizont maturation was observed at a pyronaridine concentration of 122 nmol/l BMM, resulting in a cut-off concentration of 366 nmol/l BMM. Further two isolates showed cut-off concentrations of 122 nmol/l. Geometric mean EC₅₀ values were 1.9 and 2.0 nmol/l BMM for the WHO microtest and the HRP-2 assay, respectively.

Chloroquine

The geometric mean cut-off concentration for chloroquine was 21.7 μ mol/l blood in the WHO assay, 19.2 μ mol/l blood was the respective EC₉₉ value in the HRP-2 assay. The most sensitive isolate showed a cut-off concentration of 3.2 μ mol/l blood, all other isolated exhibited cut-off concentrations of 6.4 μ mol/l blood or higher. In four parasite cultures, microscopic assessment revealed schizont maturation up to the highest concentration of 51.3 μ mol/l blood. The 50 percent effective concentrations were 7.1 μ mol/l blood in the WHO microtest and 5.5 μ mol/l in the HRP-2 assay, respectively.

Artesunate

Fifty percent effective concentrations were 2.1 nmol/l BMM in the microtest and 2.3 nmol/l BMM in the HRP-2 assay for artesunate. Two isolates exhibited schizont maturation at 28.6 nmol/l BMM, yielding cut-off concentrations of 85 nmol/l BMM. In one isolate *in vitro* schizont maturation was not inhibited by the highest artesunate concentration of 85 nmol/l BMM. The same isolate exhibited good sensitivity to pyronaridine and to quinine. The geometric mean cut-off concentration was 9.2 nmol/l

Table 1: EC₅₀, EC₉₉ and cut-off concentrations of pyronaridine, chloroquine, artesunate and quinine in WHO microtest and HRP-2 assay

	N	EC ₅₀ (95%CI)	WHO Microtest		N	HRP-2 assay	
			Cut-off concentration (95%CI)			EC ₅₀ (95% CI)	EC ₉₉ (95%CI)
Pyronaridine	32	1.87 (1.40–2.48)	9.32 (5.2–13.9)		15	2.03 (1.57–2.63)	9.03 (6.42–12.69)
Chloroquine	36	7.1 (5.2–9.6)	21.7 (15.4–30.6)		16	5.5 (4.4–6.9)	19.2 (15.3–24.2)
Artesunate	34	2.08 (1.48–2.92)	9.24 (6.53–13.06)		12	2.25 (1.70–2.99)	15.24 (10.45–22.24)
Quinine	32	272 (210–353)	873 (723–1053)		14	204 (167–250)	662 (561–781)

All values are in nmol/l BMM except for chloroquine (μ mol/l blood), Means and 95% confidence intervals are depicted as antilog of arithmetic mean of log-transformed data

BMM. The HRP-2 assay showed a mean EC₉₉ level of 15.2 nmol/l BMM.

Quinine

All isolates were susceptible to quinine. Highest cut-off concentrations were at 1783 nmol/l BMM, thus well below the threshold of resistance (5120 nmol/l BMM). The geometric mean cut-off concentration was 873 nmol/l, the EC₉₉ in the HRP-2 assay was 662 nmol/l BMM. The EC₅₀ values in the WHO microtest and in the HRP-2 assay were 272 and 204 nmol/l BMM, respectively.

Activity correlation of the tested drugs

Correlation analysis of EC₅₀ values of the individual isolates was performed in order to assess the relationship between sensitivity of parasites to pyronaridine, chloroquine, artesunate and quinine (Table 2). Significant correlation was found between *in vitro* activities of the anti-malarials quinine and chloroquine (r = 0.50, p < 0.005). Interestingly, the activity of pyronaridine was correlated with artesunate (r = 0.84 p < 0.0001), but not with chloroquine or quinine.

Comparison of HRP-2 assay and WHO microtest

No statistically significant differences between the EC₅₀ values from the two drug sensitivity assays were found in U-test of pooled data of the individual drugs (p = 0.82 for pyronaridine, 0.72 for artesunate, 0.11 for chloroquine and 0.20 for quinine). Differences in geometric means of EC₅₀ values were largest for chloroquine (7.1 μmol/l, 95% CI 5.2–9.6 in the WHO microtest versus 5.5 μmol/l 95% CI: 4.4–6.9 in the HRP-2 assay, p = 0.11) and quinine (272 nmol/l 95% CI: 210–353 versus 204 nmol/l 95%CI 167–250, respectively. p = 0.20). Figure 1 shows the distribution of EC₅₀ values for the respective drugs.

Cut-off concentrations as determined by the WHO microtest correlate closely to the equivalent EC₉₉ values of the HRP-2 assay (Table 1). Significantly more isolates yielded

valid results in the microtest (36%) than in the HRP-2 based assay (15%) (p < 0.001).

Discussion

Pyronaridine exhibited a high level of *in vitro* activity against isolates of *P. falciparum* from infected Gabonese subjects in this study. Fifty percent effective concentrations were 2.0 and 1.9 nmol/l, which is consistent with previously published data from studies with laboratory strains and field isolates obtained by a different drug sensitivity assay (isotopic hypoxanthine assay) [15,16].

Median pyronaridine concentrations of 9.3 nmol/l (EC₉₉ in HRP-2 assay) and 9.0 nmol/l (cut-off concentration in WHO microtest) inhibited growth of *P. falciparum in vitro*. In a recent pharmacokinetic assessment of a fixed-dose pyronaridine artesunate combination in African children, the mean maximal plasma concentrations of pyronaridine were 115 nmol/l in patients [9]. Earliest reappearances of parasites in peripheral blood in this study were observed on day 21 (one patient) and day 28 (three patients) after treatment. Interestingly, the patient with parasite reappearance on day 21 exhibited a pyronaridine plasma level of 9.9 nmol/l at that time. In polynomial regression analysis of pooled plasma levels of all patients, mean pyronaridine blood concentrations fell below levels of 9 nmol/l on day 22. First reappearances *in vivo* therefore occurred only after plasma levels fell below concentrations similar to cut-off concentrations obtained in this *in vitro* study.

Although the extrapolation of *in vitro* drug sensitivity assessments to *in vivo* data should always be cautious [17], *in vitro* results of the present study matched closely clinical findings of this clinical trial on pyronaridine-artesunate combination therapy.

The relationship between *in vitro* activity of pyronaridine and chloroquine against *P. falciparum* has been discussed controversially in previous reports and contradictory conclusions concerning cross-resistance have been drawn from studies, which found a significant correlation between pyronaridine and chloroquine *in vitro* activity and differences in activity of pyronaridine against chloroquine resistant and sensitive strains [15,16,18,19]. In the present study, *in vitro* response to chloroquine was poor in all tested isolates, yet parasites proved to be highly susceptible to pyronaridine. There was no statistically significant correlation of the *in vitro* activities of the two drugs against *P. falciparum*. These *in vitro* findings and the recently reported high cure rates of three days pyronaridine-artesunate combination therapy provide convincing evidence against a clinically significant cross resistance of pyronaridine and chloroquine *in vivo*. The results underline the usefulness of pyronaridine for the treatment of patients in

Table 2: Activity correlation between pyronaridine, chloroquine, artesunate and quinine in fresh Plasmodium falciparum isolates

		Pyronaridine	Chloroquine	Artesunate
Chloroquine	R ²	0.13	-	-
	P	0.52		
	N	30		
Artesunate	R ²	0.84	-0.07	-
	P	<.0001*	0.69	
	N	29	30	
Quinine	R ²	0.06	0.50	0.02
	P	0.74	0.0037*	0.93
	N	30	31	30

R²: correlation coefficient in pairwise correlation analysis
* statistically significant

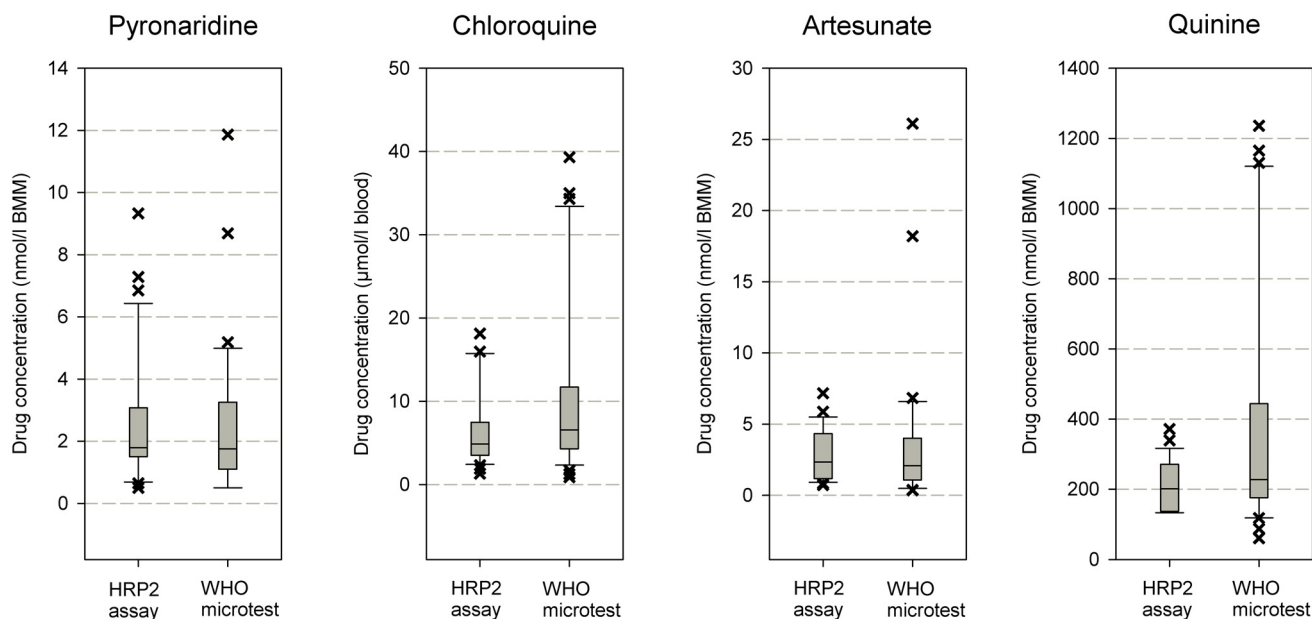


Figure 1
Box plots of pyronaridine, chloroquine, artesunate and quinine EC_{50} in HRP-2 assay and WHO microtest.

regions affected by *P. falciparum* resistant to chloroquine [9,11].

Since the first *in vitro* drug susceptibility assessment in Lambaréné in 1992 [2], high levels of resistance against chloroquine have been observed *in vitro* and *in vivo* [3-5]. Similar to previous studies *in vitro* response to chloroquine was poor in this study. EC_{50} levels were comparable to the last assessment in 2002 [5], despite a decrease in drug pressure due to a change of national treatment policies to artemisinin-based combination therapy in 2003. Artesunate was highly active against *P. falciparum* in the present assessment. EC_{50} levels were similar to recent *in vitro* and *in vivo* findings at the study site and in neighbouring countries [20-22]. One isolate showed a diminished sensitivity to artesunate with schizont maturation up to the highest concentration of 85.8 nmol/l and a corresponding EC_{50} level of 19.9 nmol/l. Another isolate had a comparably high EC_{50} value of 10.1 nmol/l and a respective cut-off concentration in the WHO microtest of 85.8 nmol/l. These findings support recent *in vitro* susceptibility assessments by Cojean *et al* [23], reporting on 6 out of 397 African *P. falciparum* isolates with dihydroartemisinin EC_{50} levels above 10 nmol/l and a maximum EC_{50} of 31.8 nmol/l in one isolate. Especially in the light of increasing availability and use of artemisinins in many parts of Africa, the importance of close surveillance for susceptibility as well as strict deployment of artemisinins exclusively

in combination therapy with effective partner drugs cannot be overemphasized.

As in previous reports from Lambaréné, susceptibility to quinine was high in this study. Mean EC_{50} (204 and 272 nmol/l in HRP-2 assay and WHO microtest, respectively) were comparable to results obtained in 2002 (286 nmol/l) [5]. Despite its widespread use, quinine remains a highly effective anti-malarial in Gabon, especially as drug of choice for parenteral treatment of hospitalized patients.

Comparative assessment of the HRP-2 assay and WHO microtest was performed in order to establish baseline data for the use of the ELISA based assay in Lambaréné in the future. Results obtained by the HRP-2 assay closely paralleled those obtained by the WHO microtest despite methodological problems in this study due to a deficient batch of culture medium. Considering its reduced labour-intensity and good reproducibility the HRP-2 assay can, therefore, be recommended for follow up of anti-malarial drug susceptibility testing and will replace the WHO microtest in future assessments at our study site.

Conclusion

Artesunate, chloroquine and quinine *in vitro* drug activity was similar, compared to data from earlier *in vitro* assessments, and results of the HRP-2 assay were comparable to those obtained by the traditional WHO microtest.

The study demonstrated high anti-malarial activity of pyronaridine against fresh field isolates of *P. falciparum* and corresponded well to recent findings of pyronaridine anti-malarial activity *in vivo*. Pyronaridine is recommended for further clinical development in combination therapy and continued *in vitro* drug activity monitoring.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FK contributed to the conception and design of the study, performed parasite cultivation and microscopic assessment, analysed the data and wrote the manuscript. PP performed parasite cultivation and HRP-2 immunoassay. SB gathered field isolates from patients and performed parasite cultivation. BM contributed to performance of immunoassay and analysis of data, PGK revised the manuscript and supervised the research group, MR conceived and designed the study, contributed to analysis of data, performed second reading for microscopic assessments in WHO microtest and drafted and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thankfully acknowledge the participations of our patients in the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné. This study was supported by a grant of the independent Karl Landsteiner Gesellschaft, Austria.

References

- Kremsner PG, Krishna S: **Antimalarial combinations.** *Lancet* 2004, **364**:285-294.
- Winkler S, Brandts C, Wernsdorfer WH, Graninger W, Bienzle U, Kremsner PG: **Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Gabon. Activity correlations between various antimalarials.** *Trop Med Parasitol* 1994, **45**:214-218.
- Philipps J, Radloff PD, Wernsdorfer W, Kremsner PG: **Follow-up of the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarials in Gabon.** *Am J Trop Med Hyg* 1998, **58**:612-618.
- Borrmann S, Binder RK, Adegnik AA, Missinou MA, Issifou S, Ramharther M, Wernsdorfer WH, Kremsner PG: **Reassessment of the resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in Gabon: implications for the validity of tests in vitro vs. in vivo.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**:660-663.
- Ramharther M, Wernsdorfer WH, Kremsner PG: **In vitro activity of quinolines against *Plasmodium falciparum* in Gabon.** *Acta Trop* 2004, **90**:55-60.
- In vitro test (mark II) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine/pyrimethamine and amodiaquine. WHO document CTD/MAL/97.20 Rev 2 2001** [<http://www.who.int/drugresistance/malaria/en/markiii.pdf>]
- Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C: **Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:1658-1664.
- Chang C, Lin-Hua T, Jantanaivat C: **Studies on a new antimalarial compound: pyronaridine.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992, **86**:7-10.
- Ramharther M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp IV, Belard S, Schlie M, Kammer J, Koumba PK, Cisse B, Mordmuller B, Lell B, Issifou S, Oeuvray C, Fleckenstein L, Kremsner PG: **Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated falciparum malaria in pediatric patients in Gabon.** *J Infect Dis* 2008, **198**:911-919.
- Auparakitanon S, Chapoomram S, Kuaha K, Chirachariyavej T, Wilairat P: **Targeting of hematin by the antimalarial pyronaridine.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:2197-2200.
- Ringwald P, Bickii J, Basco LK: **Efficacy of oral pyronaridine for the treatment of acute uncomplicated falciparum malaria in African children.** *Clin Infect Dis* 1998, **26**:946-953.
- Yang HL, Liu DQ, Yang YM, Huang KG, Dong Y, Yang PF, Liao MZ, Zhang CY: **In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to eight antimalarials in China-Myanmar and China-Lao PDR border areas.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997, **28**:460-464.
- Ramharther M, Adegnik AA, Agnandji ST, Matsiegui PB, Grobusch MP, Winkler S, Graninger W, Krishna S, Yazdanbakhsh M, Mordmüller B, Lell B, Missinou MA, Mavoungou E, Issifou S, Kremsner PG: **History and perspectives of medical research at the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné, Gabon.** *Wien Klin Wochenschr* 2007, **119**:8-12.
- Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH: **Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon.** *Trop Med Parasitol* 1995, **46**:77-82.
- Pradines B, Mabika Mamfoumbi M, Parzy D, Owono Medang M, Lebeau C, Mourou Mbina JR, Doury JC, Kombila M: **In vitro susceptibility of African isolates of *Plasmodium falciparum* from Gabon to pyronaridine.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**:105-108.
- Vivas L, Rattray L, Stewart L, Bongard E, Robinson BL, Peters W, Croft SL: **Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination in vitro and in vivo.** *Acta Trop* 2008, **105**:222-228.
- Eklund EH, Fidock DA: **In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes.** *Int J Parasitol* 2008, **38**:743-747.
- Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, Hienne R, Trape JF, Doury JC: **In-vitro activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents.** *J Antimicrob Chemother* 1998, **42**:333-339.
- Elueze EI, Croft SL, Warhurst DC: **Activity of pyronaridine and mepacrine against twelve strains of *Plasmodium falciparum* in vitro.** *J Antimicrob Chemother* 1996, **37**:511-518.
- Pradines B, Hovette P, Fusai T, Atanda HL, Baret E, Cheval P, Mosnier J, Callec A, Cren J, Amalvict R, Gardair JP, Rogier C: **Prevalence of in vitro resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among *Plasmodium falciparum* isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2404-2408.
- Ramharther M, Kurth FM, Belard S, Bouyou-Akotet MK, Mamfoumbi MM, Agnandji ST, Missinou MA, Adegnik AA, Issifou S, Cambon N, Heidecker JL, Kombila M, Kremsner PG: **Pharmacokinetics of two paediatric artesunate mefloquine drug formulations in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Gabon.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:1091-1096.
- Ramharther M, Noedl H, Thimasarn K, Wiedermann G, Wernsdorfer G, Wernsdorfer WH: **In vitro activity of tafenoquine alone and in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:39-43.
- Cojean S, Hubert V, Le Bras J, Durand R: **Resistance to dihydroartemisinin.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:1798-1799.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



2.1.3 Pädiatrische Darreichungsformen Artemisinin-basierter Kombinationstherapien bei Kindern mit Malaria – systematischer Review und Metaanalyse

Kurth F, Bélard S*, Adegnika AA, Gaye O, Kremsner PG, Ramharter M. Do paediatric drug formulations of artemisinin combination therapies improve the treatment of children with malaria? A systematic review and meta-analysis. Lancet Infectious Diseases, 02/2010, 125-32, 10 *geteilte Erstautorenschaft*

Probleme bei der Tabletten-Verabreichung sind oft wesentliche Hindernisse für eine effektive Malariatherapie bei Kleinkindern. Die jungen Patienten können größere Tabletten oft schlecht hinunterschlucken, bei gemörserten Tabletten kann bitterer Geschmack zu vermehrtem medikamenteninduzierten Erbrechen führen, und durch schlechte Teilbarkeit von Tabletten oder Beimischung in Milch oder Brei kommt es häufig zu inadäquaten Dosierungen.

Aus diesen Gründen wurden spezielle pädiatrische „non-tablet“-Darreichungsformen von Artemisinin-basierten Kombinationstherapien entwickelt, die in mehreren Einzel-Studien vergleichbare Wirksamkeit und Sicherheit zu herkömmlichen Tabletten-Koformulierungen gezeigt haben. In diesem systematischen Review mit Metaanalyse wurde die Evidenz für eine Überlegenheit in der Verträglichkeit pädiatrischer Darreichungsformen von Artemisinin-basierten Kombinationstherapien gegenüber Tabletten-Koformulierungen untersucht.

Es wurden 7 Studien mit einer Gesamtpatientenzahl von 2.515 Kindern in die Analyse eingeschlossen. Wirksamkeit und Sicherheit waren in beiden Gruppen gleichwertig. Auch die PCR korrigierten Heilungsraten an Tag 28 waren vergleichbar: 2,0 % (23/1154) der Kinder, die mit pädiatrischen Darreichungsformen behandelt wurden, versus 1,7 % (19/1137) der Kinder mit Tabletten-Behandlung wurden durch die Therapie nicht geheilt (RR 1,27; 95 % KI 0,66-2,44).

Bezüglich der Verträglichkeit der Medikamenten-Verabreichung fand sich eine Überlegenheit der pädiatrischen Darreichungsformen im Vergleich zu den Tabletten-

Koformulierungen: Patienten, die mit pädiatrischen Darreichungsformen behandelt wurden, hatten weniger Medikamenten-induziertes Erbrechen (93/1018 versus 114/837 Patienten; RR 0,78; 95 % KI 0,61–0,99) und weniger Medikamenten-assoziierte Gastrointestinal-Beschwerden (8/545 versus 15/358 Patienten; RR 0,36; 95 % KI 0,15–0,85).

Durch diese Daten wurde erstmals wissenschaftlich belegt, dass die Verwendung von pädiatrischen „non-tablet“-Darreichungsformen zu einer verbesserten Behandlung von pädiatrischen Patienten führt.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70327-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70327-5)

2.2 Artemisinin-basierte Malariatherapie bei Migranten und Reiserückkehrern in Europa

2.2.1 Therapie der schweren Malaria in Europa

2.2.1.1 Ergebnisse der multizentrischen Beobachtungsstudie des Europäischen Netzwerkes für Tropen- und Reisemedizin (TropNet) zu schwerer Malaria in Europa.

*Kurth F, Develoux M, Mechain M, Malvy D, Clerinx J, Antinori S, Gjørup IE, Gascon J, Mørch K, Nicastri E, Ramharter M, Bartoloni A, Visser L, Rolling T, Zanger P, Calleri G, Salas-Coronas J, Nielsen H, Just-Nübling G, Neumayr A, Hachfeld A, Schmid ML, Antonini P, Lingscheid T, Kern P, Kapaun A, Saraiva da Cunha J, Pongratz P, Soriano-Arandes A, Schunk M, Suttorp N, Hatz C, Zoller T. Severe malaria in Europe – An eight-year multi-centre observational study. *Malaria Journal*, 2017, 57-68, 16*

Da europäische Reisende und Migranten in der Regel keinen oder nur wenig Schutz gegen die Malaria durch Semi-Immunität besitzen, ist das Risiko eine schwere Malaria zu entwickeln für sie deutlich höher als für Patienten in Endemiegebieten.

In dieser Beobachtungsstudie des Europäischen Netzwerkes für Tropen- und Reisemedizin (TropNet) wurden zwischen 2006 und 2014 epidemiologische Daten, Behandlungsmodalitäten und Behandlungsergebnisse von 185 Patienten mit schwerer Malaria (gemäß den WHO-Kriterien von 2006) aus 12 europäischen Ländern erfasst. Drei Patienten verstarben, die Überlebensrate an Tag 28 betrug 98,4 %. Während des Studienzeitraumes zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Anteils von Patienten, die mit i.v. Artesunat behandelt wurden, von 27 % im Jahr 2006 auf 60 % im Jahr 2013. Die medikamentösen Behandlungsregime waren auffallend divers, in den 28 Studienzentren kamen 56 verschiedene Kombinationen von parenteralen und oralen Malariamedikamenten zur Anwendung. Respiratorisches Versagen mit der Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung war assoziiert mit dem Risiko zu versterben (13 % versus 0 %; p=0,001). Patienten im Alter von ≥ 60 Jahren hatten ein statistisch signifikant höheres Risiko für akutes Nierenversagen (36 % versus 17 %;

p=0,04) und zerebrale Malaria (54 % versus 20 %; p=0,001) als jüngere Patienten. Bei 27 % (19/70) der Patienten, die mit i.v. Artesunat behandelt wurden, kam es zu verzögerten hämolytischen Reaktionen in den Wochen nach der Therapie.

RESEARCH

Open Access



Severe malaria in Europe: an 8-year multi-centre observational study

Florian Kurth¹, Michel Develoux², Matthieu Mechain³, Denis Malvy³, Jan Clerinx⁴, Spinello Antinori⁵, Ida E. Gjørup⁶, Joaquim Gascon⁷, Kristine Mørch^{8,9}, Emanuele Nicastrì¹⁰, Michael Ramharter^{11,12}, Alessandro Bartoloni¹³, Leo Visser¹⁴, Thierry Rolling^{15,16}, Philipp Zanger^{12,17}, Guido Calleri¹⁸, Joaquín Salas-Coronas¹⁹, Henrik Nielsen²⁰, Gudrun Just-Nübling²¹, Andreas Neumayr^{22,23}, Anna Hachfeld²⁴, Matthias L. Schmid²⁵, Pietro Antonini²⁶, Tilman Lingscheid¹, Peter Kern²⁷, Annette Kapaun²⁸, José Saraiva da Cunha²⁹, Peter Pongratz³⁰, Antoni Soriano-Arandes^{31,32}, Mirjam Schunk³³, Norbert Suttorp¹, Christoph Hatz^{22,23} and Thomas Zoller^{1,22,23*}

Abstract

Background: Malaria remains one of the most serious infections for travellers to tropical countries. Due to the lack of harmonized guidelines a large variety of treatment regimens is used in Europe to treat severe malaria.

Methods: The European Network for Tropical Medicine and Travel Health (TropNet) conducted an 8-year, multicentre, observational study to analyse epidemiology, treatment practices and outcomes of severe malaria in its member sites across Europe. Physicians at participating TropNet centres were asked to report pseudonymized retrospective data from all patients treated at their centre for microscopically confirmed severe *Plasmodium falciparum* malaria according to the 2006 WHO criteria.

Results: From 2006 to 2014 a total of 185 patients with severe malaria treated in 12 European countries were included. Three patients died, resulting in a 28-day survival rate of 98.4%. The majority of infections were acquired in West Africa (109/185, 59%). The proportion of patients treated with intravenous artesunate increased from 27% in 2006 to 60% in 2013. Altogether, 56 different combinations of intravenous and oral drugs were used across 28 study centres. The risk of acute renal failure (36 vs 17% $p = 0.04$) or cerebral malaria (54 vs 20%, $p = 0.001$) was significantly higher in patients ≥ 60 years than in younger patients. Respiratory distress with the need for mechanical ventilation was significantly associated with the risk of death in the study population (13 vs 0%, $p = 0.001$). Post-artemisinin delayed haemolysis was reported in 19/70 (27%) patients treated with intravenous artesunate.

Conclusion: The majority of patients with severe malaria in this study were tourists or migrants acquiring the infection in West Africa. Intravenous artesunate is increasingly used for treatment of severe malaria in many European treatment centres and can be given safely to European patients with severe malaria. Patients treated with intravenous artesunate should be followed up to detect and manage late haemolytic events.

Keywords: Malaria, Falciparum, Severe malaria, Artesunate, Quinine, *Plasmodium*, Europe, Clinical study

Background

Around 5200 cases of malaria are imported to EU countries per year, of which up to 10% progress to severe malaria [1]. Because most patients with imported

malaria are not semi-immune, progression to severe malaria is considerably more frequent in non-endemic than in endemic countries. Non-immune patients carry a substantial risk of suffering from complications of the infection itself or from complications associated with intensive care treatment.

The epidemiology of imported severe malaria is changing. In addition to tourist or business travellers to tropical

*Correspondence: thomas.zoller@unibas.ch

²² Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland
Full list of author information is available at the end of the article

regions, migrants visiting friends and relatives (VFR) in their previous home country are increasingly affected [2, 3]. This population is less likely to seek pre-travel advice and to take anti-malarial prophylaxis [4, 5]. Most migrants are not aware of the waning of semi-immunity against malaria when they travel to their home countries.

Guidelines to define and to treat severe malaria have undergone major changes in the past decade at international and national levels. Criteria for the definition of severe malaria were amended by the World Health Organization (WHO) in 2006, 2010 and 2015, particularly with regard to the definition of hyperparasitaemia [6], and numerous classification and treatment recommendations still exist across European countries. Another challenge is the transition from intravenous quinine to intravenous artesunate as first-line treatment for severe malaria. Despite its superior potential to save lives and shorten duration of hospital and intensive care unit (ICU) treatment [7–10], many difficulties with regard to registration, availability and quality of artesunate have to be overcome before it will be easily available and widely used outside of specialist referral centres for tropical medicine in Europe. The pathophysiology of late haemolytic reactions occurring 2–6 weeks after treatment is not fully understood and harmonized guidelines for follow-up care of patients receiving this drug in Europe need to be developed [11, 12].

Data on epidemiology and treatment of imported severe malaria across Europe, together with a ‘road map’ towards drug approval of intravenous artesunate for the treatment of severe malaria in non-endemic countries are needed to eventually improve and harmonize treatment recommendations. Data are however available only from national cohorts and case registries. The European Network for Tropical Medicine and Travel Health (TropNet) [13] conducted an 8-year, multi-centre, observational study to analyse epidemiology, treatment practices and outcome of severe malaria in its member sites across 12 European countries.

Methods

This multicentre observational study was performed among member sites of TropNet. All patients with microscopically confirmed severe falciparum malaria, according to the 2006 WHO criteria treated at one of the participating TropNet centres between 2006 and 2014, were eligible. Physicians at participating TropNet centres were asked to report pseudonymized retrospective data on demographic characteristics, medical and travel history, clinical presentation, anti-malarial drug regimen, supportive treatment, parasitaemia before and under treatment, complications under treatment, adverse drug reactions, outcome and follow-up during 28 days from

all patients treated for severe malaria at their centre. The treatment remained the responsibility of the treating physician. Parasite clearance time was defined as time to the first thick blood smear without evidence of asexual parasites after initiation of anti-malarial treatment. For the analysis of this dataset, post-artemisinin delayed haemolysis (PADH) was defined as a decrease in haemoglobin together with signs of haemolysis (elevated LDH) after completion of anti-malarial treatment and complete parasite clearance. Electronic case report forms were used for data entry and transmission to the coordinating centre at Charité University Hospital, Berlin, where data were transferred into a database and checked manually for plausibility.

The primary objective of this study was to assess clinical presentation, treatment and outcome in patients with imported severe malaria. Descriptive statistics was performed on sociodemographic, medical, treatment, and outcome data. Mann–Whitney U test (two groups, continuous data), Fisher exact test (two groups, categorical data), or Kruskal–Wallis test (>two groups continuous data) at a two-sided significance level of $\alpha = 0.05$ were used for comparative analysis. Analysis of variance (ANOVA) for continuous data and Pearson Chi squared test for categorical data were used to test the distribution of demographical characteristics of patients over time. Data are displayed as median (\pm interquartile range). Statistical analysis was performed using JMP (JMP 7.0, SAS Institute Inc, NC, USA).

The study was approved by the Ethics Committee of Charité University Hospital, Berlin. Ethical clearance for transfer of retrospective pseudonymized patient data was sought at participating Tropnet centres according to local regulations.

Results

From 2006 to 2014, 190 patients with severe falciparum malaria were reported by the participating 28 TropNet centres from 12 European countries. After excluding three cases without documented criteria for severe malaria and two cases with double reporting, 185 datasets were available for analysis. The number of patients per centre ranged from one to 31 patients. The number of reported patients per country is shown in Table 1.

Demography, place of infection and anti-malarial prophylaxis

Demographic data are shown in Table 2. The proportion of female patients was comparatively small (29%). The majority of patients (106/185, 57%) were of European origin without history of migration. Tourism was the main purpose of travel in Europeans (54/106, 51%), whereas VFRs were the predominant purposes of travel

Table 1 Number of study centres and reported cases per country (n = 185)

Country	Number of centres	Number of reported cases	% of total number of cases
Austria	2	7	4
Belgium	1	19	10
Denmark	2	14	7
France	2	52	28
Germany	7	15	8
Italy	5	50	27
Netherlands	1	4	2
Norway	1	7	4
Portugal	1	1	1
Spain	2	12	6
Switzerland	3	3	2
UK	1	1	1

in patients with history of migration (55/68, 81%). European patients were on average older than patients with history of migration [median age 47 (IQR 33–57) vs 36 (IQR 27–45) years, $p < 0.0001$]. All malaria infections were acquired in Africa with the exception of two cases from Central America. By far the largest proportion of infections came from West Africa (109/185, 59%), followed by Central Africa (40/185, 22%), where Cameroon was the country with the highest number of imported cases (21/185, 11%, Fig. 1). VFR patients acquired malaria infections almost exclusively in West Africa, whereas European tourists acquired infections also in the tourist destinations of East Africa (Fig. 2). There was no change in age ($F = 0.84$, $p = 0.5$), gender ($p = 0.11$), origin of patients ($p = 0.54$) or purpose of travel ($p = 0.10$) during the 8-year course of the study. Almost 9 out of 10 patients (162/185, 88%) had not taken any anti-malarial chemoprophylaxis. Among 23 patients who took anti-malarial chemoprophylaxis, only six fully adhered to the prescribed regimen.

Clinical presentation

Clinical manifestations and laboratory findings leading to classification as severe malaria are shown in Table 2. Median baseline parasitaemia was 6.5% (IQR 4–11) and hyperparasitaemia ($\geq 5\%$) was the most common criterion of severe disease, followed by jaundice, which was a criterion for severe malaria in this study according to WHO guidelines as of 2006. Eight patients with jaundice had no other vital organ dysfunction and would not have been classified as severe disease according to WHO guidelines as of 2010 [14].

Underlying chronic conditions were found in 43% of patients (63/185), of which hypertension was the most frequent (9%, 16/185). Seven per cent of patients (13/185) were HIV positive. The majority of patients (119/185, 64%) met one or two criteria of severe malaria, whereas 8% (17/185) met more than four criteria. Patients ≥ 60 years presented, on average, with more criteria for severe malaria than younger patients (median 3 vs 2, $p = 0.02$). Table 3 shows the risk of presenting with a particular criterion of severe malaria according to age (≥ 60 years vs younger patients). There was no difference in type and number of criteria for severe malaria among patients of European versus non-European origin with the exception of a lower median baseline parasitaemia (7 vs 5%, respectively, $p = 0.04$).

Anti-malarial treatment

Intravenous quinine was the main first-line treatment in 93/185 patients (50%) whereas intravenous artesunate was used in 63/185 patients (35%). Seven patients (4%) received intravenous quinine and artesunate in combination. Table 4 gives an overview of the drugs and drug combinations used as follow-on treatment after intravenous therapy. Altogether 56 different combinations of intravenous and oral drugs were used across the different centres.

The proportion of patients treated with intravenous artesunate increased steadily during the course of the study from 27% (8/30) in 2006 to 60% (18/30) in 2013. In 22/185 patients (12%) only oral first-line treatments were given such as oral quinine ($n = 16$, exclusively in Italy), oral atovaquone-proguanil ($n = 1$, in a patient with HIV), and oral artemether-lumefantrine ($n = 5$). Patients treated with oral anti-malarials presented exclusively with hyperparasitaemia ($n = 19$, median parasitaemia 7%, range 5–8%) and/or jaundice ($n = 6$) as criteria for severe malaria and had no co-morbidities (except the one patient with HIV).

Choice of the first-line treatment was very heterogeneous across different sites and was mainly dependent on the country where the patient was treated. Centres in Norway, The Netherlands and Belgium reported treatment almost exclusively with intravenous artesunate, whereas the participating treatment centres in Spain and France used intravenous quinine in the majority of reported cases (9/12, 75% and 44/50, 88%, respectively).

Concomitant and supportive treatment

An overview of supportive treatments is given in Table 5. Antibiotic therapy (44% of patients) and erythrocyte transfusion (21% of patients) were the most common. Erythrocyte exchange transfusion was performed in 8/185 (4%) patients at seven centres in Italy, Spain,

Table 2 Characteristics of patients with severe malaria (n = 185 patients in all categories)

Characteristics	n (median)	% [IQR]
Gender		
Male	132	71
Age		
Age in years	(42)	[31–52]
≥60 years	22	12
≤18 years	10	5
Origin of patients		
European, no history of migration	106	57
Immigrant/history of migration	68	37
Visitor from endemic country	11	6
Anti-malarial chemoprophylaxis		
None	162	88
Non-adherence to prescribed regimen	17	9
Doxycycline ^a	2	1
Chloroquine-proguanil ^{a,b}	2	1
Mefloquine ^a	1	1
Atovaquone-proguanil ^a	1	1
Criteria leading to classification as severe malaria		
Hyperparasitaemia >5%	132	71
Hyperparasitaemia >10% ^c	55	30
Hyperparasitaemia >2% ^c	154	83
Jaundice ^d	81	44
Impaired consciousness/coma	46	25
Acute renal failure	36	19
Liver function test >3 times upper normal	36	19
Circulatory collapse/shock	27	15
Anaemia <8 g/dl	27	15
Respiratory failure	22	12
Spontaneous/abnormal bleeding	13	7
Acidosis	9	5
Hypoglycaemia <40 mg/dl	6	3
Multiple convulsions	3	2
Number of criteria for severe malaria met by individual patients		
1	59	32
2	60	32
3	30	16
4	19	10
5	10	5
>5	7	3
Underlying co-morbidities		
Any	63	43
Hypertension	16	9
HIV	13	7
Diabetes	10	5
Chronic heart disease	8	4

Table 2 Continued

Characteristics	n (median)	% [IQR]
Hepatitis	3	2
COPD	2	1
Other chronic conditions	11	6

Data are number of patients, unless indicated otherwise

COPD chronic obstructive pulmonary disease, HIV Human immunodeficiency virus

^a Patients with reported adherence to chemoprophylaxis only

^b Chloroquine-proguanil was taken for travel to Togo in 2007 and Burkina Faso in 2010

^c Hyperparasitaemia >2 and >10% were not used as criteria for severe malaria in this study according to WHO guidelines 2006 and are shown for informational purposes only

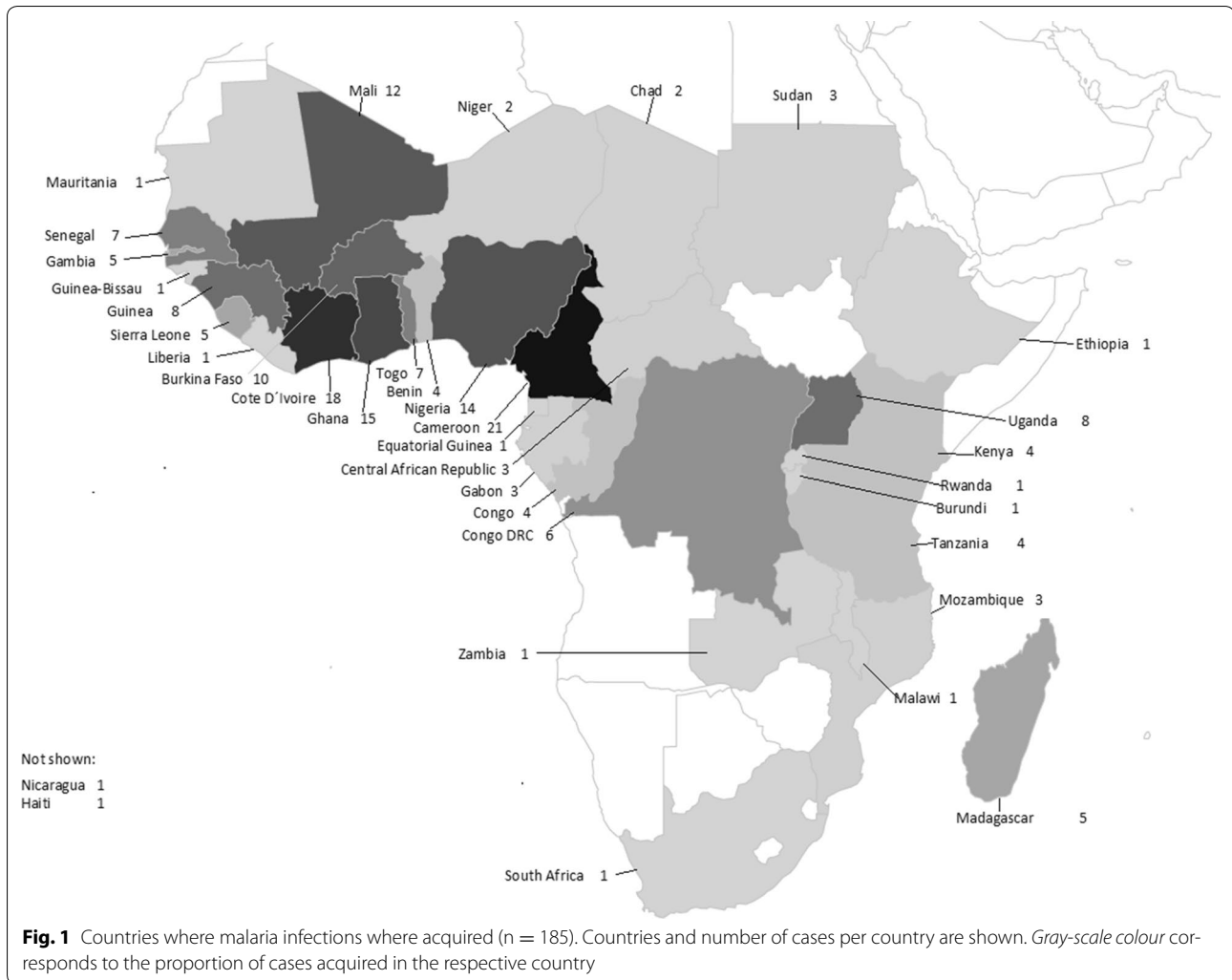
^d Clinical jaundice was used as criterion for severe malaria in this study according to WHO guidelines 2006

Belgium, and The Netherlands. Seven of these patients were treated with intravenous quinine and one with intravenous artesunate. Baseline parasitaemia was >10% in all these patients (median 18%, IQR 10–27). Erythrocyte apheresis was performed in 5/185 patients (3%) at two centres (Vienna, Austria and Leiden, The Netherlands). Parasitaemia was >15% in all these patients (median 19%, IQR 18–28) and all five patients were treated with intravenous artesunate.

Adverse drug reactions

Adverse drug reactions were reported in 27/100 patients (27%) treated with intravenous quinine, and in 21/70 (30%) patients treated with intravenous artesunate. None of them was fatal. Cinchonism was the most common adverse drug reaction in patients treated with intravenous quinine (19/100, 19%). It was rated as mild in 17/19 cases and moderate in 2/19 cases by the treating physician. Hypoglycaemia occurred in 4/100 patients (4%) and cardiac arrhythmias in 1/100 patient (1%) treated with intravenous quinine.

In patients treated with intravenous artesunate, PADH was reported in 19/70 patients (27%), a finding which first became known during the study period in the year 2011. Onset of PADH was reported during days 10 to 14 (median 14) and median duration of haemolysis was reported to be 14 (IQR 8–18) days. Three patients (15%) with PADH received blood transfusions, with 2 patients (10%) re-hospitalized (for 3–5 days, respectively). In 1 patient, PADH was reported after therapy with only oral artemether–lumefantrine. This patient and some of the other patients with delayed PADH have already been reported elsewhere [15–17].



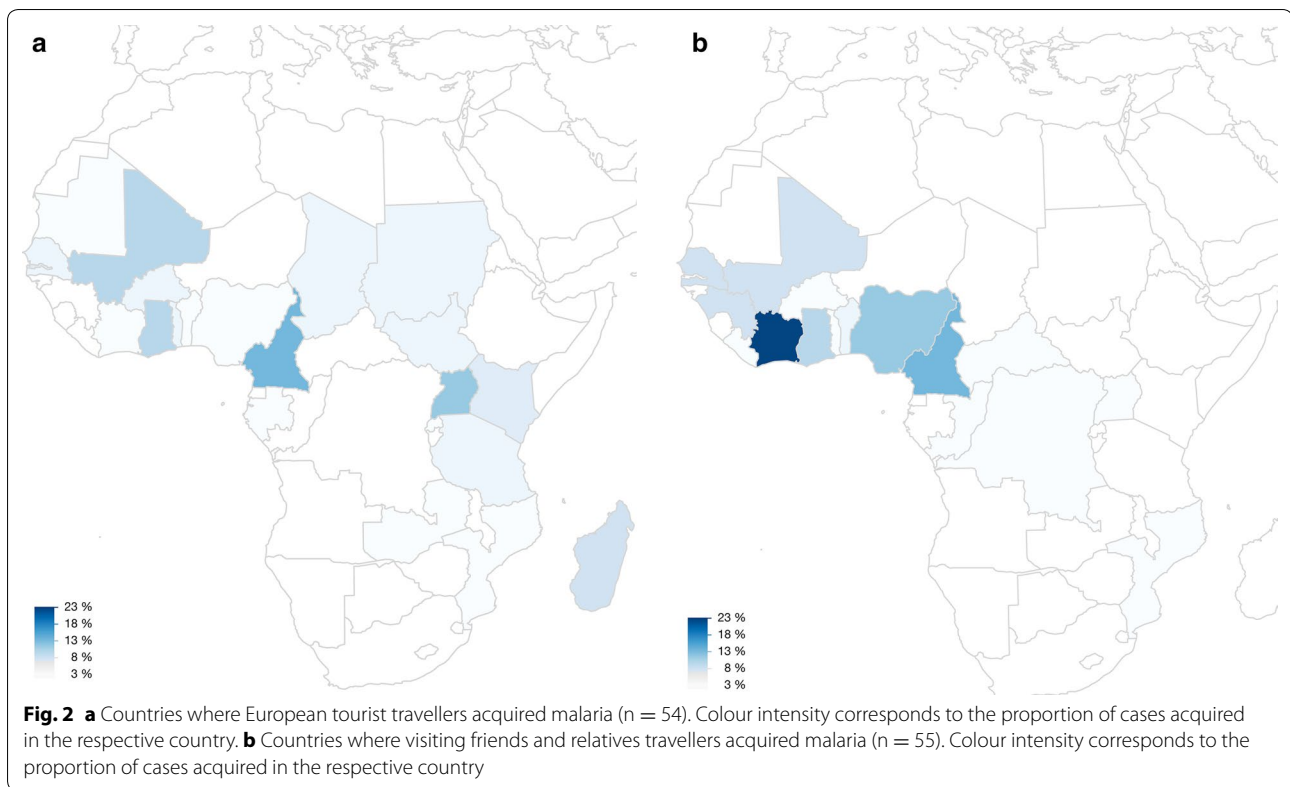
In one patient, an acute cerebellar syndrome (ataxia, dysarthria, dysmetria, adiadochokinesis) was described beginning 3 days after the end of anti-malarial treatment (day 10). The patient had not shown any neurological symptoms during the acute phase of malaria and had been treated with a loading dose of intravenous quinine on day 1, intravenous artesunate from day 1 to 4 and oral artemether–lumefantrine from day 5 to 7. An MRI scan and lumbar puncture showed no abnormalities. Due to persistence of symptoms, the patient received physiotherapy until ten weeks after anti-malarial treatment, where neurological symptoms steadily improved. Complete recovery was reported 7 months after the malaria episode.

Outcome

Three patients died, two of European origin and one with history of migration, resulting in a 28-day survival rate of 98.4%. All three patients had been treated with

intravenous quinine and one of them also with intravenous artesunate simultaneously. All deaths occurred within the first 3 days after admission. All three patients had presented with hyperparasitaemia (9, 10 and 40%) and respiratory distress requiring mechanical ventilation. Respiratory distress with the need for mechanical ventilation was significantly associated with the risk of death in the study population (13 vs 0%, $p = 0.001$). Of note, two of the patients who died were 22–34 years of age, respectively, and had no underlying co-morbidities. One of them had a history of migration. The third patient was 70 years of age, suffered from a pre-existing chronic cardiomyopathy and died from therapy-refractory shock.

In 76% of patients (117 of 153 patients with available data) treatment took place in an ICU, where the median length of stay was three (IQR 2–5) days. The median length of inpatient treatment was 7 days (IQR 5–9). Median time to 99% parasite clearance was 48 h (IQR 24–72, $n = 126$) and median time to complete parasite

**Table 3 Risk of presenting with particular criteria of severe malaria according to age ≥ 60 versus <60 years**

	Patients ≥ 60 years n = 22	Patients <60 years n = 163	p value
Cerebral malaria	12 (54)	34 (21)	0.001
Acute renal failure	8 (36)	28 (17)	0.04
Hyperparasitaemia	17 (77)	120 (73)	0.8
Jaundice	8 (36)	73 (44)	0.5
Liver function test >3 times upper normal	7 (31)	29 (17)	0.15
Shock	6 (27)	21 (13)	0.1
Anaemia	3 (14)	24 (15)	1.0
Respiratory failure	3 (14)	19 (12)	0.7
Acidosis	2 (9)	7 (4)	0.29
Spontaneous bleeding	3 (13)	10 (6)	0.19
Hypoglycaemia	1 (5)	5 (3)	0.53
Multiple convulsions	0 (0)	3(2)	1.0

Data are number of patients (%)

clearance, was 72 h (IQR 60–120, n = 104). Data showing shorter parasite clearance time and shorter ICU and inpatient treatment in patients treated with intravenous artesunate compared to intravenous quinine were reported elsewhere [8]. The 22 patients who received oral anti-malarial treatment had comparatively long median 99% parasite clearance and complete parasite clearance times (72 h, IQR 48–72, and 120 h, IQR 84–144,

respectively). There were no documented early or late parasitological failures.

Among 46 patients with cerebral malaria, six had neurological sequelae at discharge such as confusion, dysphasia, ataxia, and imbalance. In four patients (2/25 treated with artesunate vs 2/21 treated with quinine) confusion and ataxia persisted at day 28. Among 36 patients with acute renal failure at presentation, 13 (36%) patients

Table 4 Initial drug combinations and follow-on treatment in patients treated with intravenous quinine or intravenous artesunate for severe malaria

Patients	n	%
Treated with intravenous quinine	93	
Initial therapy		
Monotherapy	54	58
Combination with doxycycline	33	36
Combination with clindamycin	5	5
Combination with mefloquine	1	1
Follow-on treatment		
Oral quinine	29	31
Oral ACT	19	20
Oral AP	11	12
None ^a	34	37
Treated with intravenous artesunate	63	
Initial therapy		
Monotherapy	42	67
Combination with doxycycline	13	20
Combination with clindamycin	6	10
Combination with mefloquine	2/	3
Follow-on treatment		
Oral ACT	38	60
Oral AP	17	27
Oral quinine	2	3
Mefloquine	3	5
None ^b	3	5

Data are number of patients and %

ACT artemisinin-based combination therapy, AP atovaquone-proguanil

^a Quinine, doxycycline or clindamycin were given for at least 7 days, n = 2 patients died before initiation of subsequent therapy

^b Artesunate, doxycycline, clindamycin were given for at least 7 days

Table 5 Supportive treatments used in European patients with severe malaria (n = 185)

Supportive treatments	n	%
Antibiotic therapy	82	44
Erythrocyte transfusion	38	21
Vasopressor therapy	24	13
Mechanical ventilation	24	13
Invasive ventilation	18	
Non-invasive ventilation	6	
Haemodialysis and haemofiltration	20	11
Erythrocyte exchange transfusion	8	4
Erythrocyte apheresis	5	3

had elevated creatinine levels at discharge, which had not been reported by the patient or documented in medical charts before malarial infection. In nine of these patients

(4/17 treated with artesunate vs 5/16 treated with quinine) elevated creatinine levels persisted after day 28. Two patients suffered from necroses of fingers and toes as sequelae of vasopressor therapy during malaria.

Among eight patients with jaundice as only criterion for severe malaria, who would not have been classified as severe according to WHO 2010 criteria, none experienced documented complications of treatment or sequelae, seven were not treated at an ICU and patients had a comparably short median length of stay in hospital of 4 days (IQR 4–6).

Discussion

Imported malaria remains a relevant clinical problem due to the rapid potential progression to severe and life-threatening disease in non-immune patients. This study presents clinical and treatment data from 28 centres of the TropNet from 12 countries, one of the largest databases collected on this patient population to date. Previous studies on severe malaria in Europe are only available either at centre [18–20] or country [3, 21–23] level.

Anti-malarial treatment—intravenous artesunate

Intravenous artesunate has been shown to improve survival in patients with severe malaria in endemic areas, with particular benefit for patients with high parasitaemia (>10% infected red blood cells (RBCs)) [7, 9, 10]. A randomized, controlled trial to confirm superiority of artesunate over quinine in non-endemic areas would be unethical. Other benefits of treatment with intravenous artesunate such as shorter ICU and hospital treatment were clearly demonstrated in European patients [8].

Quinine is still widely used in Europe, but the rate of patients receiving intravenous artesunate almost doubled in the 8-year study period. In the final year 2014, every second patient received intravenous artesunate. Current surveillance data from national reference centres indicate that the proportion of patients treated with artesunate is further increasing, particularly in countries where participating centres still reported frequent treatment with quinine during this study [24]. Although prospectively collected safety data from Europe is not available, this study adds to the evidence that artesunate is effective and can safely be used to treat patients in Europe. Artesunate is used in Europe despite considerable legal problems: The manufacturer of intravenous artesunate has been prequalified for good manufacturing practice-standard (GMP) by WHO [6], but the drug is not available in a European GMP-standard quality. It has an orphan designation for Europe by the European Medicines Agency since 2007, but no marketing authorization in Europe or in USA. Only in France, USA, Belgium, Denmark, and The Netherlands, named-patient programmes or similar

protocols are in place, providing a legal basis for treating patients with this lifesaving drug [25, 26]. Until intravenous artesunate receives approval from the European Medicines Agency and the US Food and Drug Administration, the legal context for physicians procuring and applying this drug in Europe will remain unsatisfactory. This study also highlights the differences in treatment practices and guidelines across Europe: from occasional use in some countries to exclusive use of artesunate to treat severe malaria in The Netherlands or Norway. This finding likely reflects the respective national legal framework for using non-licensed drugs as well as national treatment recommendations [27]. The treatment of patients with intravenous artesunate and quinine in parallel, reported in seven patients, might also be based on judicial reasons: physicians might want to combine the most effective but unapproved drug (artesunate) with the approved and recommended standard first-line treatment (quinine) in order to avoid a legal risk [28]. No benefit of this combination has been shown compared to treatment with artesunate alone, whereas the frequency of adverse events increased [29]. A small number of patients were treated exclusively with oral anti-malarials in this study. These patients were less severely ill, including three patients with jaundice, as the only criterion for severe disease, who would not have been classified as severe according to the current WHO classification. No treatment complications were reported for these patients, yet time to parasite clearance was comparatively long. Overall, there was a remarkable variety of altogether 56 different combinations of intravenous and oral anti-malarial drugs reported. Harmonized, evidence-based European treatment guidelines would be useful to support clinicians in their choice of anti-malarial treatments.

Adverse drug reactions

Following the initial description of an episode of severe prolonged haemolysis after treatment of a patient with severe malaria with intravenous artesunate in Japan in 2002 [30], late haemolytic reactions 2–6 weeks after treatment with intravenous artesunate were described in a case series in European patients in 2011 [12], and then confirmed in studies in European [15–17] and African [31] patients. Removal of parasites from RBCs in the spleen, leaving behind a once-infected ‘pitted’ erythrocyte with a shorter life span has been shown to be a potential mechanism causing late haemolysis [11], but the pathophysiology is not fully understood. The rate of haemolytic reactions and transfusions reported in the literature is variable depending on size, context, type, and setting of a study as well as on definitions of post-treatment haemolysis; the results of the present study

are generally in line with previous observations [12, 16, 32] and late haemolysis can be expected to occur in approximately 20–30% of non-immune patients treated. As shown by the present data, a considerable proportion of them also receive blood transfusions. The results show once more that patients receiving intravenous artesunate for treatment of severe malaria should be routinely observed for signs of haemolysis at least on days 7 and 14 after treatment. An acute cerebellar syndrome 3 days after the end of anti-malarial treatment with intravenous artesunate and oral artemether lumefantrine was reported in one patient. Although the reported time until complete resolution (7 months) is longer than in most cases reported in the literature; symptoms and time of onset are suggestive of post-malaria neurological syndrome [33].

Mortality

Mortality in this patient population was very low, reflecting the high standard of intensive care in Europe. Previous single-centre and national studies reported mortality rates between 4 and 15% [3, 18, 19, 22, 34]. The proportion of patients who had criteria of severe malaria associated with adverse outcome and death was comparable to other studies (Table 2) [2, 21, 34]. Mortality might have been biased by the fact that most reporting centres are tertiary care institutions with long experience in treating severe malaria. The study did not capture cases of severe malaria in smaller remote hospitals, where mortality might be higher. The increasing use of intravenous artesunate as main first-line treatment may also have contributed to reduce mortality, e.g., through rapid parasite clearance and shorter length of ICU and inpatient treatment [7–9]. Age as risk factor for adverse outcome of imported severe malaria has been shown by numerous studies [2]. In the present study, population patients ≥ 60 years were more likely to suffer from acute renal failure or from cerebral malaria, yet there was no increased case fatality among older patients.

Anti-malarial chemoprophylaxis

Only 10% of patients with severe malaria had taken anti-malarial chemoprophylaxis and very few of them had been fully compliant. These data suggest that correct anti-malarial prophylaxis can effectively prevent severe malaria in European travellers. Counselling of travellers on malaria prevention should be improved and coverage increased, particularly for travellers going to West Africa, where 60% of infections in this study were acquired. Little is known about the proportion of European travellers who take prophylaxis. In a recent study only 60% of travellers from the UK to endemic areas used anti-malarial

chemoprophylaxis [35]. VFR travellers are a large traveller population to Africa with different perceptions of malaria and its prevention [4, 5]. This may also influence the longer delay between onset of symptoms of malaria and presentation in hospital. The fact that 37% of patients in the present study had a history of migration clearly demonstrates the risk of these patients to suffer from severe malaria. Moreover, one of the patients who died was a 34 years old, otherwise healthy patient with history of migration. She presented with hyperparasitaemia, acute renal failure, jaundice, and respiratory failure. There was altogether no difference in symptoms and clinical presentation between patients with or without history of migration, suggesting a waning of semi-immunity in migrants who left endemic areas [36].

Supportive treatments

Supportive treatments such as exchange transfusions and erythrocyte apheresis are a matter of controversy and their use is guided by national or local practices. European single-centre studies recently failed to demonstrate improved parasite clearance through whole blood or erythrocyte exchange, compared to patients treated with quinine or artesunate alone [37, 38]. Only 4% of patients received exchange transfusions in this study. It was performed in only 7 out of 28 participating centres, mainly in patients treated with intravenous quinine. Likewise, only five patients in two centres received automated erythrocyte apheresis. With the increased use of intravenous artesunate and its potential to rapidly reduce high parasite loads it needs to be determined whether particular patient populations might still benefit from these adjunctive treatments [39].

Limitations

This observational study has inherent limitations. As patient information was collected retrospectively in TropNet centres and not all patients treated may have been reported equally, selective under-reporting, e.g., for patients who died, may have occurred. Bias in reporting data on PADH must be assumed as the condition was not known at the beginning of the study and no universally accepted clinical definition exists to date. All TropNet centres are referral centres for tropical medicine and patient composition as well as treatment data may not fully reflect treatment practices and outcomes in non-referral hospitals. Moreover, data reported by the participating treatment centres may not always fully reflect treatment practices in the respective countries. For patients with elevated creatinine levels at the end of follow-up, it cannot be ruled out that unknown or undocumented elevation of creatinine had existed before the episode of severe malaria.

Conclusion

The data show that the majority of patients with severe malaria in Europe are tourists or migrants acquiring infection in West Africa. Intravenous artesunate is increasingly used for treatment of severe malaria; it is the most effective drug and can be safely given to European patients with severe malaria. There is need for harmonization of guidelines for the treatment of severe malaria in Europe. Patients treated with intravenous artesunate should be followed up to detect late haemolytic events.

Authors' contributions

TZ designed the study; TZ and FK performed acquisition, entry, cleaning and analysis of data, wrote the manuscript; MD, MM, DM, JC, SA, IEG, JG, KM, EN, MR, AB, LV, TR, PZ, GC, JSC, HN, GJN, AN, AH, MLS, PA, TL, PK, AK, JSdC, PP, ASA, MS, NS, and CH treated patients, gathered data in study centres, contributed to and corrected the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ² Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ³ Section Tropical Medicine and Clinical International Health, Division of Infectious and Tropical Diseases, Department of Medicine, University Hospital Centre, Bordeaux, France. ⁴ Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium. ⁵ Department of Biomedical and Clinical Sciences L.Sacco, University of Milano, Milan, Italy. ⁶ Infectious Diseases Unit, Herlev University Hospital, Copenhagen, Denmark. ⁷ ISGlobal, Barcelona Center for International Health Research. (CRESIB), Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁸ Department of Medicine, National Centre for Tropical Infectious Diseases, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway. ⁹ Department of Clinical Science, University of Bergen, Bergen, Norway. ¹⁰ National Institute of Infectious Diseases Lazzaro Spallanzani, Rome, Italy. ¹¹ Department of Medicine I, Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. ¹² Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen, Tübingen, Germany. ¹³ SOD Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Florence, Italy. ¹⁴ Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ¹⁵ Section Tropical Medicine, Department of Internal Medicine I, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ¹⁶ Department of Clinical Research, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany. ¹⁷ Institute of Public Health, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. ¹⁸ Travel Medicine Unit, Department of Infectious Diseases, Amedeo di Savoia Hospital-ASLTO2, Turin, Italy. ¹⁹ Tropical Medicine Unit, Hospital de Poniente, El Ejido, Spain. ²⁰ Department of Infectious Diseases, Aalborg University Hospital, Aalborg, Denmark. ²¹ Department of Internal Medicine II, Section Infectious Diseases and Tropical Medicine, University Hospital Frankfurt/Main, Frankfurt/Main, Germany. ²² Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland. ²³ University of Basel, Basel, Switzerland. ²⁴ Department of Infectious Diseases, Bern University Hospital and University of Bern, Bern, Switzerland. ²⁵ Department of Infection & Tropical Medicine, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne, UK. ²⁶ Clinica Luganese, Lugano, Switzerland. ²⁷ Comprehensive Infectious Diseases Center, Department of Internal Medicine III, Ulm University Hospital, Ulm, Germany. ²⁸ Section Clinical Tropical Medicine, Department of Infectious Diseases, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany. ²⁹ Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal. ³⁰ Division of Tropical Medicine and Infectious Diseases, Center of Internal Medicine II, University of Rostock, Rostock, Germany. ³¹ Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain. ³² Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ³³ Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical Center of the University of Munich (LMU), Munich, Germany.

Acknowledgements

None.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data

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

Ethical approval

The study was approved by the Ethics Committee of Charité University Hospital, Berlin (AE1/334/14). Ethical clearance for transfer of retrospective, pseudonymized patient data was sought at participating Tropnet centres according to local regulations.

Funding

FK is supported by Charité clinical Scientist Programme, funded by Charité Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health.

Received: 3 October 2016 Accepted: 30 December 2016

Published online: 31 January 2017

References

- ECDC. Annual epidemiological report 2014—emerging and vector-borne diseases. Stockholm: ECDC; 2014.
- Muhlberger N, Jelinek T, Behrens RH, Gjørup I, Coulaud JP, Clerinx J, et al. Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of falciparum malaria in European patients: observations from TropNetEurop and SIMPID surveillance data. *Clin Infect Dis*. 2003;36:990–5.
- Checkley AM, Smith A, Smith V, Blaze M, Bradley D, Chiodini PL, et al. Risk factors for mortality from imported falciparum malaria in the United Kingdom over 20 years: an observational study. *BMJ*. 2012;344:e2116.
- van Genderen PJ, van Thiel PP, Mulder PG, Overbosch D, Dutch Schiphol Airport Study Group. Trends in the knowledge, attitudes and practices of travel risk groups towards prevention of malaria: results from the Dutch Schiphol Airport Survey. *Malar J*. 2012;11:179.
- Wieten RW, Harting J, Biemond PM, Grobusch MP, van Vugt M. Towards improved uptake of malaria chemoprophylaxis among West African travellers: identification of behavioural determinants. *Malar J*. 2013;12:360.
- WHO. Guidelines for the treatment of malaria—3rd edition. Geneva: World Health Organization; 2015.
- Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial Group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005;366:717–25.
- Kurth F, Develoux M, Mechain M, Clerinx J, Antinori S, Gjørup IE, et al. Intravenous artesunate reduces parasite clearance time, duration of intensive care, and hospital treatment in patients with severe malaria in Europe: the TropNet severe malaria study. *Clin Infect Dis*. 2015;61:1441–4.
- Sinclair D, Donegan S, Isba R, Laloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;6:CD005967.
- Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010;376:1647–57.
- Jaureguierry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, et al. Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood*. 2014;124:167–75.
- Zoller T, Junghans T, Kapaun A, Gjørup I, Richter J, Hugo-Persson M, et al. Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:771–7.
- European Network for Tropical Medicine and Travel health. <http://www.tropnet.eu>.
- WHO. Guidelines for the treatment of malaria—2nd edition. Geneva: World Health Organization; 2010.
- De Nardo P, Oliva A, Giancola ML, Ghirga P, Mencarini P, Bibas M, et al. Haemolytic anaemia after oral artemether-lumefantrine treatment in a patient affected by severe imported falciparum malaria. *Infection*. 2013;41:863–5.
- Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, Visser LG, Bierman WF, Clerinx J, van Veldhuizen CK, et al. Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium. *Malar J*. 2012;11:102.
- Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focusing on delayed haemolysis. *Malar J*. 2013;12:241.
- Marks ME, Armstrong M, Suvari MM, Batson S, Whitty CJ, Chiodini PL, Bellingham G, Doherty JF. Severe imported falciparum malaria among adults requiring intensive care: a retrospective study at the hospital for tropical diseases. London. *BMC Infect Dis*. 2013;13:118.
- Santos LC, Abreu CF, Xerinda SM, Tavares M, Lucas R, Sarmiento AC. Severe imported malaria in an intensive care unit: a review of 59 cases. *Malar J*. 2012;11:96.
- Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, Bedos JP, et al. The clinical spectrum of severe imported falciparum malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:684–9.
- Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira JP, Peytel E, et al. Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS ONE*. 2010;5:e13236.
- Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, Arnaud A, Cojean S, Le Bras J, et al. Risk factors for imported fatal *Plasmodium falciparum* malaria, France, 1996–2003. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:883–8.
- Bruneel F, Tubach F, Mira JP, Houze S, Gibot S, Huisse MG, et al. Imported falciparum malaria in adults: host- and parasite-related factors associated with severity. The French prospective multicenter PALUREA cohort study. *Intensive Care Med*. 2016;42:1588–96.
- Rapport annuel d'activité, Année d'exercice 2014. Centre de national de référence du Paludisme de France; 2015.
- Kreeftmeijer-Vegter AR, van Veldhuizen CK, de Vries PJ. Roll out of intravenous artesunate under named patient programmes in the Netherlands, Belgium and France. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:150.
- Twomey PS, Smith BL, McDermott C, Novitt-Moreno A, McCarthy W, Kachur SP, et al. Intravenous artesunate for the treatment of severe and complicated malaria in the United States: clinical use under an investigational new drug protocol. *Ann Intern Med*. 2015;163:498–506.
- Morch K, Myrvang B. Treatment of malaria in Norway. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2012;132:664–7.
- Bartoloni A, Tomasoni L, Bartalesi F, Galli L, Sani S, Veloci S, et al. Combined intravenous treatment with artesunate and quinine for severe malaria in Italy. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83:274–6.
- Newton PN, Chierakul W, Ruangveerayuth R, Silamut K, Teerapong P, Krudsood S, et al. A comparison of artesunate alone with combined artesunate and quinine in the parenteral treatment of acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:519–23.
- Itoda I, Yasunami T, Kikuchi K, Yamaura H, Totsuka K, Yoshinaga K, et al. Severe falciparum malaria with prolonged hemolytic anemia after successful treatment with intravenous artesunate (in Japanese). *Kansenshogaku Zasshi*. 2002;76:600–3.
- Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnika AA, Sylverken J, Spahlinger D, et al. Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria—a double-center prospective study. *J Infect Dis*. 2014;209:1921–8.
- Jaureguierry S, Thellier M, Ndour PA, Ader F, Roussel C, Sonnevillier R, et al. Delayed-onset hemolytic anemia in patients with travel-associated severe malaria treated with artesunate, France, 2011–2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:804–12.
- Nguyen TH, Day NP, Ly VC, Waller D, Mai NT, Bethell DB, Tran TH, White NJ. Post-malaria neurological syndrome. *Lancet*. 1996;348:917–21.
- Kurth F, Zoller T, et al. Reply to Jaureguierry et al. *Clin Infect Dis*. 2016;62:271.
- Behrens RH, Alexander N. Malaria knowledge and utilization of chemoprophylaxis in the UK population and in UK passengers departing to malaria-endemic areas. *Malar J*. 2013;12:461.
- Moncunill G, Mayor A, Bardaji A, Puyol L, Nhabomba A, Barrios D, et al. Cytokine profiling in immigrants with clinical malaria after extended periods of interrupted exposure to *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*. 2013;8:e73360.
- Kreeftmeijer-Vegter AR, Melo Mde M, de Vries PJ, Koelwijn R, van Helmond JJ, van Genderen PJ. Manual blood exchange transfusion does not significantly contribute to parasite clearance in artesunate-treated individuals with imported severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2013;12:115.

38. Calvo-Cano A, Gomez-Junyent J, Lozano M, Castro P, Cid J, Nicolas JM, et al. The role of red blood cell exchange for severe imported malaria in the artesunate era: a retrospective cohort study in a referral centre. *Malar J*. 2016;15:216.
39. Auer-Hackenberg L, Staudinger T, Bojic A, Locker G, Leitner GC, Graninger W, et al. Automated red blood cell exchange as an adjunctive treatment for severe *Plasmodium falciparum* malaria at the Vienna General Hospital in Austria: a retrospective cohort study. *Malar J*. 2012;11:158.

2.2.1.2 Artesunat versus Chinin bei europäischen Patienten mit schwerer Malaria

*Kurth F, Develoux M, Mechain M, Clerinx J, Antinori S, Gjørup IE, Gascon J, Mørch K, Nicastrì E, Ramharter M, Bartoloni A, Visser L, Rolling T, Zanger P, Calleri G, Salas-Coronas J, Nielsen H, Just-Nübling G, Neumayr A, Hachfeld A, Schmid ML, Antonini P, Pongratz P, Kern P, Saraiva da Cunha J, Soriano-Arandes A, Schunk M, Suttorp N, Hatz C, Zoller T; TropNet Severe Malaria Investigator Group. Intravenous Artesunate Reduces Parasite Clearance Time, Duration of Intensive Care, and Hospital Treatment in Patients With Severe Malaria in Europe: The TropNet Severe Malaria Study. *Clinical Infectious Diseases*, 11/2015, 1441-4, 61*

In mehreren prospektiven Studien bei Patienten mit schwerer Malaria in Asien und Afrika konnte eine klare Überlegenheit für die Therapie mit i.v. Artesunat gegenüber i.v. Chinin gezeigt werden. Für Patienten außerhalb von Malaria-Endemiegebieten existieren demgegenüber sehr wenige Daten zur Therapie mit i.v. Artesunat.

In dieser Analyse wurden die Daten von 151 europäischen Patienten mit schwerer Malaria und i.v. Artesunat- oder i.v. Chinin-Behandlung aus der TropNet-Beobachtungsstudie zur schweren Malaria verglichen. Patienten mit i.v. Artesunat-Behandlung zeigten eine schnellere Parasiten-Clearance als Patienten mit i.v. Chinin-Behandlung (median 72 versus 96 Stunden; $p=0,005$), benötigten eine um einen Tag kürzere Behandlung auf der Intensivstation (median 2 versus 3 Tage; $p<0,05$) und konnten einen Tag früher aus der Klinik entlassen werden (median 6 versus 7 Tage; $p<0,01$). In einer multifaktoriellen Varianzanalyse ($F=16$; $df=4$; $p<0,0001$) war die Behandlung mit i.v. Artesunat gegenüber i.v. Chinin ein unabhängiger Faktor für eine kürzere intensivmedizinische Behandlung ($F=6,1$; $p=0,01$).

Dies ist die erste multizentrische Studie, die eine Überlegenheit der Behandlung mit i.v. Artesunat gegenüber i.v. Chinin für Patienten außerhalb von Endemiegebieten belegt.

<https://doi.org/10.1093/cid/civ575>

2.2.2 Hämolyse nach oraler Artemisinin-basierter Kombinationstherapie bei unkomplizierter Malaria

Kurth F, Lingscheid T, Steiner F, Stegemann M, Bélard S, Menner N, Pongratz P, Kim J, Bernuth H, Mayer B, Damm G, Seehofer D, Salama A, Suttorp N, Zoller T. Hemolysis after Oral Artemisinin Combination Therapy for Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. Emerging Infectious Diseases, 08/2016, 1381-6, 22

Die Überlegenheit Artemisinin-basierter Therapieregime gegenüber Artemisinin-freien Behandlungen wurde in Endemiegebieten sowohl für die unkomplizierte als auch für die schwere Malaria belegt. Bei 20-30% der nicht-semiimmunen Patienten mit schwerer Malaria und i.v. Artesunat-Behandlung wurden hämolytische Spätreaktionen 2-6 Wochen nach Therapie beschrieben. Diese sind in der Regel selbstlimitierend, erfordern aber eine zusätzliche Nachverfolgung der Patienten und in einigen Fällen Bluttransfusionen und stationäre Überwachung.

In der Haemo-Art Studie wird die Hypothese untersucht, dass hämolytische Spätreaktionen auch nach unkomplizierter Malaria und oraler Artemisinin-basierter Therapie auftreten. Von 20 Patienten, die im Rahmen einer ersten Interim-Analyse ausgewertet wurden, erfüllten 8 Patienten die Kriterien einer verzögerten Hämolyse 2 Wochen nach Behandlung (erniedrigtes Haptoglobin, erhöhte LDH). Bei 5 Patienten bestanden die Hämolysezeichen noch 1 Monat nach Behandlung. Die Analyse der Hb-Werte im Beobachtungszeitraum 2 Wochen nach Therapie zeigte für Patienten mit Hämolyse einen medianen Hb-Abfall von 1,3 g/dl (IQR 0,3-2,0 g/dl), während Patienten ohne Hämolyse einen Hb-Anstieg von 0,3 g/dl (IQR -0,1-0,7 g/dl; p=0,002) aufwiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei nicht-semiimmunen Patienten auch nach unkomplizierter Malaria verzögerte hämolytischen Reaktionen und Hämoglobinverlust in den Wochen nach Therapie auftreten.

Hemolysis after Oral Artemisinin Combination Therapy for Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria

Florian Kurth, Tilman Lingscheid, Florian Steiner, Miriam S. Stegemann, Sabine Bélard, Nikolai Menner, Peter Pongratz, Johanna Kim, Horst von Bernuth, Beate Mayer, Georg Damm, Daniel Seehofer, Abdulgabar Salama, Norbert Suttorp, Thomas Zoller

Episodes of delayed hemolysis 2–6 weeks after treatment of severe malaria with intravenous artesunate have been described. We performed a prospective observational study of patients with uncomplicated malaria to investigate whether posttreatment hemolysis also occurs after oral artemisinin-based combination therapy. Eight of 20 patients with uncomplicated malaria who were given oral artemisinin-based combination therapy met the definition of posttreatment hemolysis (low haptoglobin level and increased lactate dehydrogenase level on day 14). Five patients had hemolysis persisting for 1 month. Patients with posttreatment hemolysis had a median decrease in hemoglobin level of 1.3 g/dL (interquartile range 0.3–2.0 g/dL) in the posttreatment period, and patients without posttreatment hemolysis had a median increase of 0.3 g/dL (IQR –0.1 to 0.7 g/dL; $p = 0.002$). These findings indicate a need for increased vigilance for hemolytic events in malaria patients, particularly those with predisposing factors for anemia.

Artemisinin-based drugs are the mainstay of current antimalarial treatment and play a key role in the World Health Organization (WHO) global strategy to reduce malaria illness and death caused by malaria. These drugs act rapidly against *Plasmodium* spp. and are usually well tolerated. Artemisinin-based combination therapies (ACTs) are the recommended first-line treatment for uncomplicated malaria in most countries (1).

Episodes of delayed hemolysis 2–6 weeks after treatment for severe malaria with intravenous artesunate have been observed in non-malaria-immune patients in Europe (2). This phenomenon, recently referred to as postartemisinin-delayed hemolysis (PADH) (3,4), has been confirmed

in other nonimmune patients (4,5) and in children in Africa (6). Approximately 20%–30% of nonimmune patients given intravenous artesunate show signs of PADH that vary in intensity and duration (5,7). Hemolysis is usually self-limiting, but patients need to be actively followed up because transfusion of erythrocytes and rehospitalization might be necessary (2,5).

The pathophysiology of hemolysis after artemisinin therapy is not fully understood. Once-infected erythrocytes that have been cleared of parasites in the spleen have a shorter life span and play a role. Patients with higher concentrations of once-infected erythrocytes after artemisinin treatment are at higher risk for PADH (4). However, other features of posttreatment hemolysis, such as prolonged hemolytic reactions over several weeks (2), are not explained by this mechanism. Several reports suggest involvement of a drug-dependent autoimmune hemolysis mechanism (8), but systematic investigations have not been performed in most published cases (2,9). Given the key role of artemisinins in malaria treatment, WHO calls for prospective clinical studies and further research to improve the understanding of delayed hemolysis after artemisinin therapy (10).

Only 2 single cases and 2 patients in a recent analysis of surveillance data in the United States have been reported with signs of delayed hemolysis after oral ACT treatment (11–13). We hypothesize that delayed hemolysis occurs not only after intravenous treatment for severe malaria but also in a substantial number of patients given oral ACTs for uncomplicated malaria. Because delayed hemolysis has not been captured by safety studies on ACTs, we assume that delayed hemolysis after oral ACTs is less pronounced and occurs to a subclinical degree.

We conducted a study of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria to investigate the clinical, laboratory, and immunohematologic features of hemolysis and anemia during and after antimalarial treatment. This article presents data for patients investigated during the first 12 months of this ongoing study.

Author affiliations: Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany (F. Kurth, T. Lingscheid, F. Steiner, M.S. Stegemann, S. Bélard, N. Menner, P. Pongratz, J. Kim, H. von Bernuth, B. Mayer, G. Damm, D. Seehofer, A. Salama, N. Suttorp, T. Zoller); Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland (T. Zoller)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2208.151905>

Methods

This prospective observational study was conducted at the University Hospital of Charité–Universitätsmedizin Berlin (Berlin, Germany). The study protocol was approved by the ethical committee of Charité–Universitätsmedizin Berlin and is registered at the WHO International Clinical Trials Registry Platform (DRKS00007104). All laboratory analyses and parasitologic examinations were performed in accredited laboratories at Charité–Universitätsmedizin, Berlin.

All patients who sought treatment at the hospital and were found to have microscopically confirmed uncomplicated *P. falciparum* malaria were included in the study after written informed consent was obtained. Patients were excluded if they had received antimalarial treatment (excluding prophylaxis) within 12 weeks before inclusion; had medical conditions that potentially cause hemolysis (e.g., glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, hemoglobinopathy, mechanical heart valve, lymphoproliferative disease); or were taking medication that potentially causes hemolysis.

Patients were seen for study visits at admission before treatment (day 0). After the first treatment, they were seen again after the last treatment dose on day 3, on day 7 (range day 6–day 10), and on day 14 (range day 14–day 20). If symptoms or signs of hemolysis were detected, patients were seen on day 30 (range day 27–day 31) and thereafter if clinically indicated.

Study visits included obtaining a medical history and conducting a physical examination. Laboratory investigations were parasitologic (thick and thin blood smears), hematologic (differential blood count), and biochemical (haptoglobin, lactate dehydrogenase [LDH], C-reactive protein, potassium, and sodium levels and renal and liver function tests) examinations; screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; and immunohematologic examinations (direct and indirect antiglobulin test, including testing with enzyme-treated erythrocytes).

This analysis evaluated data for all patients given oral ACTs during the first 12 months of the study. The primary objective was to assess the proportion of patients with posttreatment hemolysis, which was defined as a low haptoglobin level (<0.3 g/L) and an LDH level above the age-dependent upper normal level 14 days after treatment. Secondary objectives were to compare in patients with posttreatment hemolysis and those without it possible risk factors (age, ethnicity, sex, initial parasitemia) and the course of anemia (hemoglobin [Hb] level, reticulocyte production index) during treatment, after treatment, and overall. Hemolysis with a loss of Hb ≥ 1.5 g/dL during days 3–14 was classified as uncompensated hemolysis; hemolysis without a decrease in Hb level or a decrease <1.5 g/dL during days 3–14 was classified as compensated hemolysis.

Differences between patients with and without signs of posttreatment hemolysis and between patients with compensated and uncompensated hemolysis were analyzed by using the Mann-Whitney U test for continuous data and the Fisher exact test for binary data at a 2-sided significance level of $\alpha = 0.05$. Data are presented as median and interquartile range (IQR). Statistical analysis was performed by using JMP version 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

The sample size of the ongoing study was calculated to detect an incidence of posttreatment hemolysis of 20% with a 95% CI, $\pm 7.5\%$ precision, and 15% lost to follow-up. This calculation resulted in a sample size of 130 patients. This study evaluated 27 patients, which represented 21% of the intended total sample size. Because we could find no published prospective data for hemolysis after oral ACT treatment, we decided to communicate the findings of this interim analysis before completion of the study.

Results

During May 2014–April 2015, a total of 27 patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria and a standard 3-day treatment course of oral ACT were included in the study. All malaria infections had been acquired in Africa, and none of the patients had taken antimalarial prophylaxis. Six patients did not complete all necessary follow-up visits, and 1 patient was excluded because of sickle cell disease. Twenty patients with ≥ 4 study visits until day 20 were available for this interim analysis; of these patients, 3 were children (Table). All patients showed rapid clinical improvement with clearance of peripheral asexual parasitemia no later than 72 hours after initiation of treatment. There were no treatment failures.

The criteria for posttreatment hemolysis (haptoglobin and LDH levels) on day 14 were met by 8 (40%) of 20 patients. An additional 2 patients showed signs of in vitro hemolysis on day 14 (increased LDH and potassium levels but haptoglobins level within reference ranges). The LDH values of these patients were excluded from further analysis and these patients were classified as patients without hemolysis. Patient characteristics showed no differences between those with and without hemolysis, with the exception of slightly higher Hb levels on day 0 and day 3 in patients with posttreatment hemolysis (Table).

After treatment (during days 3–14), patients with posttreatment hemolysis showed a decrease in Hb level (median change -1.3 g/dL, IQR -2.0 to -0.3), and patients without posttreatment hemolysis showed an increase in Hb level (median change 0.3 g/dL, IQR -0.1 to 0.7; $p = 0.002$) (Figure 1, panel C). During treatment (during days 0–3), patients with posttreatment hemolysis showed a tendency toward a smaller decrease in Hb level (median change -0.15 g/dL, IQR -0.6 to 0.6) than did patients without

Table. Baseline characteristics and follow-up laboratory data for patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria who were given ACT*

Characteristic	All, n = 20	Without posttreatment hemolysis, n = 12	With posttreatment hemolysis, n = 8	p value	With compensated posttreatment hemolysis, n = 4	With uncompensated posttreatment hemolysis, n = 4	p value
Baseline							
Age, y	35 (26–40)	31 (17–40)	38 (30–43)	0.18	32 (22–42)	40 (27–46)	0.15
Children	3/20 (15.0)	3/12 (25.0)	0/8 (0)	0.24	0/4 (0)	0 (0)	
African ethnicity	13/20 (65.0)	9/12 (75.0)	4/8 (50.0)	0.35	4/4 (100.0)	0/4 (0)	0.001
Female sex	9/20 (45.0)	7/12 (58.3)	2/8 (25.0)	0.19	2/4 (50.0)	0/4 (0)	0.42
Treatment with ARM/LUM	5/20 (25.0)	4/12 (33.3)	1/8 (12.5)	0.60	0/4 (0)	1/4 (25.0)	1.0
Treatment with DHA/PPQ	15/20 (75.0)	8/12 (75.0)	7/8 (87.5)	0.60	4/4 (100.0)	3/4 (75.0)	1.0
Parasitemia†	0.4 (0.2–1.1)	0.3 (0.1–0.9)	0.9 (0.4–1.4)	0.12	1.15 (0.4–1.9)	0.8 (0.2–1.1)	0.40
Hb d0	12.5 (11.1–14.0)	11.3 (10.5–13.5)	13.1 (12.5–14.1)	0.11	12.7 (12.4–13.8)	13.7 (12.6–14.6)	0.30
Laboratory follow-up‡							
Hb d3	12.2 (10.6–13.6)	11.1 (9.7–12.7)	13.2 (12.2–14.3)	0.02	12.8 (11.9–13.4)	14.2 (12.5–14.6)	0.15
Hb d7	12.1 (11.1–13.0)	11.7 (10.5–12.5)	12.5 (11.9–12.6)	0.33	12.6 (11.8–13.1)	12.7 (11.5–12.9)	0.66
Hb d14	12.0 (10.9–12.6)	11.7 (10.5–12.6)	12.2 (11.9–12.6)	0.33	12.5 (12.2–12.8)	11.9 (10.5–12.5)	0.11
ΔHb d0–d3	-0.4 (-0.8 to 0.0)	-0.5 (-1.0 to -0.3)	-0.1 (-0.6 to 0.6)	0.07	-0.4 (-1.1 to 0.7)	0.1 (-0.2 to 0.6)	0.40
ΔHb d3–d7	0.0 (-0.8 to 0.5)	0.3 (0.3–0.8)	-0.8 (-1.5 to -0.1)	0.007	-0.3 (-0.6 to 0.2)	-1.5 (-1.7 to -1.0)	NA
ΔHb d7–d14	0.1 (-0.5 to 0.5)	0.3 (0.1–0.5)	-0.4 (-0.9 to 0.1)	0.04	0.0 (-0.4 to +0.4)	-0.8 (-1.2 to -0.3)	NA
ΔHb d3–d14	0.0 (-0.7 to 0.5)	0.3 (-0.1 to 0.7)	-1.3 (-2.0 to -0.3)	0.002	-0.3 (-0.6 to 0.3)	-1.9 (-2.6 to -1.9)	NA
ΔHb d0–d14	-0.7 (-1.1 to 0.1)	-0.4 (-0.8 to 0.4)	-1.3 (-2.1 to -0.3)	0.03	-0.4 (-1.3 to 0.2)	-1.9 (-2.8 to -1.3)	NA
LDH d7, U/L	250 (225–331)	244 (222–274)	327 (229–407)	0.16	329 (211–495)	327 (248–381)	0.77
LDH d14, U/L	256 (210–283)	210 (197–247)	280 (256–365)	0.006	273 (255–394)	298 (234–365)	1.0
RPI d3	0.5 (0.3–0.7)	0.4 (0.2–0.7)	0.7 (0.4–0.7)	0.22	0.7 (0.4–0.7)	0.6 (0.5–0.7)	1.0
RPI d7	1.4 (0.9–1.6)	1.4 (0.9–1.5)	1.3 (0.8–2.0)	0.66	1.7 (1.2–2.7)	1.0 (0.4–1.8)	0.24
RPI d14	1.4 (1.0–1.8)	1.1 (1.0–1.6)	1.9 (1.4–2.6)	0.015	2.5 (1.9–2.9)	1.5 (1.1–1.9)	0.04

*Values are median (interquartile range) or n/N (%). ACT, artemisinin-based combination therapy; ARM, artemether; d, day; Δ, period between indicated days; DHA, dihydroartemisinin; Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; LUM, lumefantrine; NA, not applicable; PPQ, piperaquine; RPI, reticulocyte production index.

†Percentage of erythrocytes infected.

‡Hb levels are in grams/deciliter.

posttreatment hemolysis (median change -0.5 g/dL, IQR -1.0 to -0.3; p = 0.07) (Figure 1, panel B). Overall (during days 0–14), patients with posttreatment hemolysis showed a larger decrease in Hb level (median change -1.35 g/dL, IQR -2.1 to -0.3) than did patients without posttreatment hemolysis (median change -0.45 g/dL, IQR -0.8 to 0.4; p = 0.03) (Figure 1, panel A).

Analysis of the course of anemia in the 8 patients with posttreatment hemolysis showed that a decrease in Hb level during days 3–14 occurred in only 4 patients (uncompensated hemolysis). The other 4 patients with hemolysis maintained stable Hb levels during days 3–14 (compensated hemolysis) (Figure 2, Panel C). Consistent with this observation, we found that patients with compensated posttreatment hemolysis showed a higher reticulocyte production index on day 14 than did patients with uncompensated posttreatment hemolysis or without hemolysis on day 14.

No differences were observed in median LDH levels and initial parasitemia between patients with compensated or uncompensated posttreatment hemolysis (Table). All patients with compensated posttreatment hemolysis were of African ethnicity, and all patients with uncompensated posttreatment hemolysis were Caucasian.

Five patients with posttreatment hemolysis (4 patients with uncompensated hemolysis and 1 patient with compensated hemolysis) were followed-up until day 30. All of these patients had persistent low haptoglobin levels (<0.3 g/L) on day 30, and 2 patients still had LDH levels above the age-dependent upper reference level on day 30. Exemplary cases of a patient without hemolysis (Figure 3, panel A), a patient with compensated hemolysis (Figure 3, panel B), and a patient with uncompensated hemolysis (Figure 3, panel C) show the course of laboratory values over time. The patient with compensated hemolysis had a low haptoglobin level

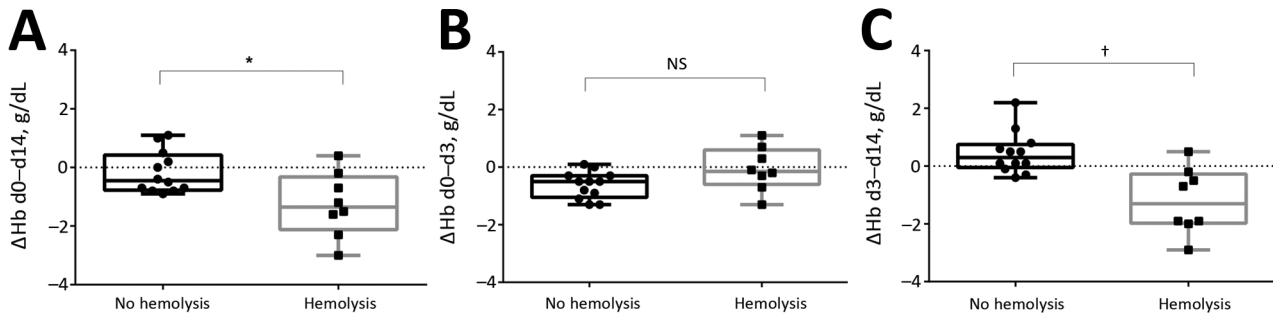


Figure 1. Changes in hemoglobin levels (DHb) for patients with and without posttreatment hemolysis after treatment with oral artemisinin-based combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. A) Day (d) 0 to d 14 (overall); B) d 0 to d 3 (treatment period); C) d 3 to d 14 (posttreatment period). Horizontal lines indicate median values, boxes indicate interquartile ranges, whiskers indicate ranges, and solid squares and circles indicate individual patient data points. The Mann-Whitney U test was used for comparative analysis. * $p < 0.05$; † $p < 0.01$; NS, not significant.

(<0.3 g/L) and an increased reticulocyte count 8 weeks after treatment on day 56 (Figure 2, panel B).

Immunohematologic testing showed that serum samples from 5 (25%) of 20 patients were reactive only with enzyme-treated erythrocytes after therapy (3 patients with and 2 patients without posttreatment hemolysis). The direct antiglobulin test result was weakly positive for 3 patients; none of them had posttreatment hemolysis. None of the patients with hemolysis showed coating of erythrocytes with IgG, IgM, or C3d.

Discussion

Hemolytic anemia after treatment of severe malaria with intravenous artesunate has been described in malaria-endemic and non-malaria-endemic countries. However, evidence of hemolytic anemia after treatment of malaria with oral ACTs is limited to 2 case reports. Data from the current prospective study confirm our hypothesis that delayed posttreatment hemolysis also occurs after oral artemisinin treatment and provide insight into its frequency and clinical course. In 40% of the patients in our study with uncomplicated malaria and oral ACT treatment, laboratory

signs of hemolysis were detected 2 weeks after therapy. In 5 patients, hemolysis persisted 1 month after treatment. Patients with posttreatment hemolysis showed a larger decrease in Hb levels after treatment than did patients without hemolysis. The intensity of hemolysis was mild compared with that after intravenous artesunate. In many reported cases of PADH after intravenous artesunate, patients received blood transfusions (2,9). In other studies, patients with hemolysis after oral ACT treatment had decreases in Hb levels of 2.1 g/dL–3.6 g/dL in the posttreatment period (11–13).

The decrease in Hb levels during treatment in the current study was smaller in patients with posttreatment hemolysis than in patients without posttreatment hemolysis. Consistent with this finding, we found that the patient group with the largest decrease in Hb levels after treatment (i.e., patients with uncompensated hemolysis) showed a small increase in Hb levels during treatment (Figure 2). This observation could be explained by involvement of once-infected erythrocytes: during treatment, erythrocytes are spared by removal of parasites without destruction of the cell. The Hb level therefore remains stable. After treatment,

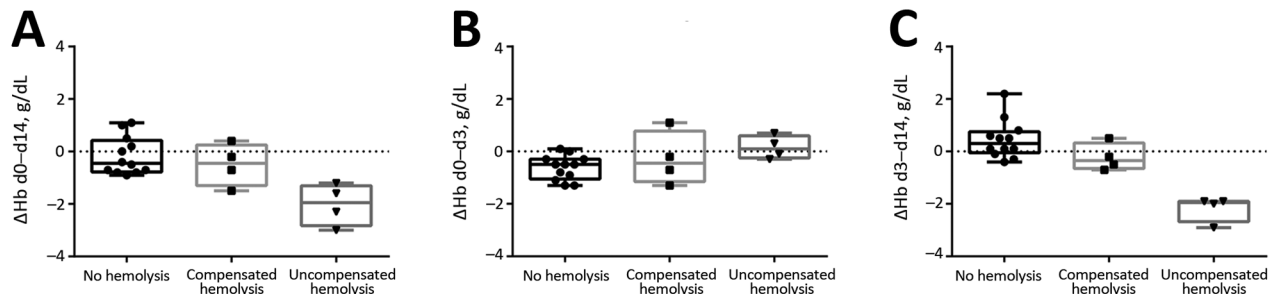


Figure 2. Changes in hemoglobin levels (DHb) for patients without posttreatment hemolysis, with compensated posttreatment hemolysis, and with uncompensated posttreatment hemolysis after treatment with oral artemisinin-based combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. A) day (d) 0 to d 14 (overall); B) d 0 to d 3 (treatment period); C) d 3 to d 14 (posttreatment period). Horizontal lines indicate median values, boxes indicate interquartile ranges, whiskers indicate ranges, and solid squares, circles, and triangles indicate individual patient data points.

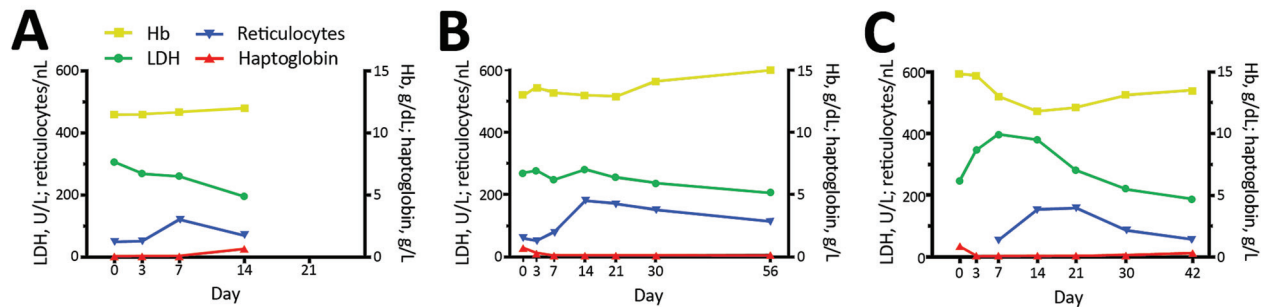


Figure 3. Laboratory values over time for exemplary patients with and without posttreatment hemolysis after treatment with oral artemisinin-based combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. A) Patient without posttreatment hemolysis, B) patient with compensated posttreatment hemolysis, and C) patient with uncompensated posttreatment hemolysis. Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase.

the once-infected, pitted erythrocytes hemolyze because of their shorter life spans, which results in a postponed loss of Hb during the posttreatment period (4). Our data therefore give additional support to the relevance of this mechanism as a cause of late hemolysis.

Half of the patients with posttreatment hemolysis showed erythropoietic activity at day 14 that was sufficient for compensating the postponed loss of Hb. These patients were all of African origin, unlike those with uncompensated hemolysis, who were all Caucasian. The reason for this observation is unknown. Malaria-related dyserythropoiesis (14) might be less pronounced in African patients than in European patients. Impairment of erythropoiesis by artemisinins has been described *in vitro* (15), but no differences regarding ethnicity have been reported.

Different reported clinical courses of delayed hemolysis after artemisinin therapy suggest involvement of mechanisms other than pitting (4,16). In some patients, the decrease in Hb level far exceeds the loss of erythrocytes expected from destruction of once-infected erythrocytes (16). In a recent case report, drug-dependent autoimmune hemolysis was reported as a probable cause of PADH (8). Several other reports failed to demonstrate immune-mediated hemolysis or drug-induced antibodies in patients with severe malaria (2,9,17). In our patients, results from immunohematologic testing were inconclusive. No antibody or complement coating of erythrocytes was found that could trigger bystander hemolysis of uninfected erythrocytes.

Baseline Hb levels were comparatively high in our patients. The mild loss of Hb therefore did not result in clinical symptoms. However, in settings in which chronic anemia is common because of concomitant infections and nutritional deficiencies, posttreatment hemolysis after antimalarial treatment might be a clinically relevant factor. Recently, a large study in Nigeria reported a >5% decrease in hematocrit levels in 23% of African children with uncomplicated malaria 14–28 days after ACT treatment (18). Although no further assessments were performed in this study, the authors assumed an association with postartemisinin

hemolysis. Further prospective investigations of this phenomenon in malaria-endemic areas are needed and should include markers for detection of hemolysis.

The dataset used for this analysis has several limitations. The most relevant limitation is that this study has, so far, not included patients who are receiving oral antimalarial drugs other than ACTs. At this time, we cannot rule out that similar hemolytic reactions occur after non-ACT antimalarial treatment because no prospective studies are available with a comparable method to detect hemolysis. More data on posttreatment anemia, hemolysis, and erythropoiesis after non-ACT treatment are therefore needed for comparison. However, this analysis also included patients with no evidence of posttreatment hemolysis after malaria and ACT therapy; it is therefore unlikely that hemolysis generally occurs after antimalarial therapy. The main objective of this study was to prospectively collect evidence for posttreatment hemolysis after oral ACT treatment. Some uncertainty might arise from the limited number of patients regarding other conclusions, such as different reticulocyte responses in patients from Africa and Europe. These conclusions have to be confirmed with larger sample sizes.

In conclusion, our study provides evidence that a mild form of posttreatment hemolysis commonly occurs after oral ACT treatment for uncomplicated malaria. The role of this observation for clinical practice in malaria-endemic and non-malaria-endemic settings remains to be defined but should prompt increased vigilance for hemolytic events, particularly for patients with preexisting anemia or those for whom mild anemia constitutes a clinical problem. Larger studies are needed to investigate observations and hypotheses concerning underlying pathophysiology and to eventually identify potential risk factors.

F.K. and S.B. are supported by the Charité Clinical Scientist Program, which is funded by Charité Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health. S.B. has been supported by the Marie Curie People Grant European Union FP7 Program.

Dr. Kurth is a physician and scientist in the Department of Infectious Diseases and Respiratory Medicine at Charité Medical University, Berlin, Germany, and in the Infectious Disease Control Group at the Centre de Recherches Medicales de Lambaréné, Lambaréné, Gabon. His primary research interests are pathophysiology of malaria and artemisinin treatment.

References

- World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. [cited 2016 Apr 15]. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
- Zoller T, Junghans T, Kapaun A, Gjorup I, Richter J, Hugo-Persson M, et al. Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:771–7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101229>
- Arguin PM. Case definition: postartemisinin delayed hemolysis. *Blood*. 2014;124:157–8. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-06-578922>
- Jauréguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, et al. Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood*. 2014;124:167–75. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-02-555953>
- Jauréguiberry S, Thellier M, Ndour PA, Ader F, Roussel C, Sonnevill R, et al. Delayed-onset hemolytic anemia in patients with travel-associated severe malaria treated with artesunate, France, 2011–2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:804–12. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2105.141171>
- Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnik AA, Sylverken J, Spahlinger D, et al. Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria: a double-center prospective study. *J Infect Dis*. 2014;209:1921–8. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit841>
- Rehman K, Lotsch F, Kremsner PG, Ramharter M. Haemolysis associated with the treatment of malaria with artemisinin derivatives: a systematic review of current evidence. *International journal of infectious diseases*. *Int J Infect Dis*. 2014;29:268–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.09.007>
- Raffray L, Receveur MC, Beguet M, Lauroua P, Pistone T, Malvy D. Severe delayed autoimmune haemolytic anaemia following artesunate administration in severe malaria: a case report. *Malar J*. 2014;13:398. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-398>
- Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, Visser LG, Bierman WF, Clerinx J, van Veldhuizen CK, et al. Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium. *Malar J*. 2012;11:102. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-102>
- World Health Organization. WHO/GMP information note on delayed haemolytic anaemia following treatment with artesunate, 2013 [cited 2016 Mar 9]. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_note_delayed_haemolytic_anaemia_oct13.pdf
- Corpolongo A, De Nardo P, Ghirga P, Gentilotti E, Bellagamba R, Tommasi C, et al. Haemolytic anaemia in an HIV-infected patient with severe falciparum malaria after treatment with oral artemether-lumefantrine. *Malar J*. 2012;11:91. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-91>
- De Nardo P, Oliva A, Giancola ML, Ghirga P, Mencarini P, Bibas M, et al. Haemolytic anaemia after oral artemether-lumefantrine treatment in a patient affected by severe imported falciparum malaria. *Infection*. 2013;41:863–5. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-013-0451-x>
- Gray AM, Arguin PM, Hamed K. Surveillance for the safety and effectiveness of artemether-lumefantrine in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the USA: a descriptive analysis. *Malar J*. 2015;14:349.
- Haldar K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:87–93. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.87>
- Finaurini S, Basilico N, Corbett Y, D'Alessandro S, Parapini S, Olliaro P, et al. Dihydroartemisinin inhibits the human erythroid cell differentiation by altering the cell cycle. *Toxicology*. 2012;300:57–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.024>
- Plewes K, Haider MS, Kingston HW, Yeo TW, Ghose A, Hossain MA, et al. Severe falciparum malaria treated with artesunate complicated by delayed onset haemolysis and acute kidney injury. *Malar J*. 2015;14:246. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-0760-x>
- Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malar J*. 2013;12:241. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-241>
- Sowunmi A, Akano K, Ayede AI, Ntadom G, Fatunmbi B, Aderoyeje T, et al. Temporal changes in haematocrit following artemisinin-based combination treatments of uncomplicated falciparum malaria in children. *BMC Infect Dis*. 2015;15:454. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1219-y>

Address for correspondence: Florian Kurth, Department of Infectious Diseases and Respiratory Medicine, Charité Campus, Virchow Klinikum, Südring 2, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany; email: florian.kurth@charite.de

PubMed Central

PubMed



Find *Emerging Infectious Diseases* content in the digital archives of the National Library of Medicine

www.pubmedcentral.nih.gov

3 Diskussion

Als Antwort auf die weltweite Zunahme von *P. falciparum*-Stämmen mit Resistenzen gegen die damals verfügbaren Malaria-Monotherapeutika Chloroquin, Sulfadoxin-Pyrimethamin und Amodiaquin vollzog die WHO im Jahr 2003 einen Wechsel in ihrer Malaria-Behandlungsstrategie und empfahl in einem Policy-Statement erstmals die Verwendung von ACTs zur Behandlung der Falciparum-Malaria (60). Seitdem haben ACTs kontinuierlich an Bedeutung gewonnen und stellen derzeit das „Rückgrat“ der Malaria-Behandlungsstrategie weltweit dar. Aktuellen WHO-Daten zufolge stieg der Anteil der ACTs bei der Behandlung afrikanischer Kinder mit Malaria zuletzt auf 80 %. Den höchsten Stellenwert in Afrika haben derzeit die Kombinationen aus Artemether + Lumefantrin und Artesunat + Amodiaquin (1).

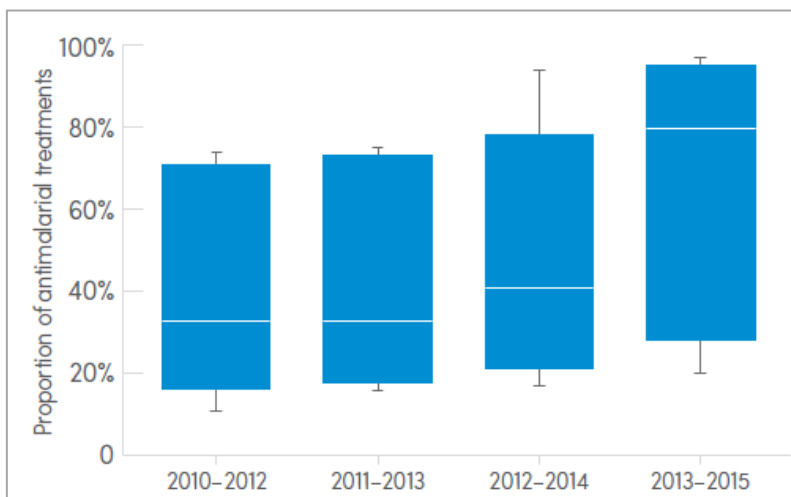


Abbildung 3: Anteil der ACTs an der Gesamtzahl der Malaria-Medikamente bei der Behandlung von febrilen Kindern mit positivem Malaria-Schnelltest in Afrika, 2005-2015 (1)
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO licence (CC BY-NC-SA 3.0 IGO)

3.1 Artemisinin-basierte Malariatherapie in Afrika

Im Jahr 2002 schlossen sich die Non-Profit-Organisation Medicines for Malaria Venture (MMV) und das koreanische Unternehmen Shin Poong Pharmaceuticals zu einer Public-private-Partnership zusammen mit dem Ziel, die Kombination aus Pyronaridin

und Artesunat (P+A) als neue fixed-dose ACT zur Behandlung der Falciparum- und Vivax-Malaria zu testen und zur Zulassung zu bringen (61).

In der 2006 in Lambaréné an 60 Kindern durchgeführten Phase II Studie zeigten alle verwendeten Dosierungen von P+A (6:2, 9:3, und 12:4 mg/kg) eine gute Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit. Insbesondere ergab sich kein Anhalt für eine dosisabhängige Zunahme von unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Die pharmakokinetische Analyse zeigte eine lineare Dosis-Plasmaspiegel-Beziehung für die unterschiedlichen Dosierungen (62).

Auf der Basis dieser Ergebnisse und den Daten aus einer weiteren bislang unveröffentlichten Phase II Studie bei Erwachsenen konnte die 3 Tages P+A-Kombinationstherapie anschließend in mehreren Phase III Studien doppelblind randomisiert gegen A+L (63, 64) und A+MQ (65) an insgesamt 1.953 Patienten mit Falciparum-Malaria weiter getestet werden. In allen Studien zeigte sich eine Wirksamkeit deutlich oberhalb der von der WHO geforderten PCR-korrigierten Mindest-Heilungsrate von 95% an Tag 28 (66). Nach einer zusätzlichen Phase IIIb/IV Studie in West-Afrika, in der Sicherheitsbedenken bezüglich der Hepatotoxizität von P+A bei wiederholter Anwendung ausgeräumt werden konnten, wurde P+A 2015 von der European Medicines Agency (EMA) in Kollaboration mit der WHO für die Verwendung außerhalb der EU zugelassen (sog. Artikel 58 Regulation) (67, 68).

Angesichts der Verfügbarkeit von 5 bereits entwickelten und zugelassenen ACTs - im Jahr 2006 waren es noch 4 – stellt sich die Frage nach der Sinnhaftigkeit der Entwicklung einer weiteren ACT. Im Falle der P+A-Kombinationstherapie waren die vorrangigen Gründe hierfür das einfache Dosierungs-Schema (3 Dosen bei P+A gegenüber 6 Dosen bei A+L), die Unabhängigkeit der Pyronaridin-Bioverfügbarkeit von gleichzeitiger Nahrungsaufnahme (im Gegensatz zu den lipophilen Wirkstoffen Lumefantrin oder Piperaquin), die lange Lagerbarkeit von 2 Jahren und der günstige angestrebte Preis (unter 1\$ für ein Erwachsenen-Dreitagesregimen, erzielt durch niedrige Produktionskosten für Pyronaridin und durch die Entwicklung im Rahmen des

Public-private-Partnerships) (61). Aus heutiger Sicht kommt ein weiterer wesentlicher Punkt hinzu: Durch die Abnahme der Sensitivität von *P. falciparum* gegenüber den Artemisinin-derivaten in der Mekong-Subregion steigt in diesen Gebieten der Selektionsdruck für Resistenzen gegen die Partner-Medikamente (69). Gleichzeitig ist bei Artemisinin-resistenten Plasmodien eine effektive medikamentöse Elimination durch die Partner-Medikamente im Hinblick auf die individuelle Heilung und die Unterbindung einer Transmission dieser Plasmodien-Stämme besonders wichtig (13, 14). Auch in Afrika hat die Wirksamkeit einiger ACT Partner-Medikamente mit zunehmender Verwendung in den letzten Jahren kontinuierlich abgenommen. Für A+L wurden in mehreren Studien bei Kindern aus Nord-Angola PCR-korrigierte Heilungsraten an Tag 28 von unter 90% berichtet. In den Plasmodien-Isolaten der Patienten mit Rekrudeszenzen nach A+L Therapie fanden sich gehäuft molekulare Marker, die mit einer Resistenz gegenüber Lumefantrin in Verbindung stehen (70, 71). In dieser Situation kann die Verfügbarkeit von unterschiedlichen ACT-Partner-Medikamenten von entscheidendem Vorteil sein, besonders wenn diese einen gegenläufigen Selektions-Druck auf *P. falciparum* ausüben. Untersuchungen der Polymorphismen im *P. falciparum* multidrug resistance gen 1 (*pfmdr1*) zeigen, dass durch die Behandlung mit A+L die Polymorphismen N86 und D1246 selektioniert werden, die mit einer verminderten Lumefantrin-Sensitivität assoziiert sind. Eine Behandlung mit DHA+P scheint hingegen die entgegengesetzten Polymorphismen 86Y und 1246Y zu selektionieren (72-74). Diese Daten legen nahe, dass eine Behandlungspolitik mit alternierendem oder parallelem Einsatz verschiedener ACTs der Entstehung von Resistenzen vorbeugen könnte (75). Für derartige Rotationsprinzipien ist die Verfügbarkeit von P+A als einer weiteren ACT mit unterschiedlichem Kombinationspartner von Vorteil.

Parallel zur klinischen Entwicklung von P+A in Phase II und Phase III wurde in Lambaréné 2006 eine *in vitro* Sensitivitäts-Testung von *P. falciparum*-Feldisolaten gegenüber Pyronaridin durchgeführt (76). *In vitro* Testungen von Malariamedikamenten erfüllen im Allgemeinen zwei Ziele: 1. die Wirksamkeit neuer

Wirkstoffe an bekannten Plasmodium-Laborstämmen oder -Feldisolaten zu prüfen (in Ergänzung zur Testung in klinischen Studien), 2. durch regelmäßige Testungen von Feldisolaten die Resistenz-Entwicklung in Endemiegebieten zu überwachen. Im Fall von Pyronaridin erschien eine konsequente Sensitivitätstestung vor allem wichtig, weil sich unter der Verwendung von Pyronaridin als Monotherapie in China in den 1980er Jahren rasch Resistenzen entwickelt hatten (77). Zudem gab es Anhalt für Kreuzresistenzen mit Amodiaquin und Chloroquin (78, 79).

Die in der Studie ermittelten EC-50 Werte für Pyronaridin von 1,9 nmol/l (95 % KI 1,4-2,5) im WHO Test und 2.0 nmol/l (95 % KI 1,6-2,6) im HRP-2 Assay waren vergleichbar zu den vorbeschriebenen Daten von Laborstämmen (80) und anderen afrikanischen *P. falciparum*-Feldisolaten (78, 79). Alle getesteten Feldisolate wiesen eine schlechte Sensitivität gegenüber Chloroquin auf. Hinweise für eine Kreuz-Sensitivität zwischen Pyronaridin und Chloroquin ergaben sich im Gegensatz zu früheren Berichten nicht (78, 79).

Der logistische und finanzielle Aufwand für *ex-vivo* Sensitivitätsuntersuchungen von *P. falciparum* ist gegenüber der Testung in klinischen Studien deutlich geringer. In kurzer Zeit kann eine große Anzahl von Feldisolaten getestet werden, auch können Wirkstoffe unabhängig von variablen patientenbezogenen Faktoren wie Compliance bei der Medikamenteneinnahme, Semi-Immunität oder Pharmakokinetik beurteilt werden. Andererseits sind die *in vitro* ermittelten Werte aufgrund eben dieser Faktoren in der Regel nur sehr eingeschränkt auf die Situation *in vivo* übertragbar (81). In der aktuellen Arbeit lag die Cut-off-Konzentration im geometrischen Mittel für Pyronaridin im WHO-Test bei 9,3 nmol/l (95 % KI 5,2-13,9), die korrespondierende 99 %-effektive Konzentration im HRP-2 Assay war 9,0 nmol/l (95 % KI 6,4-12,7). Im Vergleich dazu lagen die bei den Patienten in der klinischen Phase II Studie bestimmten mittlere maximale Plasmakonzentrationen von Pyronaridin bei 115 nmol/l, also mehr als 10-fach über der ermittelten *in vitro* Cut-off-Konzentration (62). Die frühesten Rekrudeszenzen in der klinischen Studie traten an Tag 21 und Tag 28 auf, wobei der erste Patient mit Rekrudeszenz an Tag 21 an diesem Tag eine Pyronaridin Plasmakonzentration von 9,9 nmol/l aufwies. In einer Regressionsanalyse der

gepoolten Pyronaridin Plasmakonzentrationen aller Patienten aus der klinischen Studie fielen diese im Mittel an Tag 22 unter die Schwelle von 9 nmol/l. Die *in vitro* ermittelten Pyronaridin Cut-off-Werte korrespondierten also in diesem Fall ausnehmend gut mit den Pyronaridin Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt der Rekrudeszenzen in der klinischen Studie (62, 76).

Im Rahmen der klinischen Testung von P+A wurde - erstmalig für eine ACT - von Beginn des Entwicklungsprogrammes an eine spezielle pädiatrische Darreichungsform in Form von Geschmacks-maskierten Granulen mitentwickelt. Ziel dieser „non-tablet“ Darreichungsformen ist es, die Medikamentenverabreichung, Dosierbarkeit und Verträglichkeit bei kleinen Kindern, der Haupt-Patientengruppe in Endemiegebieten, zu verbessern (62, 82).

Für kleine Kinder ist es oft schwierig, Tabletten im Ganzen zu schlucken. Probleme bei der Medikamenten-Verabreichung und arzneimittelinduziertes Erbrechen sind bei afrikanischen Kindern mit Malaria die häufigsten Gründe für eine Hospitalisierung, auch ohne dass eine schwere Malaria besteht (83, 84). Die weit verbreitete Praxis, Tabletten zu mörsern oder in kleine Stücke zu zermahlen, kann zu Wirkstoffverlust und Dosierungsfehlern führen, auch kann der bittere Geschmack vieler Malaria-Medikamente dadurch noch verstärkt werden (85, 86). Gerade bei der Therapie der unkomplizierten Malaria mit ACTs, bei denen Fieber und Krankheitsgefühl oft schon nach der ersten oder zweiten Medikamenten-Einnahme rasch verschwinden, können die Probleme bei der Medikamentengabe zu einer schlechteren Compliance führen, sodass beispielsweise die Medikamente am dritten Behandlungstag nicht mehr eingenommen werden. Dies wiederum gefährdet die Wirksamkeit der Medikamente und fördert die Entstehung von Resistenzen (85).

Im Rahmen von klinischen Studien, in denen die Medikamente meist unter Aufsicht verabreicht und bei Erbrechen konsequent erneut gegeben werden, sind diese Probleme oft nicht sichtbar. Erst in Wirksamkeitsstudien unter realen Feldbedingungen (engl. effectiveness-trials) ohne Überwachung der Medikamenten-Verabreichung zeigen sich oft deutlich schlechtere Heilungsraten. So lag die PCR-korrigierte

Heilungsrate für A+AQ an Tag 28 bei nicht-überwachter Medikamentengabe bei Kindern mit unkomplizierter Malaria in Gabun bei nur 63% (95 % KI 45-77%) und somit 23 % unter der Heilungsrate in der Vergleichsgruppe mit überwachter Medikamentengabe (86 %, 95 % KI 69-95 %) (87). Bei Kindern unter 5 Jahren sind die Heilungsraten bei nicht-überwachter ACT nochmals geringer als bei älteren Patienten (88), was auf die besonderen Probleme bei der Therapie in dieser Patientengruppe hindeutet.

Die P+A-Granulen zeigten in der Phase II Studie bezüglich Sicherheit, Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit vergleichbare Ergebnisse wie bei entsprechender Tabletten-Dosierung (62). Auch die neu-entwickelte pädiatrische Darreichungsform von A+L, in Form von Kirschgeschmacks-maskierten dispergierbaren Tabletten, zeigte in einer Nicht-Unterlegenheitsstudie an 899 afrikanischen Kindern mit Malaria vergleichbar gute Heilungsraten wie die entsprechende Tabletten-Darreichungsform (89). Die ursprüngliche Rationale für die Entwicklung pädiatrischer Darreichungsformen, eine Verbesserung der Medikamenten-Verabreichung, konnte jedoch in keiner der Einzelstudien belegt werden.

In einem systematischen Review konnten 2009 insgesamt sieben klinische Studien identifiziert werden, in denen pädiatrische „non-tablet“ ACTs mit konventionellen ACTs in Tablettenform verglichen wurden (84). Wie in den Einzelstudien zeigte sich auch in der Meta-Analyse der sieben Studien eine vergleichbare Wirksamkeit und Sicherheit von pädiatrischen und konventionellen Darreichungsformen. Bei der Analyse der Verträglichkeit der Medikamentenverabreichung konnte jedoch ein klarer Vorteil für die pädiatrischen Darreichungsformen festgestellt werden: Die Häufigkeit von arzneimittelinduziertem Erbrechen war bei den Patienten, die mit „non-tablet“ Darreichungsformen behandelt wurden, 4,5 % niedriger als bei Patienten in der Vergleichsgruppe (Relatives Risiko 0,78; 95 % KI 0,61-0,99). Auch das Risiko für unerwünschte gastrointestinale Arzneimittelwirkungen war in der „non-tablet“ Gruppe statistisch signifikant verringert. Auf Grundlage dieser Daten müsste man durchschnittlich 22 Patienten mit pädiatrischen ACTs anstelle von konventionellen

Tabletten behandeln, um eine Episode von arzneimittelinduziertem Erbrechen zu verhindern. Einschränkend muss gesagt werden, dass in dieser Meta-Analyse auch nicht-randomisierte Studien eingeschlossen wurden, sowie Studien die pädiatrische ACTs mit nicht-wirkstoffgleichen konventionellen ACTs verglichen, sodass die Unterschiede in der Verträglichkeit außer durch die Darreichungsform auch durch die unterschiedlichen Wirkstoffe mitbeeinflusst sein kann. Allerdings war die Überlegenheit der „non-tablet“ ACTs konsistent für alle untersuchten pädiatrischen ACTs, für alle geographischen Studienregionen in Afrika und Asien sowie für randomisierte und nicht-randomisierte Studien.

Pädiatrische ACTs finden mittlerweile in Afrika breite Anwendung. In einer Umfrage unter 71 Angehörigen von Gesundheitsberufen in sieben afrikanischen Ländern im Jahr 2011 gaben 83 % der Befragten an, pädiatrische Darreichungsformen als Erstlinientherapie bei jungen Kindern mit Malaria zu verwenden (90). In der aktuellen dritten Auflage der WHO Leitlinie zur Malariatherapie werden pädiatrische ACTs erstmals klar als bevorzugte Behandlungsoption für Kinder mit unkomplizierter Malaria empfohlen (14). Ob es durch pädiatrische ACTs tatsächlich zu einer verbesserten Heilungsrate sowie Verringerung von Behandlungs-Komplikationen und Hospitalisierungen bei nicht-überwachter Therapie kommt, sollte abschließend in randomisiert-kontrollierten effectiveness-trials geprüft werden.

3.2 Artemisinin-basierte Malariatherapie in Europa

Die importierte Malaria in Nicht-Endemiegebieten wie Europa unterscheidet sich in vielen Aspekten deutlich von der Malaria in Endemiegebieten. Wie die Auswertung der 8-Jahres Beobachtungsdaten der TropNet-Studie zur schweren Malaria in Europa zeigt, haben sowohl europäische Touristen als auch VFRs ein erhebliches Risiko, an einer schweren Malaria zu erkranken (22, 91). Ursache hierfür ist das Fehlen (bei Touristen) bzw. der Verlust (bei VFRs) der Semi-Immunität gegenüber Erreger und Krankheit. Das Risiko für kaukasische Touristen ist dabei höher als für VFRs, was auf ein gewisses Maß an Rest-Schutz bei den VFRs hindeutet (92). Auch genetische Faktoren spielen möglicherweise eine Rolle (93).

Die Altersstruktur der Patienten mit importierter Malaria (medianes Alter in der Tropnet Studie 42 Jahre) unterscheidet sich ebenfalls deutlich von der in Endemiegebieten, wo überwiegend junge Kinder betroffen sind (53). Durch das höhere Alter liegen bei Patienten mit importierter Malaria häufig Komorbiditäten wie Hypertonie oder Diabetes mellitus vor. Die aktuelle Arbeit lässt zudem darauf schließen, dass aufgrund des höheren Alters Komplikationen wie akutes Nierenversagen, und ZNS-Symptome häufiger auftreten (91). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien bei europäischen Reisenden mit importierter Malaria (94).

Eine Hyperparasitämie $\geq 5\%$ tritt bei europäischen Patienten in der aktuellen TropNet-Studie ebenfalls deutlich häufiger auf als bei Patienten mit schwerer Malaria in Endemiegebieten, bei denen Azidose, Koma und Anämie die häufigsten Merkmale einer schweren Infektion sind (52, 53). Dies ist relevant, da in den randomisiert kontrollierten Studien zum Vergleich von i.v. Artesunat und i.v. Chinin in Afrika und Asien die Subgruppen der Patienten mit Hyperparasitämie besonders von einer Artesunat-Therapie profitiert hatten (OR für letalen Verlauf unter Artesunat-Therapie für Patienten mit Hyperparasitämie $>10\%$ in Afrika 0,67; 95 % KI 0,47-0,97 gegenüber 0,84; 95 % KI 0,66-1,06 für Patienten ohne Hyperparasitämie bzw. 0,75; 95 % KI 0,63-0,90 in der Gesamtpopulation (53)). Diese Überlegenheit wird vor allem auf die rasche Parasiten-Elimination der Artemisinine zurückgeführt, die mit der vergleichsweise guten Wirksamkeit gegen jüngere Plasmodium-Stadien in Zusammenhang steht (13, 95, 96).

Gerade in Europa wurde der Übergang zu Artesunat als Erstlinientherapie der komplizierten Malaria jedoch deutlich verlangsamt, da wenige Behandlungsdaten von Patienten in Nicht-Endemiegebieten vorliegen, und da in Europa kein zugelassenes, GMP-konform produziertes Artesunat-Präparat auf dem Markt erhältlich ist. Die TropNet-Daten belegen, dass der Anteil der Patienten mit schwerer Malaria in Europa, die primär mit Artesunat therapiert wurden, in den Jahren zwischen 2006 und 2014 kontinuierlich von 27 % auf 60 % zunahm. Zudem zeigen sie, dass auch europäische

Patienten mit schwerer Malaria zweifelsfrei von einer Behandlung mit Artesunat gegenüber Chinin profitieren: zwar ließ sich unter anderem aufgrund der niedrigen Letalitätsrate in der europäischen Population (1,6 %) kein Überlebensvorteil für die Therapie mit Artesunat beweisen. Die Patienten mit Artesunat-Therapie boten jedoch eine raschere Parasiten-Clearance als die Patienten mit Chinin-Therapie, benötigten in der Folge eine um einen Tag kürzere intensivmedizinische Behandlung und konnten einen Tag früher aus der Klinik entlassen werden. Auch in der TropNet-Studie profitierten die Patienten mit Hyperparasitämie $\geq 5\%$ deutlicher von einer Artesunat-Therapie als Patienten ohne Hyperparasitämie (97). Auch wenn es sich hier um retrospektive Daten handelt, können die Ergebnisse dieser multizentrischen Studie in Zukunft helfen, die Entscheidungsfindung für eine Artesunat-Therapie für Kliniker zu erleichtern, zumal prospektive randomisierte Studien in Europa angesichts der bestehenden Evidenz aus Asien und Afrika nicht mehr durchführbar sein werden.

Die aktuelle Arbeit belegt auch die Sicherheit und gute Verträglichkeit der Artesunat-Therapie bei europäischen Patienten. Ähnlich wie in den Studien in Afrika und Asien traten keine unerwarteten schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse mit Bezug zur Artesunat-Therapie auf. Besondere Aufmerksamkeit verdient allerdings das Phänomen der verzögerten Hämolyse nach Artemisinin-Gabe (engl. post-artemisinin delayed haemolysis – PADH), das in der aktuellen Arbeit bei 27 % der Patienten mit Artemisinin-Therapie beobachtet wurde. Hierbei kommt es in den Wochen nach der Therapie und nach vollständiger Elimination der Plasmodien aus dem Blut zu einem verzögerten Hb-Abfall mit Hämolysezeichen (LDH Erhöhung, Erniedrigung des freien Haptoglobins). PADH wurde erstmals 2002 bei einem nicht-semiimmunem Patienten in Japan nach i.v. Artesunat Therapie beschrieben und 2011 in einer Fallserie bei nicht-semiimmunem Patienten in Europa (98). Seitdem wurde das Phänomen in mehreren Zentren in Europa (99-103), den USA (104) und 2014 auch bei Kindern in Afrika beobachtet (105). Die Häufigkeit der PADH bei nicht-semiimmunem Patienten war dabei in etwa gleich zur Inzidenz der PADH in der aktuellen TropNet-Studie (106). Bei den Patienten in Afrika trat PADH seltener auf (7% Inzidenz bei Kindern in Afrika), ein Kind in der afrikanischen Beobachtungsstudie bot im Rahmen der PADH jedoch einen

Hb-Abfall auf 2,8 g/dl (105). Die pathophysiologischen Hintergründe der PADH sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. In einer Studie bei Reiserückkehrern in Frankreich wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PADH und einer erhöhten Anzahl von ehemals mit Plasmodien infizierten Erythrozyten (engl. once infected erythrocytes, oi-E) beschrieben (101). Die Konzentration dieser Zellen im Blut der Behandelten ist nach Artemisinin-Therapie vergleichsweise höher als nach Therapie mit anderen Malaria-Medikamenten. Die Autoren postulieren, dass PADH durch eine verkürzte Lebensspanne und Zerstörung dieser oi-E in den Wochen nach Therapie verursacht wird (101).

Die aktuelle Beobachtungsstudie bei Reiserückkehrern an der Charité zeigt, dass es auch nach unkomplizierter Malaria und oraler Artemisinin-basierter Therapie zu verzögerten hämolytischen Reaktionen bei den Behandelten kommt. Bei 40 % der Patienten nach unkomplizierter Malaria und oraler ACT bestanden an Tag 14 nach Therapie Hämolysezeichen (LDH-Erhöhung, Erniedrigung des freien Haptoglobins). Bei einem Großteil dieser Patienten wurden die Hämolysezeichen auch noch 1 Monat nach Therapie festgestellt. Zu einem Hb-Abfall nach Therapie kam es allerdings nur bei der Hälfte der Patienten mit Hämolyse, bei den übrigen Patienten wurde der Hb-Verlust durch die gesteigerte Erythropoese nach Malaria vollständig kompensiert. Auffallend ist dabei die Tatsache, dass alle Patienten mit unkompensierter Hämolyse kaukasisch waren, alle Patienten mit kompensierter Hämolyse hingegen afrikanisch. Dies könnte auf eine unterschiedliche Beeinträchtigung der kompensatorischen Erythropoese in Abhängigkeit von Semi-Immunität bzw. Herkunft hindeuten (107). Die Patienten mit verzögerter Hämolyse und Hb-Abfall nach der Therapie hatten während der Therapie weniger Hb-Abfall als die Patienten ohne verzögerte Hämolyse. Dies deutet auf die Rolle der oi-E hin, durch die ein Hb-Verlust während der Infektion und Therapie vermieden und in die Phase nach der akuten Infektion verlagert werden könnte. Für Patienten, bei denen der Hb-Verlust in der Phase nach der Behandlung wie beschrieben bereits durch gesteigerte Erythropoese kompensiert wird, könnte die Verzögerung des Hb-Verlustes also von Vorteil sein. Andererseits bieten die Daten Anhalt dafür, dass der verzögerte Hb-Verlust nach Therapie den Hb-Verlust durch den

Abbau von oi-Es übersteigt, sodass die verzögerte Hämolyse insgesamt zu einem vermehrten Hb-Verlust führen könnte (107).

Klinische Hämolyse-Zeichen bzw. eine relevante Beeinträchtigung durch Anämie fanden sich in der aktuelle Arbeit bei keinem der Patienten. Dennoch lassen die Daten vermuten, dass verzögerte hämolytische Reaktionen nach oraler ACT bei unkomplizierter Malaria insgesamt zur Malaria-assoziierten Anämie beitragen. Relevanz hat dies möglicherweise für Patienten in Endemiegebieten, die aufgrund höherer Malaria-Infektionsraten, Ko-Infektionen und Mangelernährung vermehrt unter chronischer Anämie leiden (108). Die Bedeutung von verzögerten hämolytischen Reaktionen nach Artemisinin-basierter Malariatherapie sollte daher in Malaria-Endemiegebieten bei Patienten mit höherer Prävalenz von chronischer Anämie weiter untersucht werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Malaria zählt nach wie vor zu den wichtigsten Infektionskrankheiten. Eine rasche und effektive medikamentöse Therapie ist von entscheidender Bedeutung. ACTs sind die empfohlene Erstlinien-Therapie bei unkomplizierter Malaria in allen Malaria-Endemiegebieten. Bei schwerer Malaria führt die parenterale Artesunat-Therapie zu einem Überlebensvorteil gegenüber Chinin. Insgesamt haben die Artemisinine in den letzten 15 Jahren einen entscheidenden Beitrag zur Reduktion der Malaria-bedingten Morbidität und Mortalität weltweit geleistet.

Seit 2002 wird die Kombination aus Pyronaridin und Artesunat als neue ACT klinisch getestet. In der Phase II Studie zeigte P+A eine gute Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit. Auch in den *in vitro* Testungen von *P. falciparum*-Feldisolaten war Pyronaridin gut wirksam. Nach mehreren Phase III Studien wurde P+A 2015 von der EMA zugelassen. Eine Besonderheit von P+A ist die Verfügbarkeit einer pädiatrischen non-Tablet Darreichungsform. Durch diese Darreichungsformen kann Medikamenten-induziertes Erbrechen bei Kindern mit Malaria reduziert werden.

In Europa betrifft die Malaria Touristen und ehemalige Migranten, die zu ihren Familienangehörigen in Endemiegebiete reisen. Durch die fehlende bzw. abnehmende Semi-Immunität haben diese Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko an einer schweren Malaria zu erkranken. Die Etablierung von i.v. Artesunat zur Therapie der schweren Malaria war in Europa ob des Fehlens eines GMP-konform produzierten Artesunat-Präparates verlangsamt. Die TropNet Studie zur schweren Malaria in Europa belegt, dass auch europäische Patienten zweifelsfrei von einer Artesunat-Therapie gegenüber Chinin profitieren. Parenterales Artesunat ist bei europäischen Patienten mit Malaria sicher und gut verträglich, führt jedoch bei einem Teil der Patienten zu verzögerten hämolytischen Reaktionen in den Wochen nach Therapie. In einer Studie mit Malaria-Patienten in Berlin wurde gezeigt, dass verzögerte hämolytischen Reaktionen in milderer Form auch bei Patienten mit unkomplizierter Malaria nach oraler ACT vorkommen.

Seit einigen Jahren ist die Möglichkeit einer weltweiten Malaria-Eradikation zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Nach einer mehr als 30 Jahre dauernden Entwicklung wurde 2015 mit RTS,S der erste Impfstoff gegen *Plasmodium falciparum* zugelassen. Aufgrund der geringen Wirksamkeit vor allem bei Kindern unter drei Monaten, wird dieser jedoch derzeit von der WHO nicht empfohlen. Daten aus Pilot-Implementierungsprogrammen werden in den kommenden Jahren zeigen, inwiefern RTS,S einen Beitrag zur Malaria Elimination leisten kann. Durch den raschen Wissenszuwachs in der biomedizinischen Forschung werden zukünftig neue Generationen von verbesserten Impfstoffen, beispielsweise attenuierte Sporozoiten-Vakzine, an Bedeutung gewinnen.

Durch den Rückgang der Transmissions-Intensität in vielen Malaria-Endemiegebieten und der damit verbundenen Abnahme der Semi-Immunität ändert sich die klinische Präsentation und Altersverteilung der Patienten mit Malaria in diesen Gebieten. Zusätzliche epidemiologische und immunologische Erkenntnisse werden in Zukunft notwendig sein, um die Malaria-Kontrollprogramme für diese Veränderungen zu rüsten. Immunologische Untersuchungen von nicht-semiimmunem Patienten wie Touristen oder Migranten können hierzu einen Beitrag leisten.

Die Entstehung von *P. falciparum*-Stämmen mit reduzierter Artemisinin-Sensitivität im Westen Kambodschas und in der thailändisch-myanmarischen Grenzregion stellt derzeit die größte Bedrohung für die Malaria-Bekämpfung dar. Bei Parasiten-Stämmen mit zusätzlicher Resistenz gegen die Kombinations-Partnermedikamente kommt es zu hohen Raten von ACT-Therapieversagen. Neben der rigorosen Bekämpfung einer Verbreitung Artemisinin-resistenter Plasmodien wird die klinische Entwicklung neuer Substanzklassen wie Spiroindolone und Imidazolopiperazine in Zukunft eine entscheidende Rolle spielen.

5 Literatur

1. World Health Organization. World Malaria Report 2016. Geneva, 2016.
2. Global Burden of Disease contributors. Mortality Causes of Death Collaborators: Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
3. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*. 2008;5(6):e128.
4. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*. 2010;201(10):1544-50.
5. Groger M, Fischer HS, Veletzky L, Lalremruata A, Ramharter M. A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human *Plasmodium ovale* malaria. *Malar J*. 2017;16(1):112.
6. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2014;383(9918):723-35.
7. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004;363(9414):1017-24.
8. Warrel DA, Gilles HM. *Essential Malariology*. 4th Edition ed. London: Wiley; 2002.
9. White NJ, Breman JG. Malaria. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2016. p. 1674-92.
10. Richter J, Franken G, Mehlhorn H, Labisch A, Haussinger D. What is the evidence for the existence of *Plasmodium ovale* hypnozoites? *Parasitol Res*. 2010;107(6):1285-90.
11. Markus MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol*. 2015;31(6):239-45.
12. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193(4254):673-5.
13. White NJ. Malaria parasite clearance. *Malar J*. 2017;16(1):88.

14. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria - 3rd edition. Geneva 2015.
15. Douglas NM, Lampah DA, Kenangalem E, Simpson JA, Poespoprodjo JR, Sugiarto P, et al. Major burden of severe anemia from non-falciparum malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study. *PLoS Med.* 2013;10(12):e1001575; discussion e.
16. Miller LH, Good MF, Milon G. Malaria pathogenesis. *Science.* 1994;264(5167):1878-83.
17. Rosenthal PJ. Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria. *N Engl J Med.* 2008;358(17):1829-36.
18. Magowan C, Wollish W, Anderson L, Leech J. Cytoadherence by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes. *J Exp Med.* 1988;168(4):1307-20.
19. Kremsner PG, Adegnika AA, Hounkpatin AB, Zinsou JF, Taylor TE, Chimalizeni Y, et al. Intramuscular Artesunate for Severe Malaria in African Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *PLoS Med.* 2016;13(1):e1001938.
20. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit. Leitlinie: Diagnostik und therapie der Malaria [Verfügbar unter <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/042-001.html>. Zugriff am 5.4.2017]
21. Rapport annuel d'activité du Centre national de référence du Paludisme 2015, France [Verfügbar unter <https://ssl.voozadoo.net/palu/rapport.activites.2014.pdf>. Zugriff am 1.4.2017]
22. Argy N, Kendjo E, Auge-Courtoi C, Cojean S, Clain J, Houze P, et al. Influence of host factors and parasite biomass on the severity of imported Plasmodium falciparum malaria. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175328.
23. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria - 2nd edition. Geneva 2010.
24. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva 2006.
25. MacDonald G. The Epidemiology and Control of Malaria. London: Oxford University Press; 1957.
26. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, et al. A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010. *Malar J.* 2011;10:378.

27. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015;526(7572):207-11.
28. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med*. 1999;5(3):340-3.
29. Alonso D, Bouma MJ, Pascual M. Epidemic malaria and warmer temperatures in recent decades in an East African highland. *Proc Biol Sci*. 2011;278(1712):1661-9.
30. McCutchan TF, Grim KC, Li J, Weiss W, Rathore D, Sullivan M, et al. Measuring the effects of an ever-changing environment on malaria control. *Infect Immun*. 2004;72(4):2248-53.
31. Gething PW, Casey DC, Weiss DJ, Bisanzio D, Bhatt S, Cameron E, et al. Mapping *Plasmodium falciparum* Mortality in Africa between 1990 and 2015. *N Engl J Med*. 2016;375(25):2435-45.
32. The Malaria Atlas Project [Verfügbar unter: <http://www.map.ox.ac.uk/> Zugriff am 5.5.2017].
33. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Malaria. Stockholm, 2016. [Verfügbar unter: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/malaria/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx>. Zugriff am 1.5.2017]
34. de Gier B, Suryapranata FS, Crougths M, van Genderen PJ, Keuter M, Visser LG, et al. Increase in imported malaria in the Netherlands in asylum seekers and VFR travellers. *Malar J*. 2017;16(1):60.
35. Roggelin L, Tappe D, Noack B, Addo MM, Tannich E, Rothe C. Sharp increase of imported *Plasmodium vivax* malaria seen in migrants from Eritrea in Hamburg, Germany. *Malar J*. 2016;15:325.
36. Danis K, Baka A, Lenglet A, Van Bortel W, Terzaki I, Tseroni M, et al. Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(42).
37. Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial combinations. *Lancet*. 2004;364(9430):285-94.
38. White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, et al. Averting a malaria disaster. *Lancet*. 1999;353(9168):1965-7.
39. Gerstl S, Namagana A, Palacios L, Mweshi F, Aprile S, Lima A. High adherence to malaria treatment: promising results of an adherence study in South Kivu, Democratic Republic of the Congo. *Malar J*. 2015;14:414.

40. Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(3):CD007483.
41. Karbwang J, White NJ. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. *Clin Pharmacokinet*. 1990;19(4):264-79.
42. Chotsiri P, Wattanakul T, Hoglund R, Hanboonkunupakarn B, Pukrittayakamee S, Blessborn D, et al. Population pharmacokinetics and electrocardiographic effects of dihydroartemisinin-piperaquine in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2017.
43. White NJ, van Vugt M, Ezzet F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37(2):105-25.
44. Barnes KI, Little F, Smith PJ, Evans A, Watkins WM, White NJ. Sulfadoxine-pyrimethamine pharmacokinetics in malaria: pediatric dosing implications. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(6):582-96.
45. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(10):982-91.
46. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet*. 1989;2(8673):1183-4.
47. Maguire JD, Sumawinata IW, Masbar S, Laksana B, Prodjodipuro P, Susanti I, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in south Sumatra, Indonesia. *Lancet*. 2002;360(9326):58-60.
48. Siswantoro H, Russell B, Ratcliff A, Prasetyorini B, Chalfein F, Marfurt J, et al. In vivo and in vitro efficacy of chloroquine against *Plasmodium malariae* and *P. ovale* in Papua, Indonesia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):197-202.
49. Mombo-Ngoma G, Kleine C, Basra A, Wurbel H, Diop DA, Capan M, et al. Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon. *Malar J*. 2012;11:120.
50. Visser BJ, Wieten RW, Kroon D, Nagel IM, Belard S, van Vugt M, et al. Efficacy and safety of artemisinin combination therapy (ACT) for non-falciparum malaria: a systematic review. *Malar J*. 2014;13:463.
51. Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Price RN. Artemisinin combination therapy for vivax malaria. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(6):405-16.
52. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial Group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005;366(9487):717-25.

53. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010;376(9753):1647-57.
54. Kremsner PG, Taylor T, Issifou S, Kombila M, Chimalizeni Y, Kawaza K, et al. A simplified intravenous artesunate regimen for severe malaria. *J Infect Dis*. 2012;205(2):312-9.
55. Zaloumis SG, Tarning J, Krishna S, Price RN, White NJ, Davis TM, et al. Population Pharmacokinetics of Intravenous Artesunate: A Pooled Analysis of Individual Data From Patients With Severe Malaria. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3(11):1-9.
56. Tran TH, Day NP, Nguyen HP, Nguyen TH, Tran TH, Pham PL, et al. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1996;335(2):76-83.
57. Gomes MF, Faiz MA, Gyapong JO, Warsame M, Agbenyega T, Babiker A, et al. Pre-referral rectal artesunate to prevent death and disability in severe malaria: a placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009;373(9663):557-66.
58. Maitland K, Kiguli S, Opoka RO, Engoru C, Olupot-Olupot P, Akech SO, et al. Mortality after fluid bolus in African children with severe infection. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2483-95.
59. Hanson J, Anstey NM, Bihari D, White NJ, Day NP, Dondorp AM. The fluid management of adults with severe malaria. *Crit Care*. 2014;18(6):642.
60. Position of WHO's Roll Back Malaria Department on malaria treatment policy 2003 [Verfügbar unter: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_apr_position/en/. Zugriff am 3.3.2017]
61. Kurth F, Belard S, Basra A, Ramharter M. Pyronaridine-artesunate combination therapy for the treatment of malaria. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(6):564-9.
62. Ramharter M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp I, Belard S, et al. Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated falciparum malaria in pediatric patients in Gabon. *J Infect Dis*. 2008;198(6):911-9.
63. Tshefu AK, Gaye O, Kayentao K, Thompson R, Bhatt KM, Sesay SS, et al. Efficacy and safety of a fixed-dose oral combination of pyronaridine-artesunate compared with artemether-lumefantrine in children and adults with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2010;375(9724):1457-67.

64. Kayentao K, Doumbo OK, Penali LK, Offianan AT, Bhatt KM, Kimani J, et al. Pyronaridine-artesunate granules versus artemether-lumefantrine crushed tablets in children with *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized controlled trial. *Malar J*. 2012;11:364.
65. Rueangweerayut R, Phyo AP, Uthaisin C, Poravuth Y, Binh TQ, Tinto H, et al. Pyronaridine-artesunate versus mefloquine plus artesunate for malaria. *N Engl J Med*. 2012;366(14):1298-309.
66. Bukirwa H, Unnikrishnan B, Kramer CV, Sinclair D, Nair S, Tharyan P. Artesunate plus pyronaridine for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(3):CD006404.
67. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Safety and efficacy of re-treatments with pyronaridine-artesunate in African patients with malaria: a substudy of the WANECAM randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):189-98.
68. Belard S, Kurth F. Pyronaridine-artesunate retreatment for malaria. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):136-7.
69. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(5):491-7.
70. Plucinski MM, Dimbu PR, Macaia AP, Ferreira CM, Samutondo C, Quivinja J, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Angola, 2015. *Malar J*. 2017;16(1):62.
71. Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uige Provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):437-43.
72. Tumwebaze P, Conrad MD, Walakira A, LeClair N, Byaruhanga O, Nakazibwe C, et al. Impact of antimalarial treatment and chemoprevention on the drug sensitivity of malaria parasites isolated from Ugandan children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3018-30.
73. Conrad MD, LeClair N, Arinaitwe E, Wanzira H, Kakuru A, Bigira V, et al. Comparative impacts over 5 years of artemisinin-based combination therapies on *Plasmodium falciparum* polymorphisms that modulate drug sensitivity in Ugandan children. *J Infect Dis*. 2014;210(3):344-53.

74. Taylor AR, Flegg JA, Holmes CC, Guerin PJ, Sibley CH, Conrad MD, et al. Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine Exert Inverse Selective Pressure on Plasmodium Falciparum Drug Sensitivity-Associated Haplotypes in Uganda. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(1):ofw229.
75. Taylor SM, Juliano JJ. Artemisinin combination therapies and malaria parasite drug resistance: the game is afoot. *J Infect Dis.* 2014;210(3):335-7.
76. Kurth F, Pongratz P, Belard S, Mordmuller B, Kremsner PG, Ramharter M. In vitro activity of pyronaridine against Plasmodium falciparum and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays. *Malar J.* 2009;8:79.
77. Yang HL, Liu DQ, Yang YM, Huang KG, Dong Y, Yang PF, et al. In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum to eight antimalarials in China-Myanmar and China-Lao PDR border areas. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28(3):460-4.
78. Pradines B, Mabika Mamfoumbi M, Parzy D, Owono Medang M, Lebeau C, Mourou Mbina JR, et al. In vitro susceptibility of African isolates of Plasmodium falciparum from Gabon to pyronaridine. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(1):105-8.
79. Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, Hienne R, et al. In-vitro activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of Plasmodium falciparum in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(3):333-9.
80. Vivas L, Rattray L, Stewart L, Bongard E, Robinson BL, Peters W, et al. Antimalarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination in vitro and in vivo. *Acta Trop.* 2008;105(3):222-8.
81. Eklund EH, Fidock DA. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *Int J Parasitol.* 2008;38(7):743-7.
82. Premji ZG. Coartem: the journey to the clinic. *Malar J.* 2009;8 Suppl 1:S3.
83. Creek D, Bigira V, Arinaitwe E, Wanzira H, Kakuru A, Tappero J, et al. Increased risk of early vomiting among infants and young children treated with dihydroartemisinin-piperaquine compared with artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):873-5.
84. Kurth F, Belard S, Adegnika AA, Gaye O, Kremsner PG, Ramharter M. Do paediatric drug formulations of artemisinin combination therapies improve the treatment of children with malaria? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(2):125-32.
85. Abdulla S, Sagara I. Dispersible formulation of artemether/lumefantrine: specifically developed for infants and young children. *Malar J.* 2009;8 Suppl 1:S7.

86. Teklehaimanot A, Teklehaimanot HD. Alternative form of artemether-lumefantrine for infants. *Lancet*. 2008;372(9652):1786-7.
87. Oyakhirome S, Potschke M, Schwarz NG, Dornemann J, Laengin M, Salazar CO, et al. Artesunate--amodiaquine combination therapy for falciparum malaria in young Gabonese children. *Malar J*. 2007;6:29.
88. Sondo P, Derra K, Diallo-Nakanabo S, Tarnagda Z, Zampa O, Kazienga A, et al. Effectiveness and safety of artemether-lumefantrine versus artesunate-amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated falciparum malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malar J*. 2015;14:325.
89. Abdulla S, Sagara I, Borrmann S, D'Alessandro U, Gonzalez R, Hamel M, et al. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine dispersible tablets compared with crushed commercial tablets in African infants and children with uncomplicated malaria: a randomised, single-blind, multicentre trial. *Lancet*. 2008;372(9652):1819-27.
90. Agnandji ST, Kurth F, Fernandes JF, Soulanoudjingar SS, Abossolo BP, Mombongoma G, et al. The use of paediatric artemisinin combinations in sub-Saharan Africa: a snapshot questionnaire survey of health care personnel. *Malar J*. 2011;10:365.
91. Kurth F, Develoux M, Mechain M, Malvy D, Clerinx J, Antinori S, et al. Severe malaria in Europe: an 8-year multi-centre observational study. *Malar J*. 2017;16(1):57.
92. Phillips A, Bassett P, Zeki S, Newman S, Pasvol G. Risk factors for severe disease in adults with falciparum malaria. *Clin Infect Dis*. 2009;48(7):871-8.
93. Mackinnon MJ, Mwangi TW, Snow RW, Marsh K, Williams TN. Heritability of malaria in Africa. *PLoS Med*. 2005;2(12):e340.
94. Muhlberger N, Jelinek T, Behrens RH, Gjorup I, Coulaud JP, Clerinx J, et al. Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of falciparum malaria in European patients: observations from TropNetEurop and SIMPID Surveillance Data. *Clin Infect Dis*. 2003;36(8):990-5.
95. Klonis N, Xie SC, McCaw JM, Crespo-Ortiz MP, Zaloumis SG, Simpson JA, et al. Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(13):5157-62.
96. White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*. 2008;320(5874):330-4.
97. Kurth F, Develoux M, Mechain M, Clerinx J, Antinori S, Gjorup IE, et al. Intravenous Artesunate Reduces Parasite Clearance Time, Duration of Intensive Care, and Hospital Treatment in Patients With Severe Malaria in Europe: The TropNet Severe Malaria Study. *Clin Infect Dis*. 2015;61(9):1441-4.

98. Zoller T, Junghanss T, Kapaun A, Gjorup I, Richter J, Hugo-Persson M, et al. Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(5):771-7.
99. Corpolongo A, De Nardo P, Ghirga P, Gentilotti E, Bellagamba R, Tommasi C, et al. Haemolytic anaemia in an HIV-infected patient with severe falciparum malaria after treatment with oral artemether-lumefantrine. *Malaria journal*. 2012;11:91.
100. De Nardo P, Oliva A, Giancola ML, Ghirga P, Mencarini P, Bibas M, et al. Haemolytic anaemia after oral artemether-lumefantrine treatment in a patient affected by severe imported falciparum malaria. *Infection*. 2013;41(4):863-5.
101. Jaureguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, et al. Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood*. 2014;124(2):167-75.
102. Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, Visser LG, Bierman WF, Clerinx J, van Veldhuizen CK, et al. Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium. *Malaria journal*. 2012;11:102.
103. Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malaria journal*. 2013;12:241.
104. Paczkowski MM, Landman KL, Arguin PM, Centers for Disease C, Prevention. Update on cases of delayed hemolysis after parenteral artesunate therapy for malaria - United States, 2008 and 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63(34):753-5.
105. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnikaa AA, Sylverken J, Spahlinger D, et al. Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria--a double-center prospective study. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(12):1921-8.
106. Rehman K, Lotsch F, Kreamsner PG, Ramharther M. Haemolysis associated with the treatment of malaria with artemisinin derivatives: a systematic review of current evidence. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;29:268-73.
107. Kurth F, Lingscheid T, Steiner F, Stegemann MS, Belard S, Menner N, et al. Hemolysis after Oral Artemisinin Combination Therapy for Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(8):1381-6.
108. Bustinduy AL, Parraga IM, Thomas CL, Mungai PL, Mutuku F, Muchiri EM, et al. Impact of polyparasitic infections on anemia and undernutrition among Kenyan children living in a Schistosoma haematobium-endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(3):433-40.

6 Danksagung

Von den akademischen und klinischen Lehrern, Mentoren, Freunden, Kollegen, Doktoranden, Mitarbeitern und Studienpatienten, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, können leider nur einige Wenige hier erwähnt werden:

Mein Dank gilt Prof. Dr. N. Suttorp, Direktor der Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, der mich während der letzten Jahre als Mentor begleitet hat, und mir insbesondere ermöglichte, mein wissenschaftliches Interesse auch abseits des Forschungsschwerpunkts unserer Klinik weiterzuverfolgen.

Danken möchte ich auch Prof. Peter Kremsner, wissenschaftlicher Direktor des Centre de Recherches Médicales Lambaréné, Gabun, der meine Neugierde für klinische Malariaforschung weckte und mich bei meinen Projekten in Gabun stets uneingeschränkt unterstützt hat.

Prof. Michael Ramharter danke ich von Herzen für Rückhalt, Rat und Freundschaft während der letzten 12 Jahre, vom ersten Kontakt mit *Plasmodium falciparum* über die Unterstützung und wesentlichen Gedanken bei nahezu allen wissenschaftlichen Projekten bis hin zur Korrektur dieser Arbeit. Auch Dr. Sabine Bélard möchte ich für die unzähligen wertvollen Diskussionen und für die gute Zusammenarbeit ab der ersten Stunde von Herzen danken.

Dr. Thomas Zoller gilt mein besonderer Dank für seine Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei den Projekten an der Charité und im Rahmen von TropNet. Auch den vielen Netzwerk-Kooperationspartnern von TropNet-Europe möchte ich herzlich für die Zusammenarbeit während der letzten Jahre danken.

Prof. Leif Sander danke ich für die enge Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Diskussionen und seine Unterstützung während der letzten Jahre. Auch Prof. Martin Witzernath möchte ich für Rat und Unterstützung während der vergangenen Jahre herzlich danken. Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank den vielen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, die hier namentlich nicht erwähnt werden können und die meine Arbeit in den vergangenen Jahren auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken: Meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht liebevoll und bedingungslos unterstützen und ohne deren Rückhalt kein Stück dieser Arbeit möglich gewesen wäre. Meiner Frau Lena für ihr Verständnis, für ihre praktische Unterstützung und für die Rückzugsmöglichkeit in die private Welt. Meinem Sohn Leo danke ich für sein sonniges Gemüt und seine Lebensfreude, die mir die Hoffnung und Zuversicht geben, mit der jedes Hindernis überwunden werden kann.

7 Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift