

**Aus dem Institut für Tropenmedizin  
Direktor: Professor Dr. J. Knobloch**

**Sektion Humanparasitologie  
Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner**

**Kombination von Amodiaquin mit Artesunat im  
Vergleich zu Amodiaquin als Monotherapie für die  
Behandlung von Kindern mit unkomplizierter  
Malaria tropica in Lambaréné, Gabun**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Philipp Matthias Rezbach, geb. 25.06.1975,  
aus  
Weingarten  
2004**

Dekan: Professor Dr. C. Claussen  
Erster Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner  
Zweiter Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Problemstellung	1
1.2	Definition der Malaria und Klassifizierung der Erreger	3
1.3	Entwicklungszyklus des Parasiten	4
1.4	Epidemiologische Daten	6
1.5	Klinik der Malaria	6
1.6	Therapie der Malaria	9
1.6.1.	Angriffspunkte im Zyklus des Parasiten	9
1.6.2.	Wirkungsweise der gängigen Medikamente	11
1.6.3	Die Therapie mit Artesunat	13
1.6.4	Die Therapie mit Amodiaquin	13
1.7	Zielsetzung	14
<b>2</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	Studienort	16
2.2	Studienkonzept	18
2.3	Aufnahmekriterien und Ausschlusskriterien	19
2.4	Randomisierung	21
2.5	Medikamentendosierung	22
2.5	Kontrolluntersuchungen	22
2.7	Diagnostik	23
2.7.1	Diagnostik der Malaria und Bestimmung der Parasitämie	23
2.7.2	Leukozytendifferenzierung und Differentialblutbild	25
2.7.3	Biochemische Untersuchungen	25

<b>2.7.4</b>	<b>PCR Genotypisierung</b>	<b>25</b>
<b>2.7.5</b>	<b>Untersuchung und Anamnese</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientendaten</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Per protocol-Analyse</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Parasitenelimination</b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Entfieberung</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Entwicklung von Gametozyten im Verlauf</b>	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Hämoglobinkonzentrationen im Verlauf</b>	<b>37</b>
<b>3.7</b>	<b>Verträglichkeit der Studienmedikation</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>55</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Weltweit erkranken jährlich 300 bis 500 Millionen Menschen an *Plasmodium falciparum* Malaria. Sie ist damit die am weitesten verbreitete Protozoen-Infektionskrankheit und eine der häufigsten Infektionskrankheiten<sup>1</sup>.

Die Resistenz von *Plasmodium falciparum* Malaria gegenüber dem Standardmedikament Chloroquin wird als wesentlichste Ursache des Versagens der gegenwärtigen Malariakontrollstrategie gesehen. Vor allem die Morbidität und Mortalität bei afrikanischen Kindern ist in den letzten Jahrzehnten dramatisch gestiegen. Auch die Resistenzentwicklung auf Pyrimethamin/Sulfadoxin, eine günstige und weit verbreitete Alternative, nimmt rapide zu<sup>2, 3, 4</sup>.

Somit besteht ein akuter Bedarf an neuen, sicheren und erschwinglichen Medikamenten gegen die Malaria.

Auch werden dringend neue Strategien benötigt, um die Wirkungsdauer von Malariamedikamenten zu verlängern.

Ähnlich wie im Bereich der Tuberkulose- oder HIV-Therapie entstand so der Gedanke, gängige Medikamente miteinander zu kombinieren<sup>5</sup>.

Bereits seit einiger Zeit wird die Kombination von konventionellen Anti-Malariamedikamenten mit Artemisininderivaten als Behandlungsoption für resistente *Plasmodium falciparum*-Stämme vorgeschlagen.

Für eine Kombinationstherapie auf der Grundlage von Artemisininderivaten sprechen mehrere Gründe:

1.) Durch einen unabhängigen Aktionsmodus ist die Wahrscheinlichkeit

von gleichzeitig selektionierten resistenzkodierenden Mutationen gering.

2.) Das Medikament verhindert die ausgeprägte Gametozytogenese, wie zum Beispiel nach Gabe von Sulfadoxin/Pyrimethamin. Dies führt zu einer Verminderung der Übertragung vor allem von selektionierten, Resistenzen tragenden Parasiten.

3.) Artemisinin und seine Derivate führen zu einer schnellen Reduzierung der Biomasse an multiresistenten Parasiten, der verbleibende Rest wird durch die hohen Konzentrationen des anderen Medikamentes zerstört<sup>6</sup>.

4.) Im Falle einer synergistisch-pharmakodynamischen Wechselwirkung zwischen den beiden Kombinationspartnern besteht die Möglichkeit einer gesteigerten Wirksamkeit bei der Behandlung, bzw. einer Verkürzung der Behandlungsdauer.

In anderen Studien hat sich die Kombination von Antimalariamedikamenten bereits bewährt.

Die Kombination von Artesunat mit Mefloquin wurde in einer Studie im Nordwesten Thailands untersucht, einer Gegend mit niedriger Übertragungsrate und multiresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen. Durch Therapie mit der Kombination und die frühe Diagnosestellung konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Die systematische Verwendung dieser Kombination hat zu einer anhaltenden Heilungsrate von über 95 % geführt. Außerdem wurde eine Verminderung der *Plasmodium falciparum* Transmission und eine Rückkehr der In-vitro-Sensitivität der Parasiten gegenüber Mefloquin beobachtet<sup>7</sup>.

In einer andere Studie, bei Kindern unter fünf Jahren in Afrika, wurde die Kombination von Artesunat und Sulfadoxin/Pyrimethamin mit Sulfadoxin/Pyrimethamin alleine verglichen. Die Kombination zeigte signifikant bessere Ergebnisse in Bezug auf die Entwicklung von Symptomen, Parasitenreduzierung und Gametozytenträgersrate<sup>8</sup>.

Diese Studien zeigen, dass die Kombination von Artesunat mit einem anderen Medikament vielversprechende Ergebnisse aufzeigen kann.

Weitere Studien mit anderen Medikamenten in Kombination mit Artesunat müssen auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit untersucht werden.

Unser Ziel ist es, eine Transmissions- und Resistenzentwicklungshemmende, hoch wirksame, gut verträgliche und kostengünstige Medikamentenkombination zu identifizieren.

Ein potenzielles Kombinationsmedikament ist Amodiaquin, ein relativ günstiges, dem Chloroquin ähnliches Aminochinolin. Generell geht man davon aus, dass Amodiaquin wirksam gegen Infektionen mit Chloroquin-resistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen ist. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Wirkung, vermutlich auf Grund von Kreuzresistenzen, variiert.

In der Anwendung als Langzeitprophylaxe hat sich Amodiaquin aufgrund der Nebenwirkungen nicht bewährt. In der Akuttherapie wird Amodiaquin jedoch gut toleriert<sup>9, 10</sup>.

Auf Grund der guten Verträglichkeit und größtenteils noch vorhandenen Wirksamkeit erscheint eine Kombination von Artesunat mit Amodiaquin, nicht zuletzt auch aus wirtschaftlichen und operationellen Gründen, sinnvoll.

## **1.2 Definition der Malaria und Klassifizierung der Erreger**

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die durch unterschiedliche Arten von Plasmodien verursacht wird. Innerhalb des Systems der Protozoen, des Stammes der *Sporozoa*, Unterklasse *Coccidia*, gehört die Gattung der Plasmodien zur Hauptunterordnung der *Haemosporina* (Sporozoen in Erythrozyten).

Die humanpathogenen Arten sind *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, Erreger der Malaria tertiana, und *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana.

Alle Formen werden durch die blutsaugende, weiblichen *Anopheles* Stechmücke übertragen, die vor allem in den Abendstunden und nachts aktiv ist. Die weitaus meisten Infektionen werden durch *Plasmodium falciparum* verursacht und können als einzige auch tödlich enden.

### 1.3 Entwicklungszyklus des Parasiten

Die Parasiten werden in Form von Sporozoiten während einer Blutmahlzeit von weiblichen Anophelesmücken in die Blutbahn entlassen. Nach nur kurzer Zeit dringen sie in die Leberparenchymzellen ein. Dort vermehren sie sich durch asexuelle Teilung (Schizogonie) und bilden präerythrozytäre Schizonten. Beim Zerfall dieser Schizonten werden Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt, welche die Erythrozyten befallen. Im Falle einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* sind bis zu diesem Zeitpunkt etwa zwei vergangen. Bei Infektion mit *Plasmodium ovale* oder *Plasmodium vivax* kann sich außerdem noch ein Teil der Sporozoiten zu Ruheformen (Hyphozoiten) entwickeln, die noch nach Monaten bis Jahren zu Rezidiven führen können. Die Merozoiten beginnen, eingeschlossen in einer Vakuole, innerhalb der Erythrozyten zu wachsen und bilden sogenannte Ringformen mit Zellkern und einem Zytoplasmasaum, der eine Verdauungsvakuole umschließt. Diese Trophozoiten vermehren sich durch Zellteilung und bilden Schizonten die letztlich rupturieren und wieder Merozoiten in die Blutbahn entlassen. Die Anzahl der Merozoiten in einem Schizonten ist abhängig von der Plasmodienart und bei *Plasmodium falciparum* mit 8 - 32 Merozoiten pro Schizont am höchsten. Durch den Befall der Erythrozyten durch die Merozoiten schließt sich der erythrozytäre Zyklus an, der bei einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* etwa 48 Stunden dauert. Einige der in die Erythrozyten eindringenden Merozoiten bilden hier keine asexuellen Plasmodienformen, sondern differenzieren sich zu (männlichen) Mikrogametozyten oder (weiblichen) Makrogametozyten. Der hier zugrunde liegende Mechanismus ist noch

nicht geklärt. Diese sexuellen Stadien können sich nicht weiter im Menschen vermehren und werden bei einer Blutmahlzeit der Mücke von dieser aufgenommen. Es folgt die geschlechtliche Vermehrung (Sporogonie). Im Magen der infizierten Mücke reifen die männlichen und weiblichen Gametozyten zu Gameten und vereinigen sich. Aus der Zygote entsteht ein Ookinet, welcher die Magen-, bzw. Darmwand durchdringt, sich einkapselt und damit zur Oozyste wird. In dieser bilden sich wieder Sporozoiten, die nach Ruptur der Oozyste in den Speichel der Mücke wandern und bei erneutem Stich in den menschlichen Wirtsorganismus gelangen.

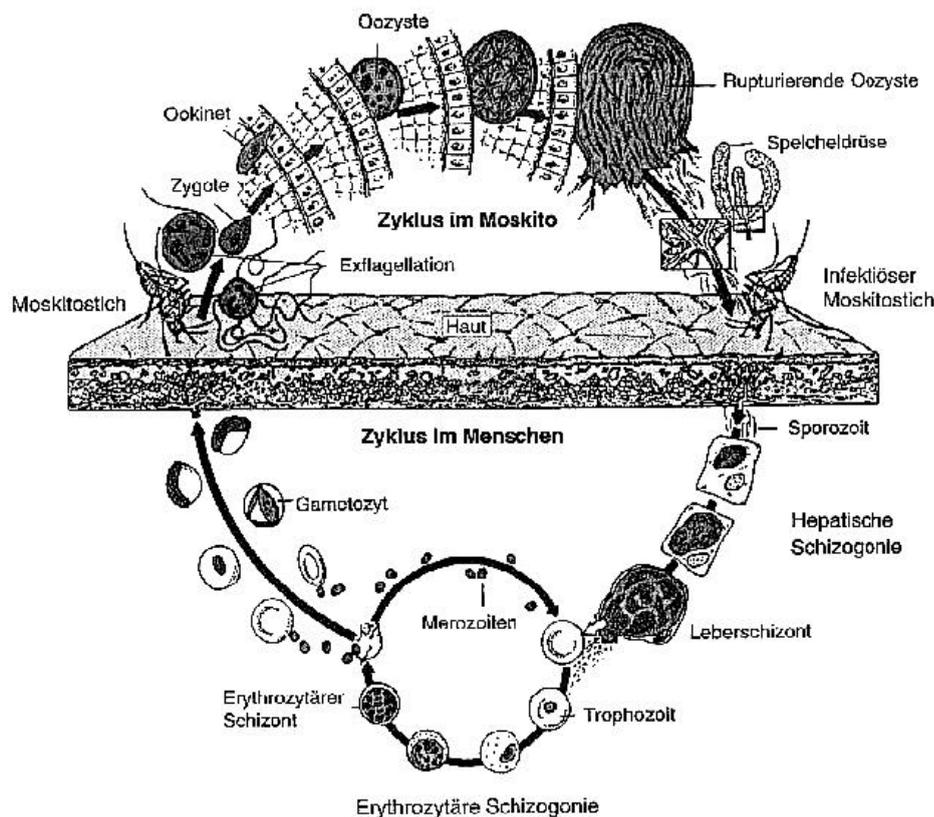


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* im Menschen und in der Mücke. [Kretschmer et al., 1996]

## 1.4 Epidemiologische Daten

Malaria ist eine der häufigsten parasitären Erkrankungen weltweit. Außer in Australien kommt sie in allen tropischen und subtropischen Regionen der Welt vor. Nach Angaben der WHO leben 2,4 Milliarden Menschen in über 90 Ländern in malariagefährdeten Gebieten. Dies entspricht ca. 40% der Weltbevölkerung. Die WHO schätzt die Inzidenz weltweit auf 300 bis 500 Millionen Fälle pro Jahr. Die Mortalität wird auf über 1 Million Tote pro Jahr geschätzt.

In Afrika leben südlich der Sahara von den geschätzten 571 Millionen Einwohnern ungefähr 74 % in hochendemischen Gebieten mit ganzjähriger intensiver Transmission von *Plasmodium falciparum*. Es wird angenommen, dass etwa 90 % aller Malariafälle und die große Mehrheit der durch Malaria verursachten Todesfälle im tropischen Afrika auftreten. Hauptsächlich betroffen sind Kleinkinder aus ländlichen Gebieten mit schlechter medizinischer Versorgung.

*Plasmodium falciparum* ist der Erreger von schwerer, häufig auch fulminant verlaufender Malaria und die vorherrschende Art von Plasmodien im tropischen Afrika, Südostasien und im Amazonasgebiet<sup>1</sup>.

## 1.5 Klinik der Malaria

Alle klinischen Symptome werden durch die asexuelle erythrozytäre Phase des Erregers im Plasmodium-Zyklus verursacht<sup>11</sup> und treten demnach nach Befall des Erythrozyten auf. Der klinische Verlauf der Krankheit hängt stark von der eventuell schon vorhandenen Immunität der erkrankten Person ab. Den höchsten Immunitätsgrad besitzen Erwachsene, die in einem hyper- bis holoendemischen Malariagebiet aufgewachsen sind. Es wird jedoch keine vollständige Immunität erreicht, sondern nur eine Teil- bzw. Semi-Immunität<sup>12</sup>.

Personen ohne Immunität erkranken ohne rechtzeitige antiparasitäre Therapie schwer. Der Immunitätsgrad eines Patienten spielt auch bei der Effektivität der antiparasitären Therapie eine große Rolle.

*Plasmodium falciparum* ist der einzige humanpathogene Parasit, der zu schwerer, potenziell tödlicher Malaria führt. Für *Plasmodium falciparum* charakteristisch ist die Entwicklung sehr hoher Parasitämien und das Adhäsionsphänomen, d.h. die Anheftung parasitierter Erythrozyten, die sich mittels rezeptorentragender Vorstülpungen der Membran, der sog. Knobs, an die Endothelzellen der postkapillaren Venolen von inneren Organen, wie z.B. Herz, Plazenta, Niere und Gehirn, anlagern<sup>13</sup>.

Die zerebrale Malaria stellt die schwerste Verlaufsform der Malaria tropica dar. Auch bei rasch einsetzender intensiver Therapie verläuft ein großer Teil der Fälle tödlich.

Die wichtigsten Komplikationen bei Kindern sind Hyperlaktatämie, Anämie, zerebrale Malaria und Hypoglykämie.

Eine weitere Komplikation ist das akute Nierenversagen, das in der Hälfte der Fälle bis zur Dialysepflichtigkeit führt<sup>14, 15</sup>. Bei Kindern kommt es fast nie zu Nierenversagen<sup>16</sup>.

Die ersten Anzeichen einer unkomplizierten Malaria tropica sind unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen, gelegentliche Übelkeit sowie subfebrile, unregelmäßige Temperaturen. Nach kurzer Zeit steigt das Fieber an. Bei der Malaria tropica ist im Gegensatz zu den anderen Malariaformen kein Rhythmus in den Fieberschüben zu erkennen. Bei der semi-immunen, erwachsenen Bevölkerung in hoch-endemischen Gebieten verläuft die Malaria tropica meistens subfebril oder sogar afebril.

Eine der Hauptursachen der Anämie ist die Hämolyse durch rupturierende, infizierte Erythrozyten. Deswegen ist ein hoher Parasitenbefall in der Regel mit einer schweren Anämie assoziiert. Allgemeine

Hämolysezeichen, wie Erhöhung des LDH-Wertes und Verminderung des Haptoglobins im Serum, sind regelmäßig nachweisbar.

Im Differentialblutbild ist sowohl eine im Verlauf auftretende Leukozytopenie<sup>17</sup>, als auch eine Leukozytose<sup>18, 19</sup>, besonders bei höherer Parasitenlast, nachweisbar. Letztere kann ein Hinweis auf einen durch eine bakterielle Superinfektion erschwerten Verlauf sein. Dies ist wahrscheinlich jedoch sehr selten<sup>20, 21, 22</sup>.

Im Differentialblutbild finden sich eine Eosinopenie<sup>19</sup> und eine mäßiggradige Monozytose<sup>19, 21</sup>. Meist besteht eine deutliche Thrombozytopenie<sup>17</sup>.

Durch den Zerfall von infizierten Erythrozyten wird das retikuloendotheliale System aktiviert. Ein Zeichen dafür ist die im Verlauf der Erkrankung auftretende Splenomegalie und häufig auch eine mäßiggradige Hepatomegalie. Im Herzen, in der Lunge, in den Nieren, im Gastrointestinaltrakt, im Gehirn, in der Plazenta und an anderen Organen können Veränderungen durch Störung der oben beschriebenen Mikrozirkulation auftreten. Man findet durch infizierte Erythrozyten partiell verstopfte Kapillaren, Hämorrhagien als Folge von Gefäßwandschädigungen, sowie durch entzündliche Prozesse Nekroseherde an obturierten Gefäßen<sup>23</sup>.

Eine bekannte Ursache der Hypoglykämie bei der Malaria ist die Wirkung von sekretorischen Phospholipidantigenen, welche die Glukoseaufnahme in Gewebszellen erhöhen. Eine weitere Ursache ist die blutzuckersenkende Wirkung von Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), das bei schwerer und komplizierter Malaria in hohen Konzentrationen im Blut vorkommt<sup>24</sup>.

Es wurde versucht, prognostische Faktoren für einen schweren Verlauf bei Malaria zu finden und Kriterien zur Unterscheidung von milden und schweren Verlaufsformen zu definieren. Einerseits um die Vergleichbarkeit von Studien zu gewährleisten, andererseits um behandelnden Ärzten

optimale Therapieempfehlungen geben zu können.

Von der Weltgesundheitsorganisation werden zerebrale Symptomatik, schwere normozytäre Anämie (Hämoglobin <5g/dl; Hämatokrit <15%), akutes Nierenversagen (Kreatinin >265µmol/l bzw. >3mg/dl), respiratorische Insuffizienz, schwere Hypoglykämie (<2,2mmol/l), Kreislaufschock (systolischer Blutdruck <70mmHg), disseminierte intravasale Gerinnung, wiederholte Krämpfe (>3/24 Std.), schwere metabolische Azidose (pH arteriell <7,25; Bikarbonat im Plasma <15mmol/l) oder Hyperlaktazidämie (Laktat = 5 mmol/l) und Makrohämaturie als Kriterien für das Vorliegen einer schweren Malaria genannt. Jedes der genannten Kriterien erfüllt bei Vorhandensein von asexuellen Plasmodienformen im Blut für sich allein bereits die Definition einer schweren Malaria<sup>25</sup>. Zusätzlich können die folgenden Zustände bei schwerer Malaria auftreten: Hyperparasitämie (>5% der Erythrozyten sind infiziert), klinisch feststellbar durch Ikterus oder Serum-Bilirubin >50µmol/l, Hyperpyrexie von >40°C und Bewusstseinstörung<sup>15</sup>.

Als Indikatoren für eine infauste Prognose wurden ermittelt: Koma, Hyperparasitämien von >500.000 Parasiten/µl, hohe Herz- (>150/min) und Atemfrequenz (>50/min)<sup>16</sup>, Einschränkung der Vitalkapazität, Hypoglykämie (<2,2 mmol/l), Ikterus<sup>26</sup>, Hyperlaktazidämie (>5 mmol/l)<sup>27</sup> und malariapigmenthaltige Leukozyten (>5%)<sup>28,29</sup>.

## **1.6 Therapie der Malaria**

### **1.6.1. Angriffspunkte im Zyklus des Parasiten**

Der komplexe Malariazyklus ist für eine medikamentöse Therapie bzw. für eine medikamentöse Prophylaxe problematisch. Es gibt bisher keinen Wirkstoff, der alle Entwicklungsstadien erfolgreich beeinflusst.

Nach ihren Hauptwirkungen werden die Wirkstoffe in folgenden Gruppen unterschieden: Gewebeschizontozide, Hypnozoitozide, Blutschizontozide, Gametozide und Sporontozide.

Es kann eine suppressive Prophylaxe mit Blutschizontoziden, die das Auftreten von Symptomen verhindert, von einer kausalen Prophylaxe mit Gewebeschizontoziden unterschieden werden.

Bei den gewebeschizontoziden Stoffen wird die Entwicklung der präerythrozytären Gewebeschizonten gehemmt. Beeinflusst wird der Parasit in einem frühen Entwicklungsstadium, d.h. bevor er die Erythrozyten befallen kann. Aus diesem Grunde handelt es sich daher um eine prophylaktische Wirkung. Primaquin und Proguanil sind Beispiele für Substanzen mit gewebsschizontoider Wirkung.

Die hypnozoitoiden Substanzen wirken gegen die Ruheformen in der Leber und damit Rezidiv verhindernd. Ein Beispiel für hypnozoitoider Wirkung ist Primaquin.

Blutschizontozide unterdrücken die Vermehrung der Plasmodien in den Erythrozyten.

Die gametoziden Substanzen wirken auf die Geschlechtsformen. Eine Übertragung von Mensch auf Mücke kann damit verhindert werden. Ein Beispiel hierfür ist die gametozide Wirkung von Primaquin auf *Plasmodium falciparum*.

Sporontozide wirken nach Aufnahme in der Mücke. Sie blockieren die Entwicklung von Sporozoiten.

Ebenfalls muss bei der Behandlung der verschiedenen Malariaformen zwischen der Therapie des akuten Anfalls und einer eventuell indizierten, sich anschließenden Eradikation der Leberstadien, wie bei *P. vivax* und *P. ovalae*, unterschieden werden. Die Suppressionsbehandlung beim akuten Anfall wirkt nur gegen die erythrozytären Formen, die Rezidivprophylaxe dagegen gegen Leberstadien von *P. vivax* und *P. ovalae*<sup>30</sup>.

### 1.6.2. Wirkungsweise der gängigen Medikamente

Sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe werden heute hauptsächlich fünf Substanzgruppen verwendet:

- an C-4 substituierte Chinoline: z.B. Chloroquin, Mefloquin, Chinin oder Amodiaquin,
- Halofantrin, ein Phenantrenderivat,
- Primaquin, ein 8-Aminochinolin,
- Dihydrofolsäurereduktasehemmer wie Proguanil und Pyrimethamin,
- Folsäureantagonisten Sulfonamide bzw. Sulphone.

Bei unzureichender Wirkung oder Unverträglichkeit anderer Mittel wird auch Doxycyclin sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe eingesetzt.

C-4 substituierte Chinoline wirken in der erythrozytären Phase auf die Blutschizonten. Wirkungsmechanismus ist hier, wie bei Halofantrin, eine Hemmung der Häm polymerase. Dieses Enzym wird von den Plasmodien benötigt, um ein Anreichern membranschädigender Häm metaboliten zu vermeiden. Im Gegensatz zu den Chinolinen wird Halofantrin nur zur akuten Therapie verwendet werden. Außerdem ist das Risiko von lebensbedrohlichen Arrhythmien bekannt, weshalb es nur noch in Ausnahmefällen verwendet wird.

Doxycyclin, Clindamycin und andere prokaryotisch wirksame Substanzen wirken ebenfalls blutschizontozid. Die Wirkung dieser Substanzgruppe geht höchst wahrscheinlich auf die Hemmung des sekundär endosymbiotischen Apicoplasten zurück<sup>31</sup>.

Primaquin wirkt als einziges Mittel auch gegen Hypnozoiten. Ferner hat es einen gewebeschizontoiden und einen gametoziden Effekt. Da es nicht auf die Blutschizonten wirkt, kann es nicht zur akuten Therapie eingesetzt

werden. Es wird hauptsächlich zur vollständigen Ausheilung einer *P vivax* Infektion genutzt.

Die den Folsäurestoffwechsel beeinflussenden Stoffe wirken blutschizontoid, und kaum gegen Gewebeschizonten. Sie sind infolge der Resistenzentwicklung zur Monotherapie ungeeignet und werden in Kombinationen eingesetzt.

Pyrimethamin wird mit Sulfonamiden wie Sulfadoxin oder Diaphenylsulfon kombiniert.

Proguanil kombiniert man mit Chloroquin oder Atovaquon. Proguanil ist eine nicht aktive Vorstufe und erst in der metabolisierten Form als Cycloguanil wirksam. Aufgrund fehlender embryotoxischer Wirkung kann es in Kombination mit Chloroquin auch in der Schwangerschaft gegeben werden.

Atovaquon ist ein Naphtochinonderivat ohne Strukturverwandtschaft zu anderen Malariamitteln und wirkt als Inhibitor des mitochondrialen Elektronentransportsystems blutschizontoid<sup>30</sup>.

### 1.6.3 Die Therapie mit Artesunat

Artesunat ist ein Derivat des Artemisins, einer aus der Pflanze *Artemisia annua* extrahierten Substanz. Es kann für die Behandlung sowohl der leichten als auch der schwere Malaria tropica eingesetzt werden. Hervorzuheben ist bei Artesunat die hohe intrinsische Aktivität, die zu einer schnellen Reduzierung der im Blut zirkulierenden Parasiten führt, die hohe Sicherheit und gute Verträglichkeit, sowie bisher keine sicher belegbaren Fälle von Resistenzen bei *P. falciparum* auf die Substanz, die zu einem Behandlungsversagen geführt hätten.

Die Biomasse des Parasiten wird bei jedem asexuellen Zyklus 10 000-fach reduziert. Dies macht Artesunat zum am schnellsten wirkenden Antimalariamedikament und zum optimalen Partner bei der Kombinationstherapie.

Vermutlich wirkt Artesunat, indem es die Produktion von freien Radikalen in den befallenen Erythrozyten anregt und zu einer Alkylierung der Parasitenproteine führt<sup>32, 33</sup>.

Artesunat, so wie das ebenfalls verwandte Artemether, wird schnell in Dihydroartemisinin (DHA, welches ebenfalls inzwischen zur Behandlung eingesetzt wird) hydrolysiert. Alle Substanzen dieser Familie haben sehr kurze Halbwertszeiten und sind gut verträglich. In der Literatur wurde lediglich über zwei Fälle mit ZNS-Symptomatik und über gelegentlich auftretende leichte gastrointestinale Beschwerden berichtet<sup>34, 35</sup>.

### 1.6.4 Die Therapie mit Amodiaquin

Amodiaquin ist eine mit Chloroquin verwandte Substanz, gegen welche es im Gegensatz zu Chloroquin noch deutlich weniger *Plasmodium falciparum*-Resistenzen gibt. Wie Chloroquin bindet es wahrscheinlich im Parasiten an das Ferriprotoporphyrin IX und antagonisiert hierbei die

Polymerisation seiner toxischen Metaboliten in unschädliche Haemozoin-Kristalle<sup>36</sup>. Daher wird es in vielen afrikanischen Ländern als Alternativmedikation zu Chloroquin genutzt. Bei einem von 2000 Patienten, welche Amodiaquin als Prophylaxe genommen hatten, kam es zu Hepatitis und Agranulozytose, weshalb Amodiaquin nicht mehr für die Prophylaxe empfohlen wird. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass es bei der Akutbehandlung zu Hepatitis oder Agranulozytose gekommen sei<sup>9</sup>.

## 1.7 Zielsetzung

Die Resistenzentwicklung der *P. falciparum* Stämme gegen die gängigen Malariamedikamente ist ein großes gesundheitspolitisches Problem in Afrika. Vor allem in den betroffenen Endemiegebieten sind die Menschen auf effektive und erschwingliche Medikationen angewiesen. Aus diesem Grunde ist von der WHO ein Spezialprogramm entwickelt worden, bei dem unterschiedliche, bekannte Medikamente in Kombination mit Artesunat untersucht werden. Ziel ist eine effektive, sichere, einfach anzuwendende und kostengünstige medikamentöse Therapie, bei der die Entwicklung von Resistenzen sowohl gegenüber der Medikamentenkombination als auch gegenüber den einzelnen Komponenten nur sehr langsam oder im besten Falle gar nicht auftreten kann. Klinische Studien sind nötig, um die Sicherheit und Wirksamkeit der Kombinationen zu untersuchen.

Ziel dieser Studie war es, die Sicherheit, Verträglichkeit, den antiparasitären Effekt und die Wirkung auf die Gametozyten von Amodiaquin mit Artesunat und Amodiaquin alleine zu erforschen. Die Studie wurde mit Kindern, welche an unkomplizierter Malaria tropica erkrankt waren, in Lambaréné, Gabun durchgeführt.

Die Studie wurde im Rahmen des WHO „Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)“ durchgeführt. Das

Studienprotokoll war so angelegt, dass die Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien, die auch im Rahmen dieses Programms durchgeführt wurden, verglichen werden konnten.

## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Studienort

Die Studien wurden am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné, Gabun, zwischen Januar 1999 und Januar 2000 durchgeführt. Gabun liegt im Westen von Zentralafrika auf Höhe des Äquators. Es wird im Norden von Kamerun und Äquatorial-Guinea, im Osten und Süden vom Kongo und im Westen vom Atlantik begrenzt. Es herrscht ein feuchtes, tropisches Klima vor mit Niederschlagsmaxima in den Küstenregionen und abnehmender Niederschlagsintensität in Richtung Osten bei einem Jahresmittel von 3100 mm. Die Vegetation ist überwiegend durch Regenwald gekennzeichnet, wovon jedoch kleine Teile in landwirtschaftliche Nutzfläche umgewandelt worden sind. Lambaréné (Provinz Moyen-Ogooué) liegt etwa 50 km südlich des Äquators und etwa 180 km südöstlich von Libreville, der Hauptstadt Gabuns. Die Stadt liegt am Fluss Ogooué. Mit ca. 15.000 Einwohnern ist Lambaréné die viertgrößte Stadt Gabuns. Das Albert-Schweitzer-Krankenhaus befindet sich einen Kilometer außerhalb des Ortes Lambaréné und umfasst neben dem Forschungslabor Abteilungen für Innere Medizin, Chirurgie, Pädiatrie, Gynäkologie/Geburtshilfe und Psychiatrie mit insgesamt 230 Betten. In Lambaréné und Umgebung, woher die für diese Studie rekrutierten Patienten stammen, wird Malaria ganzjährig übertragen. Es handelt sich um ein für *P. falciparum*-Malaria hyperendemisches Gebiet<sup>37</sup>, wobei etwa 90% der Malariafälle durch *P. falciparum* verursacht werden, die restlichen durch *P. malariae* und *P. ovale*. Die Hauptvektoren sind *Anopheles gambiae* und *Anopheles mouchei*<sup>38</sup>. Die Transmissionsrate ist regional und saisonal schwankend. In der kurzen Regenzeit von Oktober bis Dezember werden die meisten Infektionen registriert, während in der langen Regenzeit von Januar bis Mai sowie in den Trockenzeiten eine geringere Transmission vorherrscht<sup>38</sup>. Neben weit verbreiteten Chloroquin-

Resistenzen beobachtet man eine Zunahme der Resistenzen gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin<sup>39</sup>.



Abbildung 2: Karte Gabun

## 2.2 Studienkonzept

Bei der Studie handelte es sich um eine randomisierte, doppelt-blinde und Placebo-kontrollierte Studie. Kindern, welche an unkomplizierter *Plasmodium falciparum*-Malaria erkrankt waren, wurde, an das Körpergewicht angepasst, Amodiaquin in Kombination mit entweder Artesunat (Amodiaquin/Artesunat) oder Placebo (Amodiaquin/Placebo) einmal täglich über einen Zeitraum von drei Tagen gegeben. Idealerweise wurde die tägliche Medikation im Abstand von ungefähr 24 Stunden gegeben.

Die Patienten wurden während und nach der medikamentösen Behandlung an einheitlich definierten Studientagen klinisch und laborchemisch über 28 Tage hinweg untersucht. Die Nachfolgeuntersuchungen wurden an den Studientagen 3, 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Die Eltern wurden jedoch zusätzlich vom Studienpersonal aufgefordert, im Falle von unvorhergesehenen Änderungen des Allgemeinzustands der Patienten, auch an nicht eingeplanten Studientagen, zur Untersuchung in das Albert-Schweitzer-Krankenhaus zu kommen.

Als primäres Ziel wurde vor Studienbeginn die komplette Parasitenelimination und klinische Heilung am Tag 28 nach Beginn der Behandlung definiert. Die Sicherheit und Verträglichkeit der Therapien, d.h. die Erfassung von leichten und schweren Nebenwirkungen durch Anamnese, klinische Untersuchung und Kontrolle relevanter Laborparameter im Verlauf der Studie, wurden ebenfalls als primäres Studienziel definiert.

Die Anzahl der klinisch und parasitologisch geheilten Patienten am Tag 28 wurde für die Teilnehmer der Studie, bei denen erneut asexuelle *P. falciparum*-Parasiten im Blutausschlag im Zeitraum zwischen den Tagen 17 bis 28 festgestellt worden waren, durch PCR Genotypisierung näher bestimmt.

Es wurde bei erneutem Nachweis von Parasiten unterschieden zwischen Patienten, bei denen durch die PCR Genotypisierung der gleiche Erreger erneut festgestellt worden war, und Patienten, bei denen der nachgewiesene Erreger einen anderen, neuen Genotypen hatte.

Als Therapieversagen wurde das Auftreten des erneut gleichen Erregers gewertet, eine erneute Infektion mit einem oder mehreren anderen Genotypen dagegen als Heilung von der ursprünglichen Infektion im eigentlichen Sinne.

Sekundäres Ziel der Studie war es zu erfahren, wie viele der Patienten nach 24, 48 und 72 Stunden unter der Medikation parasiten- und fieberfrei waren, und wie sich die Gametozytenrate bei den jeweiligen Patienten an den einzelnen Terminen der Nachuntersuchung (Tag 7, 14, 21, 28) entwickeln würde. Außerdem sollte der Verlauf der Hämoglobinkonzentrationen bei den Teilnehmern in den beiden Studiengruppen untersucht werden.

Das Studienprotokoll wurde vom Ethikkomitee der internationalen Stiftung des Albert-Schweitzer-Hospitals, der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen und dem WHO Secretarial Committee for Research Involving Human Subjects (SCRIHS), Genf, Schweiz, überprüft und genehmigt. Schriftliche oder mündliche und bezeugte Einverständniserklärungen wurden von allen Eltern oder den jeweiligen Erziehungsberechtigten erhalten.

### **2.3 Aufnahmekriterien und Ausschlusskriterien**

In die Studie aufgenommen wurden Kinder aus Lambaréné und der näheren Umgebung, bei denen angenommen werden konnte, dass sie sich mindestens einen Monat in erreichbarer Nähe des Krankenhauses aufhalten würden. Die Kinder mussten zwischen 6 Monate und 10 Jahre alt sein. Sie mussten ein Körpergewicht von über 5 Kilogramm haben,

damit eine genau angepasste Dosis an Artesunat in Tablettenform verabreicht werden konnte.

Die Kinder mussten bei der Erstuntersuchung an einer *Plasmodium falciparum*-Monoinfektion mit einer Parasitenanzahl im Blut zwischen 1.000-200.000/ $\mu$ l erkrankt sein. Das gemessene Fieber musste rektal über 38,5° C sein oder aber bei den Kindern musste anamnestisch bestätigt in den letzten 24 Stunden eine Fieberepisode aufgetreten sein.

Ausschlusskriterien waren Zeichen einer schweren Malaria<sup>40</sup>, d. h. zerebrale Malaria, schwere Anämie mit einem Hämatokrit kleiner 15%, Nierenversagen mit einem Creatinin größer 3 mg/dl, Lungenödem, Hypoglykämie mit Blutzucker kleiner 40 mg/dl, Schock mit systolischem Blutdruck RR kleiner 50 mmHg, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) mit spontanen Blutungen, wiederholte Krampfanfälle, Azidose, Makrohämaturie, Ikterus mit Serumbilirubin größer 3 mg/dl und Hyperlaktatämie (Plasmalaktatkonzentration > 5 mmol/l).

Alle klinischen Gefahrenzeichen wie persistierendes Erbrechen, die Unfähigkeit zu trinken (bei Kleinkindern an der Mutterbrust), zu sitzen oder zu stehen, Krampfanfälle in der Vorgeschichte, Lethargie oder Bewusstseinsbeschränkung<sup>41</sup> führten ebenfalls zum Studienausschluss, ebenso wie andere ernstzunehmende Grunderkrankungen renaler, kardialer oder hepatischer Art, schwere Unterernährung oder bekannte Allergien auf die einzelnen Komponenten der Studienmedikation.

Die Anwendung einer anderen wirksamen Malariatherapie war ebenfalls ein Grund für den Ausschluss aus der Studie.

Ausschlussgründe für bereits in die Studie aufgenommene Patienten waren Behandlungsversagen und das Auftreten eines „Adverse event“.

Als Behandlungsversagen wurde die Entwicklung von oben beschriebenen Gefahrenzeichen oder Anzeichen einer schweren Malaria nach dem Studienbeginn definiert. Außerdem eine Parasitämie nach 48 Stunden, welche mindestens ebenso hoch oder höher als an Tag 0 war,

oder eine Parasitämie zwischen Tag 3 bis Tag 6 der Studie, mit mindestens 25% der am Tag 0 gezählten Parasiten. Patienten, bei denen mikroskopisch asexuelle Formen von *Plasmodium falciparum* zwischen den Studientagen 7 und 28 nach vorhergehender vollständiger Elimination von asexuellen Stadien nachgewiesen wurden, wurden ebenfalls als Behandlungsversager bewertet.

Eine Nebenwirkung wurde definiert als ein neu auftretendes Symptom oder Zeichen, eine neu hinzukommende Krankheit oder als das Auftreten von pathologischen Laborwerten, welche an Tag 0 noch nicht vorhanden waren, sich jedoch im Laufe der Nachkontrollen entwickelten oder aber am Tag 0 vorhanden waren, sich jedoch im Verlauf der Nachuntersuchungen verschlimmerten.

Der Zusammenhang zwischen Nebenwirkung und Studienmedikation wurde von den Untersuchern beurteilt und in die Kategorien - gesichert, - wahrscheinlich, - möglich, - unwahrscheinlich, - nicht in Zusammenhang stehend, oder - unbekannt eingeteilt.

Als schwere Nebenwirkung wurde ein Ereignis definiert, welches tödlich oder lebensbedrohlich verläuft oder zu einer stationären Krankenhausaufnahme veranlasst<sup>42</sup>.

## **2.4 Randomisierung**

Den an der Studie teilnehmenden Patienten wurde randomisiert entweder die Kombination von Artesunat (Arsumax 50 mg, Sanofi-Synthélabo, Frankreich) mit Amodiaquin (Camoquine 200 mg, Parke-Davis, Frankreich) oder Amodiaquin mit Placebo verabreicht. Der Randomisierungscode wurde von Sanofi-Synthélabo per Computer nach dem Zufallsprinzip in 10er Blocks erzeugt. Die Studiencodes wurden in individuellen Hüllen versiegelt und sicher gelagert. Den randomisierten Patienten wurde vom Untersucher in numerischer Reihenfolge eine

Studiennummer zugeteilt. Sowohl Patienten als auch Untersucher waren nicht darüber informiert, welche der jeweiligen Studienmedikationen der Studienteilnehmer erhielt. Artesunat und Placebotabletten waren von identischer Größe und Farbe und wurden in vier sequentiell nummerierten Aluminiumsäckchen verpackt (ein Säckchen für Tag 0, 1 und 2, ein zusätzliches Säckchen in Reserve). Amodiaquintabletten wurden aus kommerziell erhältlichen Standardpackungen (Parke-Davis, Frankreich) entnommen.

## **2.5 Medikamentendosierung**

Artesunat oder Artesunatplacebo wurde in Dosierungen zu 4 mg/kg Körpergewicht einmal täglich über die ersten drei Tage der Studie hinweg (jeweils auf die nächste halbe Tablette auf- oder abgerundet), und Amodiaquin 10 mg/kg Körpergewicht einmal täglich ebenfalls über die ersten drei Tage hinweg (auf die nächste viertel Tablette auf- oder abgerundet) verabreicht. Alle Studienmedikamente wurden in der Klinik verabreicht und unter Aufsicht eingenommen. Wenn der Patient die Studienmedikation innerhalb einer Stunde erbrach oder ausspuckte, wurde die volle Medikamentendosis erneut verabreicht. Bei darauf folgendem erneuten erfolglosen Verabreichen musste der Patient von der Studie ausgeschlossen und parenteral behandelt werden.

## **2.5 Kontrolluntersuchungen**

Insgesamt verlief die Studie über einen Zeitraum von 28 Tagen. An den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 und 28 fand routinemäßig eine Kontrolluntersuchung statt, bei der die Patienten immer anamnestisch und klinisch untersucht wurden. Auch bei Anzeichen einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes oder erneuten Erkrankung zwischen den

Terminen wurde eine zusätzliche Kontrolluntersuchung durchgeführt.

An jedem der Kontrolltermine wurde ein Blutaussstrich auf Parasiten hin untersucht und die Körpertemperatur gemessen. Außerdem wurde eine Blutprobe auf Filterpapier für geplante pharmakokinetische Analysen konserviert. An den Tagen 0 und 28, so wie bei erneuter Zunahme der Parasitämie wurden Hämoglobin, Hämatokrit und die Leukozytenanzahl bestimmt, sowie Aspartat-Amino-Transferase (ASAT) und Alanin-Amino-Transferase (ALAT), Bilirubin und Creatinin im Plasma bestimmt. Für Genotypisierung mittels PCR wurde am Tag 0 und bei einer erneuten Detektion von asexuellen Parasitenformen vom Tag 17 bis zum Tag 28 eine Blutprobe auf Filterpapier konserviert.

Die Patienten bzw. deren Eltern oder Erziehungsberechtigte wurden regelmäßig über die Einnahme anderer Medikamente oder über das Aufsuchen lokaler Apotheken oder Ärzte befragt. Es wurde besonders darauf hingewiesen, auf das Wohlbefinden des Kindes zwischen den Kontrolluntersuchungen zu achten und bei Bedarf das Studienzentrum aufzusuchen. Patienten, bei denen durch die Studienmedikation keine Besserung der Erkrankung erreicht werden konnte, wurden entsprechend der Schwere des klinischen Zustandes mit den gängigen und lokal wirksamen Medikamenten behandelt.

## **2.7 Diagnostik**

### **2.7.1 Diagnostik der Malaria und Bestimmung der Parasitämie**

Um die Parasitämie im Blut als Konzentration von asexuellen *P. falciparum*-Formen zu bestimmen, wurde von mikroskopisch erfahrenen Untersuchern nach einer standardisierten Methode im Blutaussstrich die Parasitenzahl bestimmt.

Angewendet wurde die Lambaréné-Methode, bei der ein mit Giemsa

gefärbter Blutausstrich, der sogenannte „Dicke Tropfen“, nach folgender Methode angefertigt und ausgewertet wird: Nach Punction der Fingerbeere wird mit einer Pipette 10 µl Kapillarblut gleichmäßig auf einem Objektträger verteilt. Hierbei ist die definierte Verteilungsfläche 10x18 mm. Eine dem Objektträger unterliegende Schablone ermöglicht die genaue Einhaltung dieser Fläche. Es folgt das Trocknen des Objektträgers im Wärmeschrank in horizontaler Stellung über mehrere Minuten bei 45°C. Danach folgt die Färbung des „Dicken Tropfens“ mit Giemsalösung über zwanzig Minuten. Die Färbelösung wurde alle sechs Stunden frisch aus einer konzentrierten Giemsalösung und Titrisolphosphatpuffer (pH 7,2) im Verhältnis 1:5 hergestellt und gefiltert. Nach dem Färbevorgang wird die Giemsalösung mit Wasser vorsichtig von dem Objektträger gewaschen und dieser wieder erneut für einige Minuten getrocknet. Durch ein Mikroskop werden bei 1000-facher Vergrößerung mit Öl 100 Gesichtsfelder untersucht und die asexuellen und sexuellen Parasiten ausgezählt. Die hier verwendete Methode der quantifizierten Beurteilung des Dicken Tropfens wurde von Kremsner et al.<sup>43</sup> 1988 erstmals beschrieben. Durch das definierte Volumen (10 µl) und die definierte Fläche (10x18 mm) ergibt sich ein definiertes Verhältnis von im jeweiligen Gesichtsfeld sichtbaren Blutvolumen pro µl. Über einen für das Mikroskop spezifisch ermittelten Umrechnungsfaktor wird dann die Parasitenzahl pro µl errechnet. Die Genauigkeit dieser Methode ist mit der des Ausstriches vergleichbar<sup>44</sup>.

Ca. 10 - 20% der Ausstriche wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und maskiert erneut bewertet. Wenn die ermittelten Ergebnisse nicht übereinstimmten, wurde der Ausstrich von einem dritten Untersucher nochmals überprüft. Dessen Ergebnisse wurden dann in die Analyse der Daten aufgenommen.

### **2.7.2 Leukozytendifferenzierung und Differentialblutbild**

Mittels QBC (Quantitativ Buffy Coat)-Methode (QBC, Becton Dickinson, USA) wurde aus Kapillarblut Hämoglobin-, Hämatokrit-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration ermittelt. Das Differentialblutbild wurde durch Auszählen von 100 Leukozyten im Dicken Tropfen ermittelt, dabei wurden die Leukozyten in neutrophile-, eosinophile-, und basophile Granulozyten sowie in Monozyten und Lymphozyten unterteilt. Bei der Zentrifugation von 40 µl Blut in Kapillarröhrchen, welche mit dem fluoreszierenden Farbstoff Acridine orange beschichtet sind, wird der Buffy Coat mittels Schwimmkörper gespreizt. Diese auf Fluoreszenz basierende volumetrische Methode wird durch visuelle Unterscheidung der Farbunterschiede bestimmt.

### **2.7.3 Biochemische Untersuchungen**

Die biochemischen Parameter Albumin, Aspartat-Amino-Transferase, Alanin-Amino-Transverase, Glukose, Harnstoff, Creatinin und Gesamt-Bilirubin wurden mit Hilfe der Trockenchemiegeräte DT60II und DTSCII (Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, New York, USA) gemessen.

### **2.7.4 PCR Genotypisierung**

Um bei Wiederauftreten einer asexueller Parasitämie zwischen einer Reinfektion und einer Rekrudescenz unterscheiden zu können, wurden die Parasiten genotypisiert. Hierzu wurden 80 µl Vollblut zu Studienbeginn und bei wieder auftretender Parasitämie auf ein Filterpapier pipettiert. *Plasmodium falciparum* wurde mit Hilfe von PCR (polymerase chain reaction)-Verstärkung der Merozoiten-Oberflächen-Antigene 1 und 2 (merozoite surface protein MSP 1 und MSP 2) genotypisiert und auf

glutamatreiche Proteine hin untersucht<sup>45</sup>. (Isocode Stix von der Firma Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland).

### **2.7.5 Untersuchung und Anamnese**

Neben der körperlichen Untersuchung wurden Puls und Blutdruck gemessen. Unter Verwendung eines Ohrthermometers mit Thermoscan-Technik wurde die Körpertemperatur im Gehörgang gemessen. Anamnestisch wurden Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen, Schwindelgefühl, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Essstörung, Durchfall und gegebenenfalls andere Symptome gezielt erfragt.

### **2.8 Statistische Analyse**

Die Größe der beiden Versuchsgruppen wurde auf Grundlage der bekanntermaßen zu erwartenden Heilungsrate von Amodiaquin/Placebo ( $HR_{AP}$ ) und Amodiaquin/Artesunat ( $HR_{AA}$ ) mit einem zweiseitigen  $\alpha$  von 0,05 und einer Power von 80% berechnet. Um bei einer angenommenen  $HR_{AP}$  von 80% und einer  $HR_{AA}$  von 95% ein eventuelles verlieren von 10 - 20% der Teilnehmer mit einzuberechnen, musste also jede der beiden Versuchsgruppen 110 Patienten umfassen. Die Daten wurden doppelt eingegeben, validiert (EpiInfo version 6.04b, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) und mit Stata version 6.0 (Stata Corporation, TX, USA) und JMP Version 4.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) analysiert.

Für die Analyse der Wirksamkeit wurde die per protocol-Analyse verwendet.

In der per protocol-Analyse wurden nur Patienten ausgewertet, bei denen in Bezug auf die Wirksamkeit der primäre Studienendpunkt erreicht

worden war (klinische und parasitologische Heilung am Tag 28 oder Behandlungsversagen).

Ausgeschlossen aus der per protocol-Analyse wurden alle Patienten, bei denen die Eintrittskriterien nicht erfüllt worden waren, und alle Patienten, die nicht mehr verfolgt wurden (dazu wurden auch die Patienten gezählt, deren Eltern das Kind wieder aus der Studie herausgenommen hatten). Wiederholtes Erbrechen oder Ausspucken der Studienmedikation führte ebenfalls zum Ausschluss aus der per protocol-Analyse. Patienten, die andere Antimalariamedikamente eingenommen hatten, und Patienten, die wegen einer Nebenwirkung ausgeschlossen werden mussten, wurden als Behandlungsversager bewertet und daher in die per protocol-Analyse eingeschlossen.

Patienten, bei denen eine Nachuntersuchung an Tag 14 wegen Abwesenheit nicht möglich war, die aber an den darauf folgenden Nachuntersuchungen bis zum Tag 28 wieder erschienen, wurden von den Tag 14 Auswertungen ausgeschlossen, nicht aber von der Tag 28 Auswertung.

Zur Untersuchung der Nebenwirkungen wurden in einer „intention to treat“-Analyse alle Patientendaten, also die Daten von all denjenigen Patienten, die zumindest eine Dosis der Studienmedikation erhalten hatten, ausgewertet.

Veränderungen der Hämoglobinkonzentration im zeitlichen Verlauf in den beiden Behandlungsgruppen wurden mit dem statistischen Test „repeated measures analysis of variance“ unter Anwendung der konservativen Korrekturmethode nach Box verglichen. Dabei wurde „Studientag“ als sich wiederholende Variable verwendet.

Binäre Daten wurden durch Annahme der Unterschiede in Proportionen mit korrespondierenden 95% Vertrauensintervallen (95% VI) analysiert. Genaue 95% VI wurden berechnet, wenn die Proportionen nahe an Null oder Eins waren (z.B. größer 95% Heilungsrate). Sonst wurden übliche

Schätzwerte angewandt<sup>46</sup>. Student's paired und unpaired  $t$ -test wurde angewandt, um die Unterschiede zwischen und in den Gruppen für normal verteilte Labordaten im Mittelwert abzuschätzen. Für nicht normal-verteilte Daten wurden entsprechende nicht-parametrische Tests angewendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientendaten

Zwischen Januar 1999 und Januar 2000 wurden 220 Patienten in die Studie aufgenommen. 110 Patienten wurden in die Amodiaquin/Artesunat Gruppe und 110 Patienten in die Amodiaquin/Placebo Gruppe aufgenommen. Abbildung 3 zeigt die Verteilung der Patienten in den jeweiligen Gruppen.

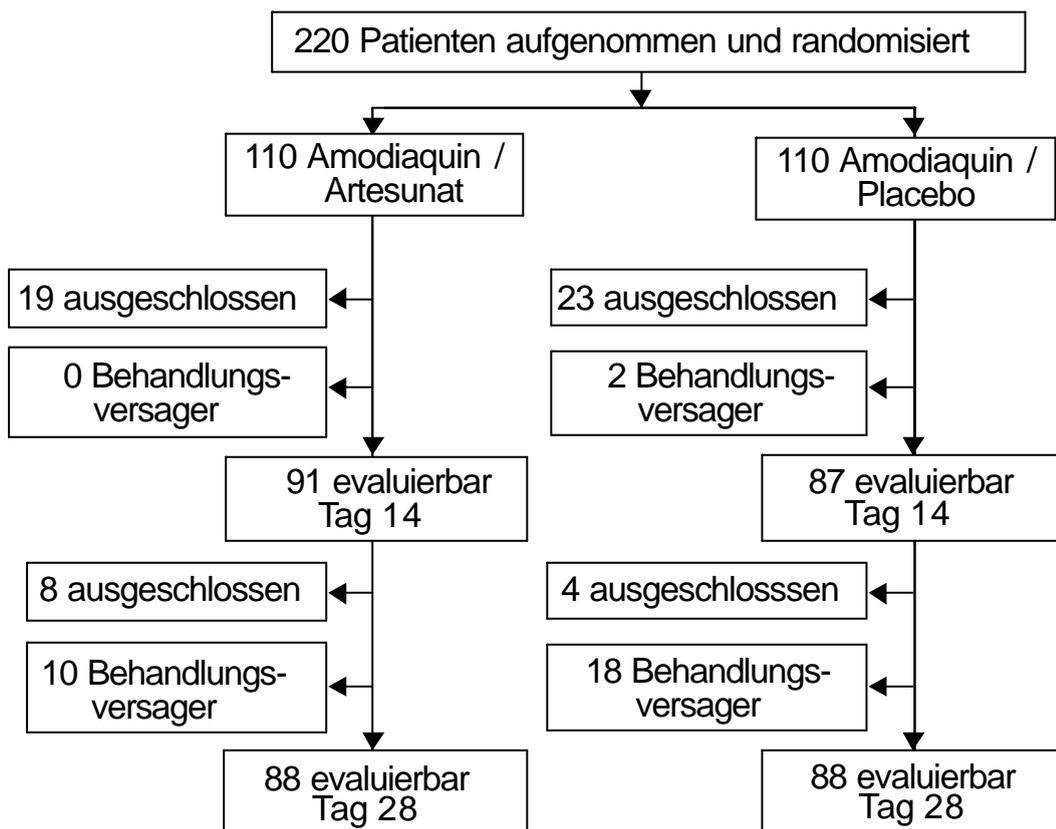


Abbildung 3: Studienprofil.

Die beiden Patientengruppen waren bei der Aufnahme in Bezug auf demographische, klinische und laborchemische Voraussetzungen bei der Aufnahme miteinander vergleichbar, wie Tabelle 1 zeigt.

	Amodiaquin/Artesuant (n= 110)	Amodiaquin/Placebo (n= 110)
<b>männlich/weiblich</b>	<b>57 /53</b>	<b>58 /52</b>
<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>5,5 (2,3)</b>	<b>6,2 (2,3)</b>
<b>Gewicht ( kg)</b>	<b>17,8 (5.1)</b>	<b>18,7 (5,1)</b>
<b>Körpertemperatur (C°)</b>	<b>37,5 (1,1)</b>	<b>37,7 (1,2)</b>
<b>Parasitenanzahl/µl</b>	<b>26 231 (2 000- 180 000)</b>	<b>20 296 ( 2 200- 196 530)</b>
<b>Gametozytenträgerrate</b>	<b>5.45 %</b>	<b>6,36%</b>
<b>Hämoglobin (g/l)</b>	<b>99 (17)</b>	<b>101 (16)</b>
<b>Hämatokrit (%)</b>	<b>32 (5,1)</b>	<b>32 (4,8)</b>
<b>Leukozyten (x 109 /l)</b>	<b>8,0 (3,0)</b>	<b>7,7 (3,0)</b>
<b>ALT (IU/L)</b>	<b>29 (25)</b>	<b>32 (62)</b>
<b>Creatinin (µmol/l)</b>	<b>24 (32)</b>	<b>38 (29)</b>
<b>Gesamt Bilirubin (µmol/l)</b>	<b>17 (15)</b>	<b>13 (11)</b>

*Tabelle 1: Demographische, klinische und laborchemische Charakteristika bei der Aufnahme.*

### 3.2 Per protocol-Analyse

Insgesamt konnten in der Tag 14 Auswertung 178 Patienten ausgewertet werden (entspricht 80,9%), 42 Patienten wurden ausgeschlossen. Darunter auch in beiden Gruppen jeweils 5 Patienten, die am Tag 14 nicht nachuntersucht werden konnten, jedoch in die Tag 28 Auswertung wieder einbezogen wurden.

Die Gründe für den Ausschluss von der per protocol-Analyse bis einschließlich Tag 14 waren:

- Eintrittskriterien nicht erfüllt:  
Amodiaquin/Artesunat = 3, Amodiaquin/Placebo = 1.
- Falsche Medikamentendosierung:  
Amodiaquin/Artesunat = 2, Amodiaquin/Placebo = 2.
- Studienmedikation nicht komplett eingenommen:  
Amodiaquin/Artesunat = 0, Amodiaquin/Placebo = 1.
- Patienten nicht nachuntersucht:  
Amodiaquin/Artesunat = 7, Amodiaquin/Placebo = 5.
- Nebenwirkungen:  
Amodiaquin/Artesunat = 2, Amodiaquin/Placebo = 5.
- Andere Malariamedikamente eingenommen:  
Amodiaquin/Artesunat = 0, Amodiaquin/Placebo = 4.
- An Tag 14 nicht bei der Nachuntersuchung:  
Amodiaquin/Artesunat = 5, Amodiaquin/Placebo = 5.

Am Tag 28, dem letzten Tag des Nachuntersuchungszeitraums, konnten noch 174 Patienten ausgewertet werden (79,1%). Insgesamt 44 Patienten von den ursprünglich 220 Patienten waren von der per protocol-Analyse

an diesem Tag ausgeschlossen.

Die Ausschlussgründe vom Tag 14 bis Tag 28 waren:

- Patienten nicht nachuntersucht:  
Amodiaquin/Artesunat = 6, Amodiaquin/Placebo = 4.
- Andere Malariamedikamente eingenommen:  
Amodiaquin/Artesunat = 2, Amodiaquin/Placebo = 0.

Die Heilungsrate am Tag 14 zeigte ein sehr gutes Ergebnis für die Kombination Amodiaquin/Artesunat, jedoch auch für die Amodiaquin/Placebo Gruppe. Alle Teilnehmer (100%) der Amodiaquin/Artesunat Gruppe waren von ihrer *Plasmodium falciparum* Infektion zu diesem Zeitpunkt geheilt worden.

Auch in der Amodiaquin/Placebo Gruppe waren die Ergebnisse gut. Hier waren 97,7% der evaluierten Patienten am Tag 14 geheilt.

Eine deutlicher Unterschied zwischen den beiden Therapiemöglichkeiten zeigte sich in der Tag 28 Auswertung (siehe Tabelle 2).

Die durch die PCR-Ergebnisse unkorrigierte Analyse ergab eine Heilungsrate am Tag 28 von 88,6 % (78 von 88 Patienten klinisch und parasitologisch geheilt) in der Amodiaquine/Artesunat Gruppe und von 77,3 % (68/88) in der Amodiaquin/Placebo Gruppe.

Dagegen in der PCR-korrigierten Analyse eine Heilungsrate am Tag 28 von 94,3 % (83 von 88 Patienten klinisch und parasitologisch geheilt) in der Amodiaquine/Artesunat Gruppe und von 85,2 % (75 von 88) in der Amodiaquin/Placebo Gruppe.

	Amodiaquin/ Artesunat	Amodiaquin/ Placebo	? (95% CI)	p
Heilungsrate Tag 14	91/ 91 (100%)	85/ 87 (97,7%)	2,3 % (- 5,7 bis 5,1)	0,15
Heilungsrate Tag 28 (nicht PCR korrigiert)	78/ 88 (88,6%)	68/ 88 (77,3%)	11,4% (0,4 bis 22,3)	0,043
Heilungsrate Tag 28 (PCR korrigiert)	83/ 88 (94,3%)	75/ 88 (85,2%)	9,1% (0,2 bis 17,9)	0,044

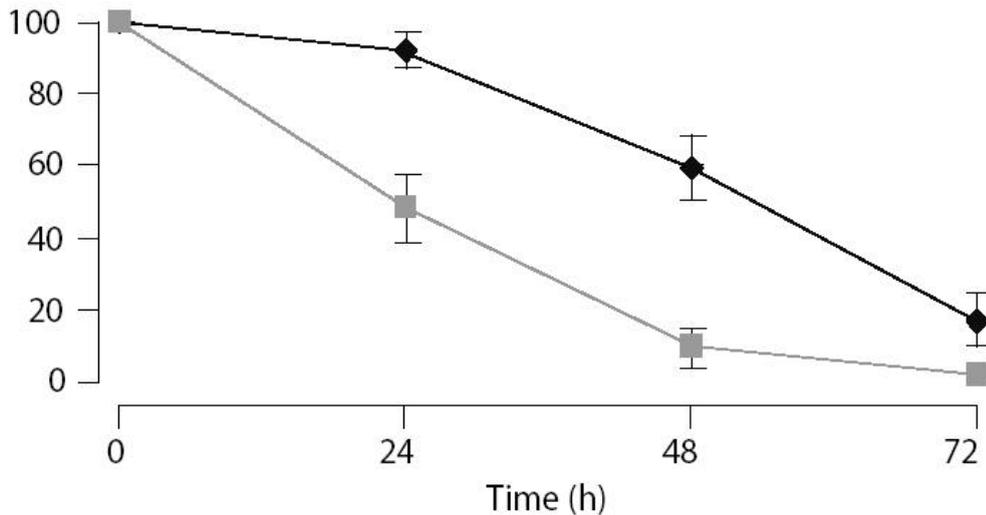
*Tabelle 2: Ergebnisse der per protocol-Analyse*

Somit nahm die Heilungsrate während der Untersuchung in beiden Gruppen ab ( $p=0,027$  für den Vergleich der Heilungsraten am Tag 14 und Tag 28 in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe und  $p=0,005$  für den Vergleich der Heilungsraten am Tag 14 und Tag 28 in der Amodiaquin/Placebo Gruppe).

Es zeigte sich jedoch, dass über einen längeren Zeitraum hinweg die Kombination von Amodiaquin mit Artesunat signifikant wirksamer als Amodiaquin alleine war ( $p=0,044$  für den Vergleich der Heilungsraten am Tag 28 zwischen der Amodiaquin/Artesunat und der Amodiaquin/Placebo Gruppen).

### **3.3 Parasitenelimination**

Aus der Abbildung 3 wird ersichtlich, dass an den Studientagen 1, 2, und 3 in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe im Vergleich zur Amodiaquin/Placebo Gruppe die Parasitenelimination wie erwartet deutlich schneller abnahm.



*Abbildung 3: Anteil der Kinder mit asexueller Plasmodium falciparum Parasitämie während der ersten drei Tage der Behandlung. (Die schwarze Kurve mit den Rauten zeigt den Verlauf in der Amodiaquin/Placebo Gruppe an, die graue Kurve mit den Quadraten den Verlauf in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe. Der vertikale Balken steht für die relative Anzahl der Kinder mit asexueller Parasitämie in Prozent, der horizontale Balken für die Zeit in Stunden bei 95% VI).*

Die Proportion an Patienten mit asexuellen Parasiten 24 Stunden nach Therapiebeginn betrug in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe 48% (95% Vertrauensbereich 38%-58%) und im Vergleich dazu in der Amodiaquin/Placebo Gruppe dagegen noch 92% (95% VI 85%- 97%). Dieser Unterschied konnte auch nach 48 und 72 Stunden festgestellt werden:

Nach 48 Stunden betrug die Proportion an Patienten mit asexuellen Parasiten in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe 8% (95% VI 3%- 15%), in der Amodiaquin/Placebo Gruppe 57% (95% VI 47%- 67%).

Nach 72 Stunden betrug die Proportion an Patienten mit asexuellen Parasiten in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe 0% (95% VI 0%- 38%), in der Amodiaquin/Placebo Gruppe 10% (95% VI 5%- 18%).

### 3.4 Entfieberung

Die Anzahl der Kinder, die an Tag 1 fieberfrei waren, war in beiden Gruppen sehr hoch, jedoch in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe mit 97% (103/106) zu Amodiaquin/Placebo 86% (90/105) signifikant höher als in der Amodiaquin/Placebo Gruppe ( $p= 0,003$ ).

### 3.5 Entwicklung von Gametozyten im Verlauf

Die Abbildung 4 gibt den Verlauf der Anzahl der Gametozytenträger in den beiden Studiengruppen wieder. Wie aus der Abbildung ersichtlich, ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Anzahl der Gametozytenträger im Nachuntersuchungszeitraum.

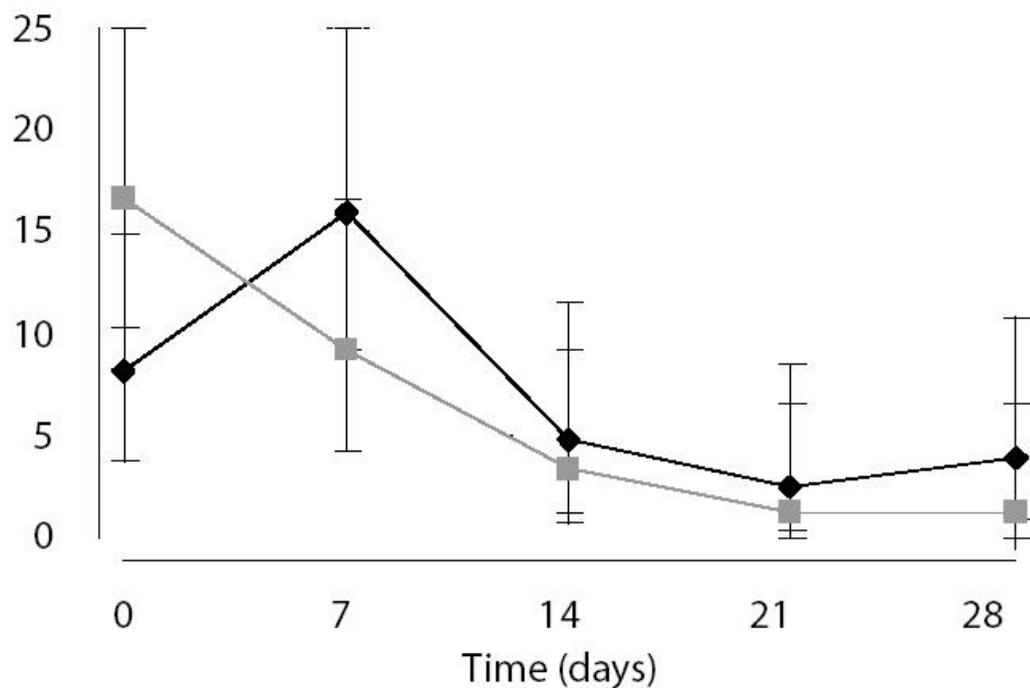


Abbildung 4: Anteil der Kinder mit nachweisbaren Gametozyten am Tag 0

*und im Verlauf des Nachuntersuchungszeitraums. (Die schwarze Kurve mit den Rauten zeigt den Verlauf in der Amodiaquin/Placebo Gruppe an, die graue Kurve mit den Quadraten den Verlauf in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe. Der horizontale Balken den Anteil der Kinder mit Gametozytämie in % bei 95% VI, der vertikale Balken die Zeit in Tagen).*

Es wurde außerdem untersucht, ob es unter einer der beiden Therapieoptionen zu einer Zunahme der Gametozytenträgerate unter den Patienten kam, bei denen an Tag 0 keine Gametozyten nachgewiesen werden konnten.

- Am Tag 0 hatten in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe 81 Patienten nachweisbare Gametozyten, an Tag 7 davon nur noch 3 Patienten.
- In der Amodiaquin/Placebo Gruppe waren es am Aufnahmetag 85 Patienten, an Tag 7 noch 8 Patienten.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte mit  $p= 0.139$  nicht als signifikant bewertet werden.

Bei den Patienten in den beiden Gruppen, welche an Tag 0 nachweisbare Gametozyten im Blut hatten und bei denen an Tag 7 noch immer Gametozyten nachgewiesen werden konnten, war jedoch ein signifikanter Unterschied feststellbar:

- In der Amodiaquin/Artesunat Gruppe hatten 17 Patienten an Tag 0 nachgewiesene Gametozyten. An Tag 7 waren davon bei 11 Patienten keine mehr vorhanden.
- In der Amodiaquin/Placebo Gruppe wurden an Tag 0 bei 9 Patienten Gametozyten nachgewiesen und an Tag 7 noch bei 7 der Patienten.

Dieser Unterschied war signifikant ( $p= 0,04$ ).

### 3.6 Hämoglobinkonzentrationen im Verlauf

Die Abbildung 5 gibt den Verlauf der Hämoglobinkonzentration im Untersuchungszeitraum wieder. Es kommt in beiden Gruppen an Tag 7 zu einem Abfall und dann zu einer Rekonvaleszenz.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede des Verlaufs der Hämoglobinkonzentration zwischen den beiden Behandlungsgruppen im Untersuchungszeitraum festgestellt ( $p=0.74$ ). Jedoch wurde festgestellt, wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, dass der Verlauf der Hämoglobinkonzentration innerhalb beider Studiengruppen signifikante Schwankungen aufwies ( $p<0.001$ ).

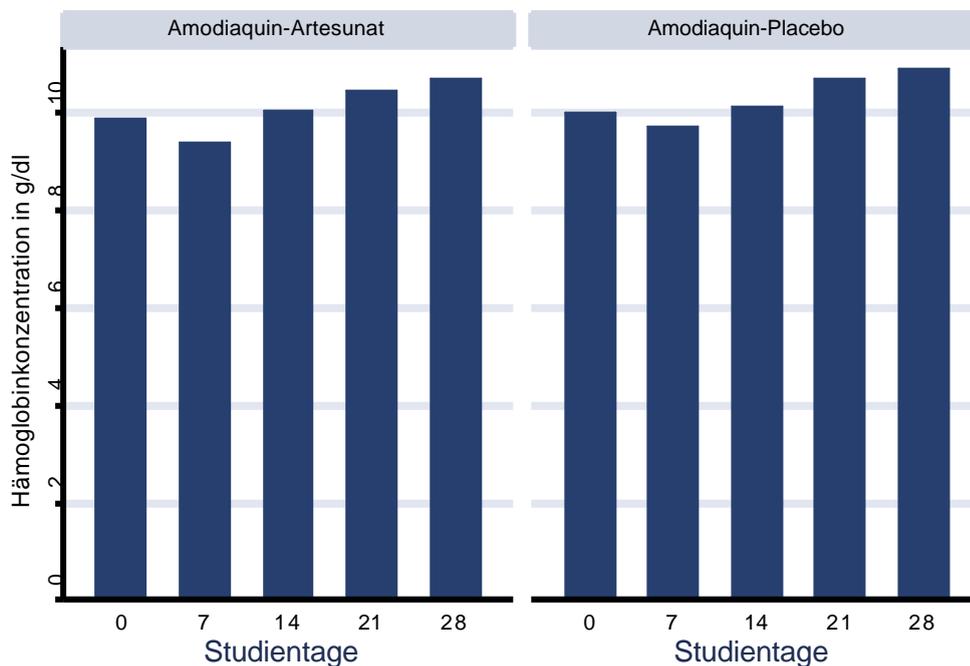


Abbildung 5: Durchschnittliche Hämoglobinkonzentration in g/dl an den Studientagen 0, 7, 14, 21 und 28.

### 3.7 Verträglichkeit der Studienmedikation

Die Kombination von Amodiaquin mit Artesunat als auch Amodiaquin mit Placebo wurden von den Studienteilnehmern gut vertragen.

Frühes, eventuell durch die Medikamente verursachtes Erbrechen, bei dem eine alternative Therapie angewandt werden musste, trat bei sieben Patienten auf. In der Amodiaquin/Artesunat-Gruppe bei zwei Patienten (jeweils ein Patient Tag 0 und Tag1) und in der Amodiaquin/Placebo-Gruppe bei fünf Patienten (Tag 0 zwei Patienten, Tag 1 zwei Patienten und Tag 2 zwei Patienten).

Im Nachuntersuchungszeitraum wurden in der Amodiaquin/Artesunat-Gruppe bei 62 Kindern und in der Amodiaquin/Placebo-Gruppe bei 65 Kindern Nebenwirkungen beobachtet. Die Tabelle 3 zeigt an, welche Symptome bei den Kindern in den beiden Gruppen dokumentiert wurden.

<b>Nebenwirkungen:</b>	<b>Patientenanzahl Amodiaquin/Artesunat- Gruppe:</b>	<b>Patientenanzahl Amodiaquin/Placebo- Gruppe:</b>	<b>Gesamt:</b>
<b>Erbrechen</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>41</b>
<b>Husten</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>33</b>
<b>Bauchschmerzen</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>32</b>
<b>Durchfall</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>23</b>
<b>Kopfschmerzen</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>17</b>
<b>Schläfrigkeit</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>14</b>
<b>Appetitlosigkeit</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>12</b>
<b>Halsschmerzen</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>9</b>
<b>Puritus</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>Fieber</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>Schwindel</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Splenomegalie</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Erkältung</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

<b>Wurmerkrankung</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Obstipation</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Konjunktivitis</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Dysurie</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Hepatomegalie</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Herpes labialis</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Asthma</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Hautabszess</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Intertrigo</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Übelkeit</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Mittelohrentzündung</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Krampfanfall</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Hautpilzerkrankung</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Fußschmerzen</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

*Tabelle 3: Nebenwirkungen in den beiden Gruppen*

Als schwere Nebenwirkungen wurden davon vier Ereignisse gewertet. Ein Kind mit einem Asthmaanfall am Tag 25, ein Kind mit rezidivierendem Erbrechen an Tag 0, ein Kind mit einem Krampfanfall am Tag 0 und ein Kind mit Gastroenteritis am Tag 6.

Bis auf das rezidivierende Erbrechen wurden diese Ereignisse jedoch als nicht im Zusammenhang mit der Studienmedikation stehend gewertet.

## 4 Diskussion

Da eine Impfung gegen die Malariaerreger noch nicht in greifbarer Nähe ist und sich gegen die gängigen Antimalariamedikamente in zunehmendem Maße Resistenzen entwickeln, muss nach neuen, geeigneten Mitteln gegen die Malaria gesucht werden. Selbst gegen Medikamente wie Mefloquin oder Atovaquon/Proguanil, welche aufgrund ihres hohen Preises für den großen Teil der Bevölkerung in Afrika ohnehin nicht erschwinglich sind, kennt man bereits Resistenzen<sup>7</sup>. Die immer neue Entwicklung von Malariamedikamenten ist jedoch mit einem großen Aufwand verbunden und unter anderem unter wirtschaftlichen Aspekten nicht reizvoll, da nur die kleine privilegierte Gruppe in den betroffenen Ländern oder aber Touristen aus reicheren Ländern die Möglichkeiten haben, die in ihrer Entwicklung recht teuren Medikamente zu bezahlen. Aus diesen Gründen wird bereits seit einiger Zeit unter anderem im Rahmen des WHO „Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)“ die Möglichkeit der Kombination von bereits bekannten und bewährten Medikamenten propagiert und gefördert. Die Idee, Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zu kombinieren, um so deren Effektivität und Wirkungsradius zu verbessern, ist bereits aus der HIV- und Tuberkulosetherapie bekannt und erfolgreich angewandt worden. Auch in der Therapie der Malaria werden seit jüngster Zeit einige Kombinationen erfolgreich angewendet (z.B. Artesunat/ Mefloquin in Südostasien und Atovaquon/Proguanil für die Chemoprophylaxe bei Reisenden).

Für eine effektive Malariabekämpfung in Afrika, die vor allem der dort lebenden Bevölkerung zugute kommen soll, sind hochwirksame Antimalariamedikamente nötig. Deren Wirkung sollte möglichst rasch eintreten, um die Gesamtparasitenmasse schnell zu eliminieren. Sie müssen gut verträglich sein, dies auch im Sinne einer sich dadurch ergebenden guten Compliance. Neben einer einfachen

Verabreichungsform sollten sie erschwinglich, also sehr preisgünstig sein. Weitere erstrebenswerte Punkte sind eine Verminderung der Übertragungen und eine Eindämmung der Resistenzentwicklung.

Artemisinderivate scheinen alle diese Anforderungen zu erfüllen. Daher werden zur Zeit mehrere Medikamentenkombinationen mit Artesunat als einem Bestandteil in afrikanischen Ländern untersucht, um so eine neue Therapiemöglichkeit zur Bekämpfung der Malaria zu finden.

In dieser Studie wurde die Kombination von Artesunat mit Amodiaquin bei Kindern in Lambaréné, Gabun untersucht. Diese Kombination scheint für Gabun geeignet, da neben der bereits bestehenden Chloroquinresistenz die Wirksamkeit von Amodiaquin durch beginnende Resistenzentwicklung in Frage gestellt wurde. Durch die Kombinierung soll somit auch der Resistenzentwicklung einer der beiden Komponenten entgegen gewirkt werden.

Für die Studie wurde ein Protokoll ausgearbeitet, welches auch den Vergleich mit Studien in den Zentren anderer afrikanischer Länder erlauben würde.

Die gesammelten Patientendaten wurden entsprechend den vor dem Studienbeginn definierten Zielen ausgewertet.

Primäres Ziel war die Untersuchung der Parasitenelimination am Endtag 28 der Studie und somit die erfolgreiche Behandlung der Patienten. Zusätzlich wurde als primäres Ziel die Sicherheit und Verträglichkeit durch Anamnese, klinische Untersuchung und regelmäßige Bestimmung der Laborparameter im Verlauf untersucht.

Als sekundäre Ziele sollte die Fieber- und Parasitenelimination im Verlauf der ersten 72 h untersucht werden, die Entwicklung der Gametozytenrate bei den Nachuntersuchungsterminen und der Verlauf der Hämoglobinkonzentration bei den Teilnehmern in den beiden Gruppen.

In der per protocol-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Amodiaquin mit Artesunat sehr wirksam ist. Die Heilungsrate am Tag 14 war 100% mit 91 geheilten von 91 evaluierten Patienten, jedoch zeigte auch die Heilungsrate in der Amodiaquin/Placebo Gruppe mit 85 geheilten von 87 evaluierten Patienten bei 97,7% ein recht gutes Ergebnis.

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen waren dann aber am Tag 28 feststellbar. Die PCR-korrigierten Ergebnisse zeigten mit 83 geheilten Patienten, von den zu diesem Zeitpunkt noch 88 in die Evaluation aufgenommenen Patienten, ein signifikant besseres Ergebnis in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe. Es konnten somit 94,3% durch die Kombination erfolgreich therapiert werden. In der Amodiaquin/Placebo Gruppe waren es dagegen nur noch 75 von 88 evaluierten Patienten, also nur 85,2%.

Aus anderen Studien im gleichen Studienzentrum ist bekannt, dass die Heilungsrate am Tag 28 eine wesentlich sensitivere Messung der tatsächlichen radikalen Elimination der asexuellen Parasiten ermöglicht<sup>47</sup>.

Auch war der Rückgang der Parasitämie in der Amodiaquin/Artesunat Gruppe in den ersten 72 Stunden deutlich schneller als in der Amodiaquin/Placebo Gruppe.

Die Kombination eines schnellen und sehr wirksamen Medikamentes mit einem Medikament, welches an einer anderen Stelle im Zyklus des Parasiten angreift, ist somit unter dem Aspekt der Wirksamkeit Erfolg versprechend. Ein in Kauf zu nehmender Nachteil ist die nicht optimale pharmakinetische Übereinstimmung von Artesunat (Plasmahalbwertszeit von <1 h) und Amodiaquin (Plasmahalbwertszeit von 1-3 Wochen<sup>48</sup>).

Beide Studienmedikationen, Amodiaquin/Artesunat als auch Amodiaquin/Placebo wurden gut vertragen. Frühzeitiges Erbrechen der Medikation mit darauf folgender erneuter Gabe der Medikation war nur bei sieben Patienten vorgekommen, zwei davon waren aus der Amodiaquin/Artesunat Gruppe. Andere Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit,

Appetitlosigkeit, Bauchschmerzen, Kopfschmerzen und Durchfall kam in den beiden Gruppen in ungefähr gleicher Häufigkeit vor.

Keine der beiden Therapiemöglichkeiten zeigt in Bezug auf Verringerung der Nebenwirkungen einen Vorteil.

Bei den vier Kindern, bei denen eine schwere Nebenwirkung dokumentiert wurde, (Asthma Anfall, rezidivierendes Erbrechen, Krampfanfall und Gastroenteritis), wurde nur das rezidivierende Erbrechen als eventuell in Zusammenhang mit der Studienmedikation stehend gewertet.

Die Anzahl der Kinder, die am Tag 1 bereits fieberfrei waren, war in beiden Gruppen sehr hoch. In der Amodiaquin/Artesunat Gruppe war die rasche Entfieberung jedoch mit 97% zu 86% in der Amodiaquin/Placebo Gruppe signifikant besser.

In der Studie konnte durch die Kombinationstherapie in Bezug auf die Verträglichkeit bei der Entfieberung ein Vorteil gesehen werden. Mit der Kombination wird sich ein Patient vermutlich früher subjektiv wohl fühlen.

In Bezug auf eine Reduktion der Gametozytenrate und somit auf das Eindämmen der Übertragungsrate zeigte die Kombination in Lambaréné nur leicht bessere Ergebnisse. Diese zeigten sich jedoch in der Auswertung als nicht signifikant.

Außerdem sollte ausgeschlossen werden, dass eine der beiden Therapieoptionen zu einer Gametozyteninduktion führt. Es wurden die beiden Gruppen miteinander verglichen:

- 1.) Auf den Anteil an Patienten die an Tag 0 Gametozyten frei waren, und an Tag 7 zu Gametozytenträgern geworden waren.
- 2.) Auf den Anteil an Patienten die an Tag 0 Gametozytenträgern waren und an Tag 7 Gametozyten frei waren.

Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Patienten, bei denen an Tag 0 keine Gametozyten nachgewiesen werden konnten, und die an Tag 7 zu Gametozytenträgern geworden waren, war

nicht signifikant.

Dagegen war ein signifikanter Unterschied feststellbar im Vergleich der beiden Gruppen in Bezug auf die Patienten, die an Tag 0 Gametozytenträger waren und am Tag 7 gametozytenfrei waren. Hier zeigte die Gruppe mit der Amodiaquin/Artesunat Kombination bessere Ergebnisse, die Kombination hatte eine Reduktion der Gametozytenträgerrate bewirkt. Auch ein Gametozyten induzierender Effekt einer der beiden Therapieoptionen wurde ausgeschlossen.

In Bezug auf die Laborparameter wurde der Hämoglobinkonzentration eine besondere Bedeutung beigemessen. Durch die laufende Auseinandersetzung mit verschiedenen Parasiten sind die Hämoglobinwerte der Kinder in der Gegend um Lambaréné im Vergleich zu Kindern in derselben Altersklasse zum Beispiel in Europa im Durchschnitt niedriger. Vor allem bei der Infektion mit Plasmodien ist aufgrund des Aktionsmodus des Parasiten mit einem Abfall des Hämoglobinwertes zu rechnen.

Es sollte also herausgefunden werden, ob eine der beiden Therapien eine verstärkte Hämolyse induziert. Außerdem wurde der hämatologische Behandlungserfolg im Sinne der Wiederherstellung der Hämoglobinkonzentration auf einen normalen Wert untersucht.

Bei Betrachtung der Ergebnisse an Tag 28 scheint die Therapie mit Amodiaquin/Placebo zu einem geringeren Abfall des Hämoglobinwertes zu führen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Therapieversager aus der Amodiaquin/Placebo Gruppe in der Tag 28 Auswertung nicht mit einbezogen wurden.

Aus diesem Grunde wurde die Hämoglobinkonzentration im zeitlichen Verlauf und zusätzlich im Vergleich der beiden Gruppen miteinander betrachtet.

Nur die Zeit als Variable nahm Einfluss auf die Hämoglobinkonzentration. In beiden Gruppen wurde an Tag 7 ein Abfall der

Hämoglobinkonzentration deutlich, welcher im weiteren Verlauf jedoch wieder anstieg.

Auf die Hämoglobinkonzentration hat die jeweilige Therapieoption in den beiden untersuchten Studiengruppen also keinen Einfluss.

Erfahrungen mit anderen auf Artesunat basierenden Kombinationen gibt es aus Afrika und Asien. Parasitologische Heilungsraten, teilweise wie in unserer Studie ebenfalls PCR kontrolliert, lagen bei afrikanischen Kindern (Artesunat/Sulfadoxin-Pyrimethamin, Artesunat/Lumefantrin), bei thailändischen Kindern und Erwachsenen (Artesunat/Mefloquin, Artesunat/Lumefantrin) und bei indischen Erwachsenen (Artemether/Lumefantrin) im Durchschnitt zwischen 93 und 99%. In Tansania war die Tag 14 Heilungsrate bei 110 Kindern zwischen 1 - 5 Jahren allerdings mit 87% eher gering<sup>8, 49, 50, 51, 52, 53</sup>.

Auch vor diesem Hintergrund spricht die Tag 28 Heilungsrate mit 94,3 % für die in der Studie verwendete Kombination.

Die Therapie der Malaria tropica bei Kindern mit der Kombination von Artesunat mit Amodiaquin ist somit für Gabun eine gut geeignete Alternative für das in Gabun nicht mehr wirksame Chloroquin<sup>54</sup>.

Ebenfalls für andere afrikanische Länder, welche nach einer neuen Standardmedikation gegen die Malaria tropica suchen, könnte die Kombination von Artesunat mit Amodiaquin eine gute Alternative sein. Grundlegende Voraussetzungen dafür sind die gute Disponibilität des Medikamentes, geringe Kosten und vor allem die lokale Wirksamkeit.

Bevor es indessen möglich ist, eine bestimmte Kombination für den ganzen Kontinent zu propagieren, sind weitere Studien in andern Regionen Afrikas nötig.

Unsere Studie zeigte auch, dass in weiteren Studien andere Antimalariamedikamente mit Artesunat kombiniert werden sollten, um so eventuell eine Kombination zu finden, welche zum Beispiel auch in Bezug auf die Gametozytenentwicklung noch bessere Ergebnisse zeigt.

Die Studie bekräftigt den Ansatz, Artesunat mit seiner schnellen Wirksamkeit und guten Effizienz in Bezug auf die klinische Heilung und die Parasitenelimination auch weiterhin als Kombinationspartner einzusetzen.

## 5 Literatur

- <sup>1</sup> World Health Organisation 1998. Malaria. Fact Sheet No.94.
- <sup>2</sup> Snow, R. W., Craig, M., Deichmann, U., Marsh, K., 1999. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. Bulletin of the World Health Organisation, Volume 77.
- <sup>3</sup> Trape, J.- F., Pison, G., Preziosi, M.- P., Enel, C., du Lou, A. D., Delaunay, V., Samb, B., Lagarde, E., Molez, J.-F., Simondon, F., 1998. Impact of chloroquin resistance on malaria mortality. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Volume 321.
- <sup>4</sup> Ogutu, B. R., Smoak, B. L., Nduati R. W., Mbori- Ngacha, D. A., Mwathe, F., Shangs, G. D., 2000. The efficacy of pyrimethamine- sulfadoxine in the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Kenyan children. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 94.
- <sup>5</sup> White, N. J., Olliaro, P. L., 1996. Strategies for the Prevention of Antimalarial Drugs Resistance: Rationale for Combination Chemotherapy for Malaria. Parasitologie Today. Vol. 12.
- <sup>6</sup> White, N. J., 1999. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. Parasitologia Vol. 41.
- <sup>7</sup> Nosten, F., van Vugt, M., Price, R., Luxemburger, C., Thway, K. L., Brockman, A., McGready, R., Kuile, F., Looareesuwan, S., White, N. J., 2000. Effects of artesunate- mefloquine combination on incidence of Plasmodium falciparum malaria in western Thailand: a prospective study. The Lancet Vol. 356.
- <sup>8</sup> von Seidlein, L., Milligan, P., Pinder, M., Bojang, K., Anyalebechi, C., Gosling, R., Coleman, R., Ude, J., Sadiq, A., Duraisingh, M., Warhurst, D., Allouche, A., Targett, G., McAdam, K., Greenwood, B., Walraven, G.,

Olliaro, P., Doherty, T., 2000. Efficacy of artesunate plus pyrimethamine-sulfadoxine for uncomplicated malaria in Gambian children: a double-blind, randomised, controlled trial. Vol. 355. The Lancet.

<sup>9</sup> Olliaro, P., Nevill, C., LeBras, G., Ringwald, P., Mussano, P., Gardner, P., Brasseur, P., 1996. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. Vol. 348. The Lancet.

<sup>10</sup> Luzzi, G. A., Peto, T. E., 1993. Adverse effects of antimalarials. An update. Drug Safety. Vol. 8.

<sup>11</sup> Barnwell, J. W., Galinski, M.R., 1998. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes; Chapter 7: 93-112, in: Sherman, I.W.: Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection .ASM Press, Washington, D.C.

<sup>12</sup> MacDonald 1957. The epidemiology and control of malaria. 1. Aufl., Oxford University press, London.

<sup>13</sup> Aikawa, M., Iseki, M., Barnwell, J.W., Taylor, D., Oo, M.M., Howard, R.J., 1990 The pathology of human cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg 43:30-7.1

<sup>14</sup> Mehta, K.S., Halankar, A.R., Makawana, P.D., Torane, P.P., Satija, P.S., Shav, V.B., 2001. Severe acute renal failure in malaria. J Postgrad Med 47(1):24-26.

<sup>15</sup> Prakash, J., Gupta, A., Kumar, O., Rout, S.B., Malhotra, V., Srivastava, P.K., 1996. Acute renal failure in falciparum malaria - increasing prevalence in some areas of India - a need for awareness. Nephrol Dial Transplant 11(12):2412-6.

<sup>16</sup> Waller, D., Krishna, S., Crawley, J., Miller, K., Noston, F., Chapman, D., ter Kuile, F.O., Craddock, C., Berry, C., Holloway, P.A., Brewster, D., Greenwood, B.M., White, N.J., 1995. Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. Clin Infect Dis 21(3):577-87.

<sup>17</sup> Chishti, S.A., Duidang, L., Kasar, A., Raman, M., Luikham, A., 2000. Severe falciparum malaria complications in Ukhrul, Manipur. J Indian Med

Assoc 98(10):619-622.

<sup>18</sup> Sowunmi, A., Akindele, J.A., Balogun, M.A., 1995. Leucocyte counts in falciparum malaria in African children from an endemic area. *Afr J Med Med Sci* 24(2):145-149.

<sup>19</sup> El-Shoura, S.M., 1993. Falciparum malaria in naturally infected human patients: IV - Ultrastructural changes in peripheral white blood cells. *Ann Parasitol Hum Com* 68(4):169-175.

<sup>20</sup> Enwere, G., Van Hensbroeck, M.B., Adegbola, R., Palmer, A., Onyiora, E., Weber, M., Greenwood, B., 1998. Bacteraemia in cerebral malaria. *Ann Trop Paediatr* 18(4):275-278.

<sup>21</sup> Abdalla, S.H., 1988. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. *Ann Trop Paediatr* 8(4):250-258.

<sup>22</sup> Shanks, G.D., Wilairatanaporn, C., 1992. Eosinophilic response to falciparum malaria infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23(4):795-797.

<sup>23</sup> Duvic, C., Rabar, D., Didelot, F., Nedelec, G., 2000. Acute renal failure during severe malaria: pathophysiology and therapeutic management. Apropos of 2 cases. *Med Trop* 60(3):267-70.

<sup>24</sup> Grau, G.E., Taylor, T.E., Molyneux, M.E., Wirima, J.J., Vassalli, P., Hommel, M., Lambert, P.H., 1989. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 320(24):1586-91.

<sup>25</sup> World Health Organization: Warrell, D.A., Molyneux, M.E., Beales, P.F., 1990. Severe and Complicated Malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84, Suppl. 2(1990) 165.

<sup>26</sup> Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P., Peshu, N., et al. 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med* 332(21):1399-

404.

<sup>27</sup> Agbenyega, T., Angus, B.J., Bedu-Addo, G., Baffoe-Bonnie, B., Guyton, T., Stacpoole, P.W., Krishna, S., 2000. Glucose and lactate kinetics in children with severe malaria. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1569-76.

<sup>28</sup> Nguyen, P.H., Day, N., Pram, T.D., Ferguson, D.J., White, N.J., 1995. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89(2):200-4.

<sup>29</sup> Metzger, W.G., Mordmuller, B.G., Kremsner, P.G., 1995. Malaria pigment in leucocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89(6):637-8.

<sup>30</sup> Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Koemer, H. K.; Schäfer- Korting, M., 2001. Chemotherapie von Protozoenerkrankungen, 857-865 in *Arzneimittelwirkungen*; 8. Aufl., WVG, Stuttgart.

<sup>31</sup> Fichera, M. E., Roos, D. S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* ;390(6658):407-9.

<sup>32</sup> Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., Van Goethem, I. D., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A., Krishna, S., 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*; 424(6951):957-61.

<sup>33</sup> Mechnick, S. R., 1998. Artemisinin antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Med Trop (Mars)*; 58 (suppl 3): 13-17.

<sup>34</sup> Baskshi, R., Hermeling- Fritz, I., Gathmann, I., Alteri, E., 2000. An integrated assessment of the clinical safety of artemether- lumefantrine: a new oral fixed- dose combination antimalarial drug. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 94: 419- 24.

<sup>35</sup> Whinstanly, P. 2001. *The Lancet Infectious Diseases* ;1, pp. 242-50.

<sup>36</sup> O'Neill, P.M., Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward S.A., Park, B.K., 1998. 4-Aminoquinolines- past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol Ther*; 675: 521-29.

- <sup>37</sup> Sylla, E.H., Kun, J.F., Kremsner, P.G., 2000. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94:652-6.
- <sup>38</sup> Wildling, E., Winkler, S., Kremsner, P.G., Brandts, C., Jenne, L., Wernsdorfer, W.H., 1995. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogooué, Gabon. *Trop Med Parasitol* 46:77-82.
- <sup>39</sup> Winkler, S., Brandts, C., Wernsdorfer, W.H., Graninger, W., Bienzle, U., Kremsner, P.G., 1994. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Gabon. Activity correlations between various antimalarials. *Trop Med Parasitol.*45:214-8.
- <sup>40</sup> Warrell, D. A., Molyneux, M. E., Beales, P. F., 1990. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84, pp. 1-65.
- <sup>41</sup> World Health Organization, Severe falciparum malaria. 2000. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, pp. 1-90.
- <sup>42</sup> Edards, R., Jeffrey, K. A., 2000. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet* Vol. 356, Issue 9237, pp.1255-1259.
- <sup>43</sup> Kremsner, P.G., Zotter, G.M., Feldmeier, H., Graninger, W., Rocha, R.M., Wiedermann, G. 1988. A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil. *J. Infect. Dis.* 158, 1368-71.
- <sup>44</sup> Planche, T., Krishna, S., Kombila, M., Engel, K., Faucher, JF., Ngou-Milama, E., Kremsner, P.G., 2001. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65:599-602.
- <sup>45</sup> Kun, J.F., Schmidt-Ott, R.J., Lehman, L.G., Lell, B., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Kremsner, P.G., 1998. Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:11-4.

- <sup>46</sup> Chan, S. F., Zhang Z., 1999. Test-based exact confidence intervals for the difference of two binomial proportions. *Biometrics* 55, pp. 1202-1209.
- <sup>47</sup> Borrmann, S., Adegnika, A. A., Missinou, M. A., Binder, R. K., Issifou, S., Schindler, A., Matsiegui, P.B., Kun, J.F., Krishna, S., Lell, B., Kremsner, P. G. 2003. Short-course artesunate treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Gabon. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(3):901-4.
- <sup>48</sup> Krishna, S., White, N. J. 1996. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 30(4):263-99.
- <sup>49</sup> von Seidlein, I., Bojang, K., Jones, P. et al., 1998. A randomized controlled trial of artemether/benflumetol, a new antimalarial and pyrimethamine/sulfadoxine in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg* 58, pp. 638-644.
- <sup>50</sup> von Seidlein, L., Jaffar, S., Pinder, M. et al., 1997. Treatment of African children with uncomplicated *falciparum* malaria with a new antimalarial drug, CGP 56697. *J Infect Dis* 176 , pp. 1113-1116.
- <sup>51</sup> van Vugt, M., Wilairatana, P., Gemperli, B. et al., 1999. Efficacy of six doses of artemether-lumefantrine (benflumetol) in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 60, pp. 936-942.
- <sup>52</sup> Kshirsagar N. A., Gogtay, N. J., Moorthy, N. S. et al., 2000. A randomized, double-blind, parallel-group, comparative safety, and efficacy trial of oral co-artemether versus oral chloroquine in the treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in adults in India. *Am J Trop Med Hyg* 62, pp. 402-408.
- <sup>53</sup> Hatz, C., Abdulla, S., Mull, R. et al., 1998. Efficacy and safety of CGP 56697 (artemether and benflumetol) compared with chloroquine to treat acute *falciparum* malaria in Tanzanian children aged 1-5 years. *Trop Med Int Health* 3, pp. 498-504.
- <sup>54</sup> Binder, R.K., Borrmann, S., Adegnika, A.A., Missinou, M. A., Kremsner, P. G., Kun, J. F. 2002. Polymorphisms in the parasite genes for *pfcr* and

pfmdr-1 as molecular markers for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon. *Parasitol Res.*88(5):475-6.

## 6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter. G. Kremsner für die Ermöglichung der Dissertation und die sehr gute Betreuung.

Ebenfalls besonderen Dank an Herrn Dr. Steffen Borrmann für die Betreuung und Unterstützung während der Zeit in Gabun und bei der Auswertung der Daten in Tübingen.

Ich danke all meinen Kollegen in Lambaréné für die freundschaftliche Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung, insbesondere Oliver Dangelmayer, Dr. Jean- Francois Faucher, Katja Engel, Thierry Bagaphou, Dr. Tim Planch, Pierre-Blaise Matsiegui, Dr. Michell A. Missinou und Dr. Ronald Binder.

Ein besonderer Dank den Kindern aus Lambaréné und deren Eltern, die an dieser Studie teilgenommen haben.

Ich danke meinen Eltern, Monique Rezbach-Candolfi und Dr. Peter Rezbach für die immer große Unterstützung während der Doktorarbeit und im ganzen Studium.

## 7 Lebenslauf

- Geburtstag: 25.06.1975
- Geburtsort: Weingarten
- Schulbildung: Albert Einstein Gymnasium in Ravensburg, Abitur 1995
- Zivildienst: 1995 - 1996, Rettungssanitäter im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Ravensburg
- Studium: Beginn 1996 an der Eberhards Karl Universität zu Tübingen
- 1999 Medizinische Vorprüfung
- 1999- 2000 Forschungsaufenthalt in Lambaréné, Gabun, zum Zwecke der Promotion
- 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2002- 2003 Praktisches Jahr, erster Teil in La Paz, Bolivien, zweiter Teil in Bern, Schweiz, dritter Teil in Stuttgart, Deutschland
- Abschluss des Medizinstudiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 27.11.2003 in Stuttgart