

Aus dem Institut für Tropenmedizin, Tübingen

Abteilung Humanparasitologie

Leiter: Professor Dr. P. Kremsner

EINE RANDOMISIERTE
DOPPELBLINDSTUDIE ZUR WIRKSAMKEIT
UND VERTRÄGLICHKEIT DER
MALARIACHEMOPROPHYLAXE MIT
ATOVAQUON-PROGUANIL UND IHR
EINFLUSS AUF DIE IMMUNOGENITÄT DER
IMPFUNGEN MIT DEN ATTENUIERTEN
ORALEN LEBENDIMPFUNGEN GEGEN
CHOLERA (CVD103-HGR) UND TYPHUS
(TY21A)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von Holger Gruß

aus Dresden

-2003-

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Kremsner

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

ABSTRACT

A double-blind study was conducted to measure the impact of atovaquone and proguanil hydrochloride (A-P) malaria prophylaxis on the immunogenicity of oral attenuated vaccines against typhoid fever and cholera, *Salmonella typhi* (*S. typhi*) Ty21a and *Vibrio cholerae* (*V.cholerae*) CVD103-HgR, respectively. 330 schoolchildren who lived in an area hyperendemic for malaria were stratified by weight and randomly assigned A-P or placebo once daily for 12 weeks. All 330 children received initial curative treatment with artesunate before the start of chemosuppression; oral attenuated vaccines were administered on the third week of chemosuppression. Immunogenicity was assessed on the seventh week of chemosuppression by measuring vibriocidal antibody and anti-*S. typhi* IgG and IgA lipopolysaccharide (LPS) antibody titers.

Two hundred ninety four children were included in the per-protocol population: one of the 150 children in the A-P group and 31 of 144 children in the placebo group had positive smears during chemosuppression, yielding a protective efficacy of 97% (95% CI 79-100%) with A-P. The two treatment groups did not differ significantly with respect to change in antibody titers after vaccination ($p=0.95$ for anti-*S. typhi* IgG antibodies, $p=0.07$ for anti-*S. typhi* IgA antibodies and $p=0.63$ for vibriocidal antibodies). In both groups, mean baseline vibriocidal antibody titers were high (143 in the placebo group and 138 in the A-P group) and response rates to *V. cholerae* CVD103-HgR vaccine were low (22% in the placebo group and 27% in the A-P group). Low response rates to CVD103-HgR are related to high baseline vibriocidal antibody titers.

A-P combination is highly effective for malaria prophylaxis and does not interfere with the *in vivo* immunogenicity of CVD103-HgR and Ty21a vaccines. The A-P combination could therefore be simultaneously administered with the two vaccines.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Allgemeines	5
1.1	Epidemiologie der Malaria	7
1.1.1.	Gabun	7
1.2	Epidemiologische Maßdaten	8
1.2.1	Die Übertragung der Malaria	8
1.2.2	Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der Malaria	9
1.3	Die Malaria	10
1.3.1	Die einzelnen Plasmodienspezies	10
1.3.2	Pathophysiologie und Klinik	11
1.4	Therapie und Medikationen	12
1.4.1	Substanzklassen	12
1.4.2	Resistenzprobleme	13
1.5	Das Studienmedikament	18
1.5.1	Atovaquon	18
1.5.2	Proguanil	18
1.5.3	Das Kombinationspräparat Atovaquon-Proguanil	19
1.6	Typhus	22
1.6.1	Allgemeines und Epidemiologie	22
1.6.2	Klinik, Serologie und Therapie	23
1.7	Cholera	23
1.7.1	Allgemeines und Epidemiologie	23
1.7.2	Pathophysiologie und Klinik	23
1.7.3	Die Impfstoffe CVD103-HgR und Ty21a	24
1.8	Wirksamkeit und Verträglichkeit von Ty21a und CVD-103HgR	25
1.9	Interaktionen von Ty21a und CVD-103HgR und Antimalariamedikamenten	25
2	Methoden und Durchführung	26
2.1	Ziel der Studie	26
2.2	Angestrebte Ergebnisse der Studie	26
2.3	Aufbau der Studie	27
2.4	Zusammensetzung der Probanden	27
2.5	Inklusionskriterien	27
2.6	Exklusionskriterien	28
2.7	Behandlung während der Studie	29

2.7.1	Studienmedikamente und Dosierungen	29
2.8	Diagnostische Methoden	31
2.8.1	Malariadiagnostik	31
2.8.2	Bestimmung der Antikörper auf Ty 21a und CVD103-HgR	31
2.9	Untersuchungen und Evaluierungen der Studienziele	31
2.9.1	Zeitplan	31
2.9.2	Demographie	35
2.9.3	Wirksamkeit	35
2.9.4	Typhus und- Choleraantikörpertiteruntersuchung	36
2.9.5	Verträglichkeit	36
2.10	Frühzeitige Beendigung der Studie	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Ergebnisse der Untersuchungen auf Wirksamkeit und Verträglichkeit	38
3.2	Interaktionen mit oralen Lebendimpfungen Ty21a und CVD103-HgR	43
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung	57

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte, vor allem bei:

Herrn **Prof. Dr. Peter G. Kremsner** für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung in allen fachlichen Bereichen,

Herrn **Dr. Jean-Francois Faucher** für die professionelle Hilfe bei der Organisation, Leitung und Durchführung der Studie,

Meinen Kollegen **Dr. Michel A. Missinou, Dr. Ronald Binder, Rajko Neubaer, Pierre-Blaise Matsiegui und Dr. Bertrand Lell** für sämtliche von Ihnen geleistete Hilfe

Marcel Nkeyi, Anselme Nzengue, und Jean Mbembé für die ihren außerordentlichen Einsatz als technische Assistenten,

Den **18 Hilfskräften** für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Durchführung der Studie

Dem **Direktor und dem gesamten Personal der Lalala-Grundschule** in Lambaréné für Ihre freundliche Erlaubnis zur Durchführung der Studie

Meinen Eltern, und insbesondere bei **meiner Mutter**, die mir viel Vertrauen und Unterstützung schenkte,

Und nicht zuletzt bei **Murielle und Nancy** für die Bereitschaft, viele Entbehrungen in Kauf zu nehmen, aber auch für viel seelische und moralische Unterstützung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
A-P	Atovaquon – Proguanil
β -HCG	β -Humanes Choriongonadotropin
BE	Blutentnahme
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribnucleidacid
DT	Dicker Tropfen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
PFCRT	Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter
PFMDR	Plasmodium falciparum Multi Drug Resistance
S.typhi	Salmonella typhi
UDP	Uracildiphosphat
UW	Unerwünschte Wirkungen
V. cholerae	Vibrio cholerae
WHO	World Health Organisation

1 Allgemeines

Man schätzt, dass etwa 2.3 Milliarden Menschen in malariaendemischen Gebieten wohnen, das sind 41% der Weltbevölkerung. Die Inzidenz der Malaria bewegt sich jährlich um die 300-500 Millionen Fälle.

1,5 – 2,7 Millionen Menschen sterben pro Jahr an dieser Infektionskrankheit, wobei sich darunter ca. 1 Million Kinder unter 5 Jahren befinden, was die Malaria in den betroffenen Gebieten zu einem Hauptproblem der öffentlichen Gesundheitsfürsorge macht. Die Länder des tropischen Afrika tragen mit über 90% zu dieser weltweiten Inzidenz bei.

In diesen Gebieten trägt die Malaria tropica, die durch die Spezies *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird, mit ca. 89% den Hauptanteil aller Malariafälle [1].

Die schwer bzw. tödlich verlaufenden Formen der Malaria tropica betreffen vorzugsweise folgende Personengruppen:

- Kinder zwischen 4 Monaten und 5 Jahren: diese in einem Endemiegebiet lebende Gruppe sind wiederholten Krankheitsmanifestationen ausgesetzt, was eine Immunstimulation mit nachfolgender Antikörperproduktion hervorruft.
Diese partielle Immunität dauert in der Regel ca. 12 Monate.
- Aus nichtendemischen Gebieten einreisende Personen ohne Immunität

Als häufigste Komplikation der Malaria tropica in der Republik Gabun findet man neurologische Krankheitsmanifestationen mit Fieberkonvulsionen und schwere Anämien mit einem Hämoglobinwert von unter 5 g/dl. Der Häufigkeit des Auftretens dieser schweren Verlaufsformen mit beschriebener Anämie kann durch regelmäßige Chemoprophylaxe vorgebeugt werden [2].

Im Laufe der letzten 20 Jahre hat man eine zunehmende Resistenzentwicklung von *Plasmodium falciparum* gegen gängige Antimalariamedikamente beobachtet, insbesondere gegen Chloroquin, das über lange Zeit das Medikament der Wahl in der Chemoprophylaxe und der Therapie der Malaria war. Das Auftreten von Resistenzen gegen Chloroquin sowie gegen Dihydrofolatreduktasehemmer (DHFR-Inhibitoren) und Aminopyrimidine und der fortschreitende Anstieg resistenter Stämme von *Plasmodium falciparum*, die gegen fast alle in der Monotherapie benutzten Substanzen Resistenzen zeigten, barg eine neue Herausforderung in sich. Diese Resistenzformen sind in allen endemischen Gebieten weit verbreitet. Der ständige und auch übermäßige Einsatz dieser Medikamente sowohl in der Chemoprophylaxe als auch in der Behandlung spielt beim auftretenden Selektionsdruck auf die Parasiten eine entscheidende Rolle in der Resistenzentstehung. Seit dem Auftreten der Chloroquinresistenzen in den betroffenen Gebieten, sind die Malariasterblichkeit und die allgemeine Sterblichkeit im Ansteigen begriffen.

Eine Lösung des Problems bestand zwischenzeitlich darin, die Dosen von Chloroquin zu erhöhen und die Behandlungsdauer zu verlängern, jedoch konnte diese Strategie aufgrund des hohen Resistenzniveaus und des Toxizitätsrisikos nicht beibehalten werden.

Das momentane Konzept zur Behandlung der Malaria tropica besteht darin, bekannte, synergistisch wirkende Medikamente zu assoziieren, um damit die Wirksamkeit bei gleich bleibender Nebenwirkungsrate zu erhöhen. Andererseits verlangsamt diese Strategie eine mögliche Resistenzentwicklung, wobei beachtet werden muss, dass möglichst Medikamente mit unterschiedlichem Wirkmechanismus und verschiedenen Angriffsorten verwendet werden, wie es bei dem Studienmedikament Atovaquon/Proguanil der Fall ist.

Jedoch auch weitere lebensbedrohliche Infektionskrankheiten wie zum Beispiel Typhus abdominalis und Cholera stellen in den Ländern mit niedrigem hygienischem Standard eine Bedrohung für Einheimische und Reisende dar. Leider liegen keine gesicherten epidemiologischen Daten zur Prävalenz dieser beiden Erkrankungen in Gabun vor. Es muss aber gesagt werden, dass diese einer starken Schwankungsbreite unterliegt. Epidemien entstehen in der Regel auf dem Boden größerer Umweltkatastrophen, wie zum Beispiel Überschwemmungen, Flutkatastrophen etc. Die reine Existenz dieser ebenfalls lebensbedrohlichen Krankheiten hat dazu geführt, dass bei Reisen in diese Länder von reisemedizinischen Zentren zumeist eine Impfempfehlung für Typhus und Cholera ausgesprochen wird und demzufolge sehr viele Reisende sich dieser Immunisierung unterziehen. Zumindest die Impfung gegen Typhus ist weit verbreitet und wird von ca. jedem dritten Auslandsreisendem, der zuvor medizinische Beratung sucht, genommen [3].

1.1 Epidemiologie der Malaria

1.1.1. Gabun

1.1.1.1. Lage

Die Republik Gabun liegt im Westen Zentralafrikas, zwischen dem 2. nördlichen und dem 4. südlichen Breitengrad. Sie hat eine Größe von 266.000 km² und wird vom Äquator durchzogen und wird begrenzt:

- Im Westen vom Atlantischen Ozean
- Im Norden von Äquatorialguinea und Kamerun
- Im Osten und Süden von der Volksrepublik Kongo

1.1.1.2. Klima

Gabun befindet sich in der tropischen Klimazone, charakterisiert durch hohe Temperaturen (Jahresmittel: 27°C) und eine hohe Luftfeuchtigkeit (80-90%).

Die jährliche Niederschlagsmenge beträgt in etwa 3000 mm und wird maßgeblich durch den Wechsel zwischen Regen- und Trockenzeit bestimmt:

- Große Regenzeit von Januar bis Mai
- Kleine Regenzeit von Oktober bis Dezember
- Große Trockenzeit von Juni bis September
- Kleine Trockenzeit von Dezember bis Januar

1.1.1.3. Vegetation

Die Vegetation wird vom tropischen Regenwald des Primärtyps charakterisiert, der ca. 80% der Fläche einnimmt. Im Süden des Landes herrschen Steppen und Savannen vor.

1.1.1.4. Bevölkerung

Im Jahre 1993 erreichte die Einwohnerzahl 1.014.976, was einer Bevölkerungsdichte von 3,8 Einwohner/km² entspricht.

Gabun wird in 9 Provinzen, 46 Departements und 146 Kantone und Distrikte unterteilt.

Die politische und administrative Hauptstadt Libreville zählt 463.187 Einwohner.

Port Gentil, das wirtschaftliche Zentrum des Landes, hat 87.659 Einwohner.

Im Gabun leben 73% der Bevölkerung in urbanen Gebieten und 27% auf dem Land.

Bevölkerungswachstum: ca. 2,5% (1995)

Geburtenrate: 3,6%

Mortalität: 1,6%

Quellen: Generaldirektion für Wirtschaft, Statistischer Dienst.

Gesundheitsministerium Libreville, Gabun

CIA World Fact Book, 2001

1.2 Epidemiologische Maßdaten

1.2.1 Die Übertragung der Malaria

Die Malaria ist eine Anthropozoonose, die durch den Stich der infizierten weiblichen Anopheles-Mücke und dem damit verbundenen Übertritt der Plasmodien auf den Menschen übertragbar ist.

Diese vektorielle Übertragung der Malaria wird durch verschiedene Faktoren bedingt und begünstigt:

1. Geoklimatische Faktoren

- Die oben genannten klimatischen Bedingungen begünstigen bzw. bedingen die Entwicklung der Vektoren

2. Sozioökonomische Faktoren

- Abwanderung von großen Teilen der Landbevölkerung in die urbanen Zentren führt häufig zur Übervölkerung der Städte, bevorzugt in Form von sog. Slums mit schlechten hygienischen Bedingungen, wie unzureichender Kanalisation, Ausbildung von Tümpeln am Rande urbanisierter Zonen → starke Begünstigung der Vektorreproduktion
- Die durch eine hohe Arbeitslosigkeit bedingte sehr kritische, soziale und wirtschaftliche Situation eines Großteils der Bevölkerung führt des weiteren zu Malnutrition und medizinischer Unterversorgung, da in Gabun der Zugang zu medizinischer Versorgung sehr stark an die finanziellen Möglichkeiten jedes einzelnen gebunden ist und ein Krankenversicherungssystem nicht existiert.

3. Soziokulturelle Faktoren

- Die Krankheit wird häufig interpretiert als eine Aggression mystischen Ursprungs, als Fluch der Eltern oder bereits verstorbener Familienangehöriger. Dies verschleiert gerade in ländlichen Gebieten die Realität der Krankheit, und erschwert eine effektive Bekämpfung. Eine medizinische Versorgung erfolgt im Erkrankungsfalle häufig zu spät, was einen zusätzlichen Anstieg der krankheitsspezifischen Mortalität verursacht.

1.2.2 Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der Malaria

Der Anteil der Malaria-bedingten Todesfälle an der Gesamtmortalität bei Kindern beträgt nach Angaben des Gesundheitsministeriums in Gabun 6,6%. Aufgrund eines ausgeprägten Mangels an ausreichend qualifizierten Fachkräften im medizinischen Bereich ist diese Angabe jedoch nur mit Vorsicht bewertbar.

In einer vorangegangenen Studie am Centre Hospitalier von Libreville konnte gezeigt werden, dass bei 29,2% der in die Studie eingeschlossenen 500 Kinder mit subfebrilen Temperaturen im Alter zwischen 3 und 7 Jahren Plasmodien im Blut nachweisbar waren. Bei den Kindern zwischen 2 und 3 Jahren waren es sogar 42% ohne signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern [4].

In einer weiteren Studie zur Prävalenz von *Plasmodium falciparum* Gabun, bei der 4259 Dicken Tropfen von febrilen und subfebrilen Kindern analysiert wurden, wurde eine Prävalenz von 29,3% des Auftretens von Plasmodien beobachtet. Hierbei konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden [5].

Es wurde des Weiteren festgestellt, dass die Prävalenz von Plasmodien im Blut im ländlichen Umland von Lambaréné höher ist als im Stadtbereich. Die maximale Häufigkeit wurde in der kleinen Regenzeit (September-November) beobachtet. Die am stärksten betroffene Altersgruppe war die der 5-14-jährigen [6].

In einer ähnlichen Studie, aus Franceville im Süden Gabuns, wurden Prävalenzen von 39,8 bzw. 43,3% gemessen [7].

1.3 Die Malaria

1.3.1 Die einzelnen Plasmodienspezies

Weltweit kommen als humanpathogen relevante Erreger der Malaria folgende in Betracht:

<i>Plasmodium falciparum</i> :	Erreger der Malaria tropica, häufigste und einzige lebensbedrohliche Malaria
<i>Plasmodium malariae</i>	Erreger der Malaria quartana
<i>Plasmodium vivax</i> und <i>Plasmodium ovale</i> :	Erreger der Malaria tertiana

Tab.1 Plasmodienspezies

Im Rahmen der bereits erwähnten Studie zur Epidemiologie der Malaria im der Provinz Moyen Ogoue von 1992 wurden folgende Daten zur Verteilung der Prävalenzen der einzelnen Plasmodienspezies ermittelt [6].

Plasmodium falciparum: 88,7%

Plasmodium malariae: 8%

Plasmodium ovale: 0,6%

Mischinfektionen: 2,7%

Plasmodium vivax ist in Zentralafrika nicht präsent.

Plasmodium falciparum stellt die einzige Spezies dar, die zu einer ausgeweiteten Parasitämie führen kann (bis zu 10^6 Parasiten/ηl).

Plasmodium malariae und *Plasmodium ovale* führen selten zu einer Parasitämie von mehr als 10.000/ηl.

1.3.2 Pathophysiologie und Klinik

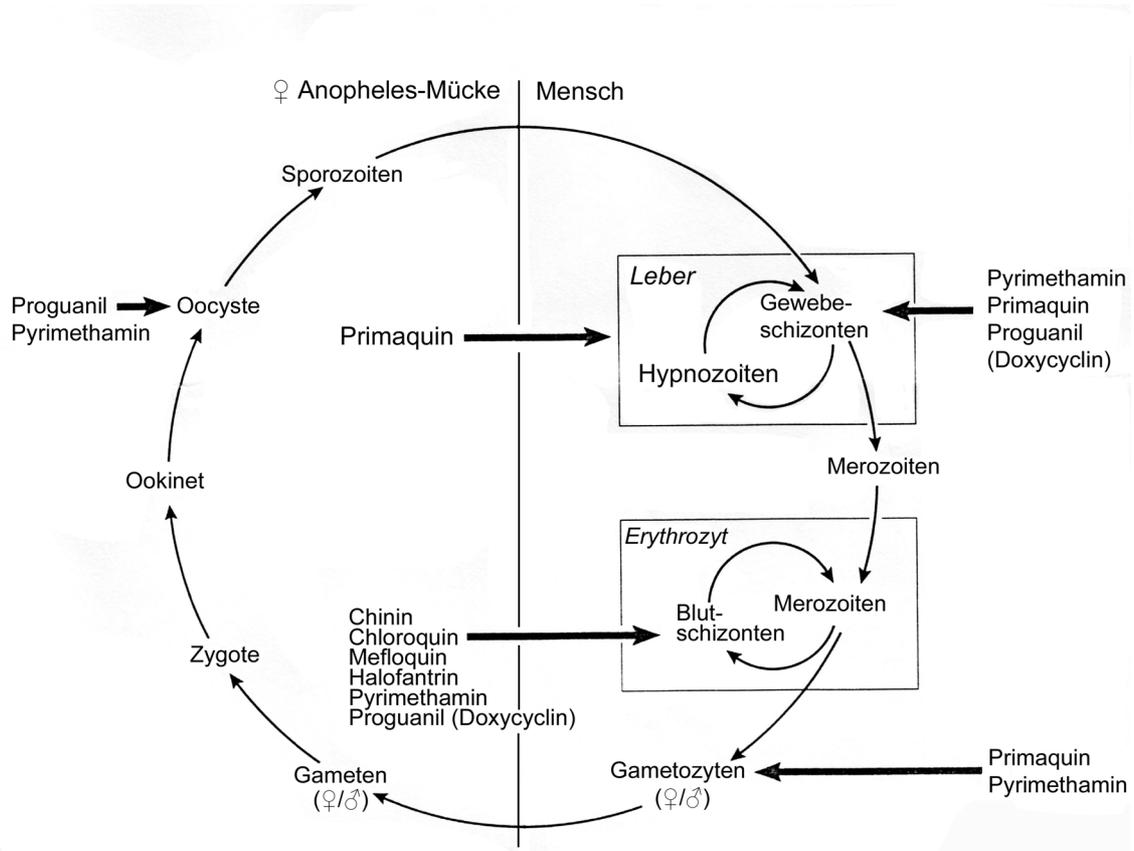


Abb.1 Lebenszyklus der Plasmodien und Pharmakodynamik (In Anlehnung an Forth & Hentschler, Pharmakologie, 2001)

Die Malaria tropica ist besonders im Kindesalter eine potentiell vital bedrohliche Erkrankung.

Sie äußert sich häufig in Form von Kopfschmerzen, (intermittierendem) Fieber und gastrointestinalen Symptomen wie Durchfall und rezidivierendem Erbrechen. In fortgeschrittenen Stadien treten häufig neurologische Symptome hinzu (Apathie, Krampfanfälle, Koma), aber auch andere Organsysteme, insbesondere die Niere, werden stark geschädigt, was häufig bis hin zur Niereninsuffizienz bzw. einem nephrotischen Syndrom führt.

In der klinischen Untersuchung fällt ein schwerkranker Patient mit einem Ikterus durch den vermehrten Erythrozytenzerfall und einer Splenomegalie auf.

Bei schweren Verläufen wird diese Symptomatik von erheblichen Veränderungen verschiedenster Laborparameter begleitet, insbesondere ist in diesem Zusammenhang ein starker Abfall des Hämoglobinswertes und des Blutglucosewertes zu verzeichnen. Weiterhin kommt es zu einem starken Anstieg des Blutlactats und konsekutiver metabolischer Azidose [8].

1.4 Therapie und Medikationen

1.4.1 Substanzklassen

In der Behandlung der Malaria sind im Moment folgende Substanzklassen im Einsatz:

SUBSTANZGRUPPE	WIRKSTOFF	WIRKMECHANISMUS
4-Aminochinolone	Chloroquin, Amodiaquin	Schizontizid
Chinchona-Alkaloide	Chinin, Chinidin	asexuelle erythrozytäre Stadien
4-Chinolin carbinolamine	Mefloquin	Schizontizid, erythrozythäres Stadium
8-Aminochinoline	Primaquin	Wirkt auf Gametozyten, Sporozoiten, Hypnozoiten schwach schizontizid,
Diaminopyrimidine	Pyrimethamin	Hemmung der DHFR, schizontizid
Sulfonamide und Sulfone	Sulfadoxazin, Dapson	Hemmung der Dihydropteroatsynthetase, schizontizid
Tetrazykline	Doxycyclin	Hemmung der Proteinsynthese durch ribosomale Bindung, Blut- und Gewebeschantizid
Biguanide	Proguanil	Metabolit Cycloguanil hemmt DHFR, schizontizid
Sesquiterpenlactone	Artemisinin	Schizontizid
Phenantrenmethanole	Halofantrin	Schizontizid
Hydroxynaphthochinon	Atovaquon	Hemmung des mitochondrialen Elektronentransports

Tab.2 Substanzklassen zur medikamentösen Behandlung der Malaria

1.4.2 Resistenzprobleme

Die WHO definiert Resistenz gegen eine bestimmte Substanz mit dem Vermögen eines Erregers, trotz hinreichender Verabreichung und Absorption eines Medikaments, zu überleben bzw. sich fortzupflanzen.

Weltweit dominierend in ihrer Ausprägung und ihren sozialen und wirtschaftlichen Konsequenzen ist die Resistenz gegen Chloroquin, das lange Zeit als kostengünstiges und relativ nebenwirkungsarmes Therapeutikum der ersten Wahl etabliert war. Die Entstehung der Resistenzen wurde gefördert durch ungezielte Einnahmen und eine sehr lange Halbwertszeit.

Die Resistenzen gegen Anti-Malaria-Medikamente lassen sich nach 2 verschiedenen Methoden testen [9]:

- *In vivo* der Einteilung in 4 Gruppen (S-RI-RII-RIII)
 - S=Sensitiv – Entparasitierung bis Tag 7 ohne Rekrudescenz an Tag 28
 - RI-Resistenz: Entparasitierung bis Tag 7 mit Rekrudescenz bis Tag 28
 - RII-Resistenz: Entparasitierung bis zu 25% der Ausgangsparasitämie innerhalb von 48h jedoch ohne komplette Remission bis Tag 7
 - RIII-Resistenz: nur mäßig vorhandene Reduktion der Parasitämie innerhalb von 48h
- Der *in vitro* Test untersucht den Einfluss von ansteigenden Dosen von Anti-Malaria-Medikamenten auf das Ausbilden von Schizonten und auf den asexuellen Teilungszyklus des Parasiten. Es existieren hierfür verschiedene Methoden [9].

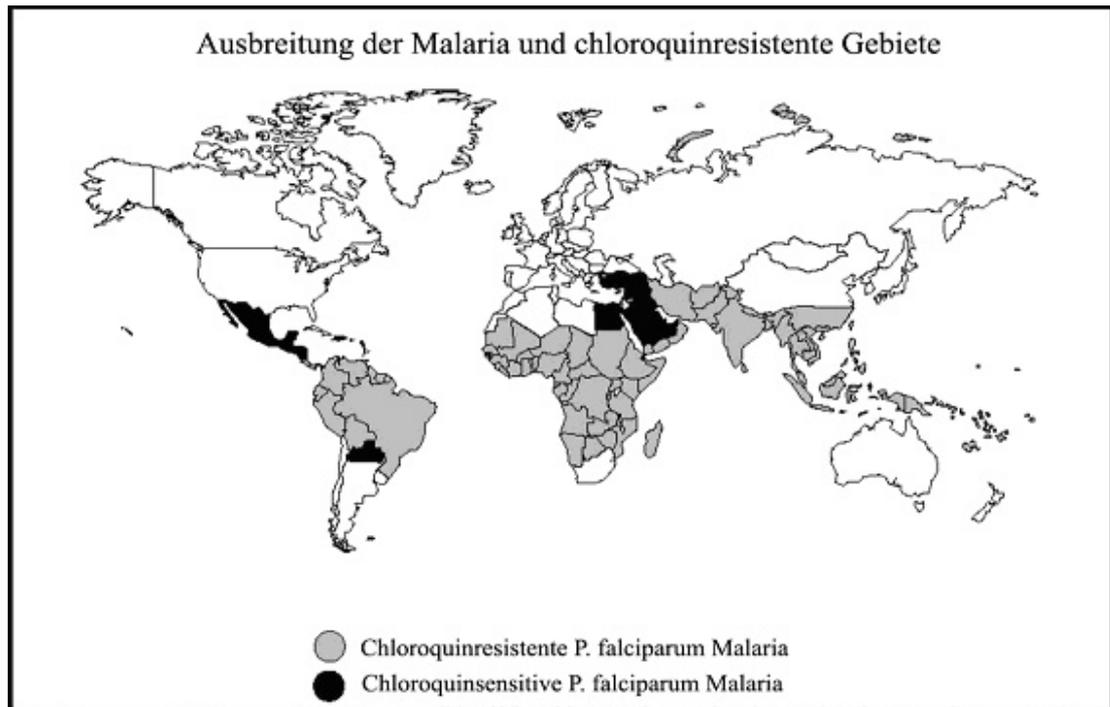


Abb.2

Geschichte:

Resistenzen von *Plasmodium falciparum* gegenüber 4-Aminochinolinen wie Chloroquin und Amodiaquin wurde erstmals 1957 in Thailand beobachtet [10]. Auf dem afrikanischen Kontinent fand man sie das erste mal 1978 in Kenia [11].

Etwa zur gleichen Zeit wurden auch die ersten Resistenzen gegenüber Pyrimethamin beobachtet.

Ursachen:

Bei Resistenzen gegenüber den DHFR-Inhibitoren sind verschiedene Mutationen in betroffenen Genabschnitten dafür verantwortlich. Bei Pyrimethamin und Cycloguanil handelt es sich um die Mutationen 108-Asn, 51-Ile, 59-Arg, 164-Leu und 50-Arg im DHFR-Gen [12]

Es ist bekannt, dass chloroquinresistente Parasitenstämme die Substanz aus ihren Vakuolen, dem Wirkort von Chloroquin, sehr schnell wieder ausschleusen können. Vermittelt wird dieser Vorgang über eine Punktmutation im PFCRT-Gen (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter-Gene), welches sich auf Chromosom 7 des Parasitengenoms befindet [13].

Eine weitere molekulare Ursache der Resistenzen von *Plasmodium falciparum* ist im PFMDR 1 Gen zu sehen, welche in Homologie zu den MDR-Genen menschlicher Tumorzellen betrachtet werden

können. Das PFMDR1 Gen ist im Gegensatz zum PFMDR 2 Gen mit Chloroquinresistenzen assoziiert [14].

Die Assoziation von Mutationen im PFMDR 1 bzw. im PFCRT-Gen und der Resistenz gegenüber Chloroquin wurden neulich auch in Lambarene untersucht [15].

***In vivo* Studien:**

In verschiedenen Studien in Gabun und anderswo ist die nachlassende Wirkung von Chloroquin nachgewiesen worden.

In einer Studie am Albert Schweitzer Krankenhaus in Lambarene wurde die *in vivo* Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gegenüber Chloroquin, Chloroquin/Clindamycin, Chinin oder Chinin/Clindamycin untersucht. Es nahmen 140 Kinder im Alter zwischen 4 und 15 Jahren teil. In der Chloroquingruppe konnten lediglich 9% bis zum Tag 28 geheilt werden, im Gegensatz zu 70% in der Chloroquin/Clindamycin-Gruppe [16].

Auch in anderen malariaendemischen Gebieten der Erde ist die stark reduzierte Wirksamkeit einer Chloroquin-Monotherapie durch zahlreiche Studien belegt. So zum Beispiel wurden bei der US-Navy in Indonesien in einer klinischen Studie zum Vergleich der Wirksamkeiten von Chloroquin/Doxycyclin vs. Chloroquin bzw. vs. Amodiaquin lediglich 4 von 20 erkrankten Personen in der Chloroquin-Gruppe geheilt [17].

In einer Studie in Laos wurden 48 Patienten mit *P.falciparum* Malaria mit Chloroquin behandelt von denen 54% innerhalb von 28 Tagen geheilt werden konnten. Bei allen Patienten die einen Behandlungsfehler aufwiesen, konnte die oben genannte Mutation im PFCRT-Gen nachgewiesen werden (K76T) [18].

Die Resistenzlage gegenüber Sulfadoxin/Pyrimethamin ist Zentralafrika noch nicht mit der von Chloroquin vergleichbar, jedoch ist ein Absinken der Empfindlichkeit von *P.falciparum* gegenüber diesem in der dritten Welt sehr gängigem Medikament (Fansidar®) erkennbar.

In Franceville, im Südosten Gabuns, wurde 1999 eine Studie zur Wirksamkeit von Sulfadoxin/Pyrimethamin durchgeführt in die 66 Kinder eingeschlossen wurden. Bei 18% wurde eine RII, und bei weiteren 12% eine RIII-Resistenz festgestellt[19].

In einer Studie in Peru, in der die Wirksamkeit von Atovaquon/Proguanil, Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin verglichen wurde, konnten 21 von 21 Patienten in der Atovaquon/Proguanil-Gruppe, 5 von 5 Patienten in der Sulfadoxin/Pyrimethamin-Gruppe und schließlich 1 von 13 Patienten in der Chloroquin Gruppe geheilt. Die generelle Aussagekraft bleibt jedoch auf Grund der geringen Größe der einzelnen Gruppen diskussionswürdig[20].

Auch in einer weiteren, in Uganda durchgeführten Studie diskutierte man den eventuellen Ersatz von Chloroquin durch Sulfadoxin/Pyrimethamin bzw. Amodiaquin oder einer Kombination der beiden. In der Sulfadoxin/Pyrimethamin Gruppe zeigten 26% , in der Amodiaquingruppe 16% und in der Sulfadoxin/Pyrimethamin-Amodiaquingruppe 10% einen Behandlungsfehler nach parasitologischen Aspekten (Parasitämie zwischen dem 6. und 14. Tag) [21].

Am Studienort wird in zweijährlichem Abstand eine *in vitro* Resistenzbestimmung auf Mefloquin, und Chinin durchgeführt. Dabei ergaben sich für die *in vitro* Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gegenüber Mefloquin und Chinin folgende Daten (ED₅₀ in µmol/l) [22] :

	1992	1994	1996	1998
Chinin	0,51	0,54	0,37	0,26
Mefloquin	0,31	0,51	0,36	0,36

Tab.3 ED₅₀ in µmol/l für Chinin und Mefloquin

Chloroquin zeigte eine ED 50 von 1,86 µmol/l, was ein Hinweis für eine starke Parasitenresistenz ist.

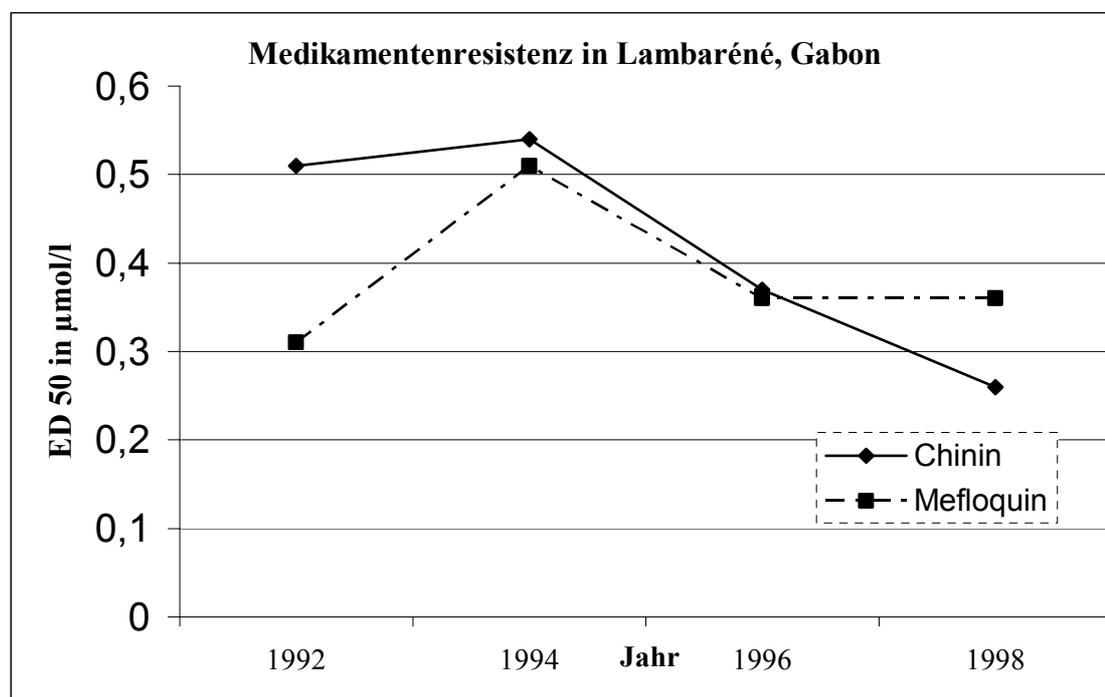


Abb.3 Entwicklung der Medikamentenresistenz in Lambaréné, Gabun von 1992-1998

Leider ist Chloroquin in der Behandlung der Malaria in Gabun noch immer weit verbreitet. Es wird zumindest in Lambarene nicht mehr in öffentlichen Gesundheitseinrichtungen verordnet, jedoch wird es weiterhin in Apotheken vertrieben und erfreut sich dort noch immenser Nachfrage.

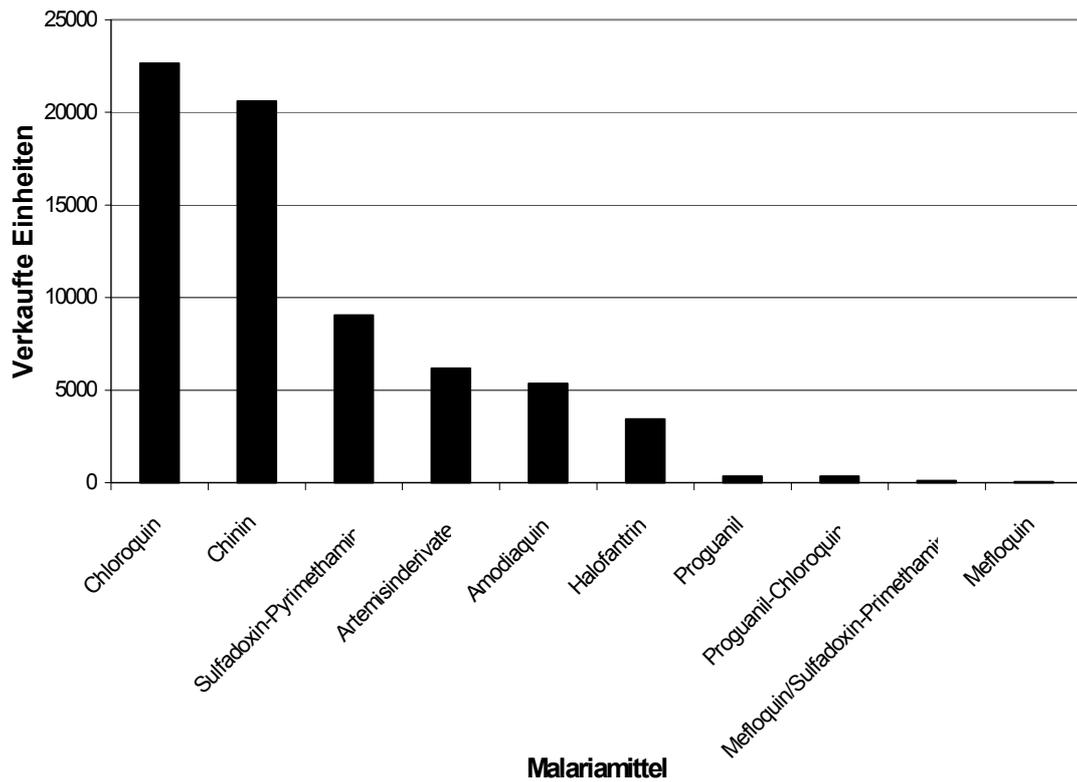
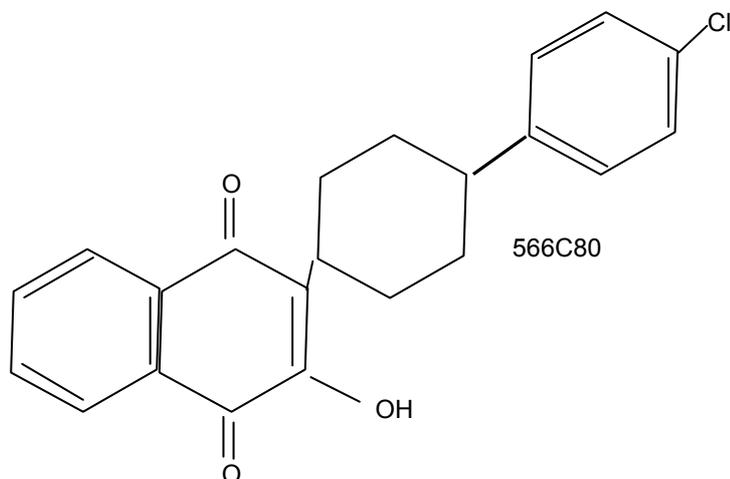


Abb.4 Verkaufte Malariamittel in Gabun pro Monat 1991-1995 (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Maryse Ndjavé)

1.5 Das Studienmedikament

1.5.1 Atovaquon

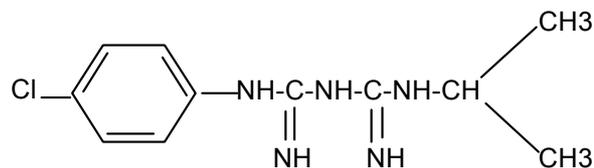


Bei Atovaquon handelt es sich um ein erstmals zu Beginn der achtziger Jahre synthetisiertes Medikament aus der Gruppe der Hydroxynaphthochinone.

Sein Wirkmechanismus ist bislang nicht vollständig geklärt. Die Substanz führt zu einer Hemmung des Cytochrom-bcl-Komplexes in den Mitochondrien, da es als Analogon des Coenzym Q (Ubichinon) fungiert und damit zu einer Blockierung der Atmungskette und folglich zu einer Blockierung der ATP- und Nukleinsäureproduktion der Protozoen führt. Vermutlich greift es in die De-Novo-Pyrimidinsynthese der Erreger ein (Protozoen können keine präformierten Pyrimidine resorbieren). Es besteht eine selektive Toxizität für Mikroorganismen, da die blockierten enzymatischen Reaktionen in menschlichen Zellen nicht ablaufen [23]

Atovaquon wird als Monotherapie in Deutschland auch zur Behandlung anderer parasitärer Erkrankungen wie der Toxoplasmose und der Pneumocystis-carinii-Pneumonie (PCP) eingesetzt. Jedoch fungiert es dort auch aus Kostengründen nur als Medikament der zweiten oder dritten Wahl.

1.5.2 Proguanil



Proguanil gehört zu den Biguaniden (Tab.2) und fungiert als Prodrug. Es ist seit den vierziger Jahren bekannt. In Südostasien traten nach rascher und breiter Anwendung vielerorts Resistenzen auf. In den neunziger Jahren erlebte das Medikament eine Renaissance, da es von der WHO in Kombination mit

Chloroquin als Prophylaktikum für malariaendemische Gebiete aufgeführt wurde. Proguanil selbst besitzt nur eine relativ schwache inhibitorische Wirkung auf die DHFR, die eigentliche Wirkung wird von seinem Metaboliten Cycloguanil entfaltet. Eine Affinität zum entsprechenden Enzym in Säugetierzellen ist ebenfalls vorhanden, ist jedoch um vieles niedriger [23].

Weltweit dominieren 2 verschiedene Resistenzmechanismen gegen Proguanil:

1. Punktmutationen im DHFR-Gen des Parasiten [24-26]
2. Defizienz verschiedener Isoformen des Cytochrom P450 bei bis zu 20% aller Afrikaner und Asiaten, die die Konvertierung von Proguanil zu Cycloguanil katalysiert [27,28].

1.5.3 Das Kombinationspräparat Atovaquon-Proguanil

Das A-P-Kombinationspräparat zeichnet sich durch ihre in stärkstem Maße synergistisch wirkenden Einzelkomponenten aus. Der Hemmstoff des mitochondrialen Elektronentransports Atovaquon auf der einen und der DHFR-Hemmer Proguanil auf der anderen Seite ergänzen sich auf außergewöhnlich gute Art und Weise, was die in verschiedenen Studien erzielten Wirksamkeiten anbelangt [29]. Mit ihren tendenziell niedrigen Halbwertszeiten von 42h (Atovaquon) und 14h (Proguanil) und dem daraus resultierenden täglichen Einnahmerhythmus ist eine Resistenzentwicklung durch subtherapeutische Plasmaspiegel unwahrscheinlich. Das Medikament ist unter dem Handelsnamen Malarone® zur Therapie der unkomplizierten Malaria tropica und zur Chemoprophylaxe zugelassen.

Bis zur Zulassung wurde in den verschiedensten Studien die Wirksamkeit und Sicherheit des Präparates bestätigt:

In einer zehnwöchigen Studie an 198 kenianischen Erwachsenen, erkrankte keiner der 133 mit A-P-Kombinationstherapie behandelten, jedoch 28 der 65 Placeboempfänger was einer Wirksamkeit von 100% entspricht [30].

In Sambia erhielten 136 Erwachsene A-P-Medikation und 138 Placebo, wobei in der Placebogruppe 41 Teilnehmer an Malaria erkrankten und 2 in der A-P-Gruppe. Dies entspricht einer Wirksamkeit von 95% im Vergleich zur Placebogruppe [31]

Auch in Lambaréné, Gabun, wurde bereits eine Studie zur Wirksamkeit der A-P-Chemoprophylaxe durchgeführt. Dabei erkrankten 25 von 140 Kindern in der Placebogruppe, jedoch kein einziges in der A-P-Gruppe, was ebenfalls einer Wirksamkeit der A-P Chemoprophylaxe von 100% entspricht [32]

		Anzahl der Teilnehmer			Inzidenz [†] Parasitämie	% Wirksamkeit (95% KI) [§]	
		Einge- schlossen	Studie abgeschlossen	Parasitämie entwickelt		Methode 1	Methode 2
Kenia	Placebo	68	54	28	5,80		
	A+P	70	54	0	0	100	100
	A+P x 2	67	54	0	0	100	100
Sambia	Placebo	138	111	41	3,88		
	A+P	136	102	2	0,18	95,3	94,6
Gabun	Placebo	140	134	25	1,64		
	A+P	125	113	0	0	100	100
Gesamt	Placebo	346	299	94	3,07		
	A+P	331	269	2	0,06	97,9	97,6

Tab.4: Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von A-P in verschiedenen Ländern

* A+P = 250 mg Atovaquon und 100 mg Proguanilhydrochlorid bzw. 62,5 mg Atovaquon und 25 mg Proguanil bei der in Gabun verwendeten pädiatrischen Formulation; A+P x 2 = 500 mg Atovaquon and 200 mg Proguanilhydrochlorid einmal täglich.

† Inzidenz der Parasitämien in pro Person pro Jahr

§ Wirksamkeit nach Methode 1 = $100 \times [1 - (\text{Inzidenzdichte in A-P-Gruppe} / \text{Inzidenzdichte in Placebogruppe})]$

Wirksamkeit nach Methode 2 = $100 \times [1 - (\text{Anteil mit Parasitämie in A-P-Gruppe} / \text{Anteil mit Parasitämie in Placebogruppe})]$.

UW	Teilnehmer mit UW in Prozent ohne Therapiekausalität (in Prozent mit Therapiekausalität)				
	Erwachsene			Kinder und Jugendliche	
	Placebo-kontrolliert		Gesamt	Placebo (n=140)	A+P (n=125)
	Placebo (n=206)	A+P (N=206)	A+P (N=381)		
Kopfschmerzen	27 (7)	22 (3)	17 (5)	21 (14)	19 (14)
Fieber	13 (1)	5 (0)	3 (0)	11 (<1)	6 (0)
Myalgie	11 (0)	12 (0)	7 (0)	0 (0)	0 (0)
Bauchschmerzen	10 (5)	9 (4)	6 (3)	29 (29)	33 (31)
Husten	8 (<1)	6 (<1)	4 (1)	9 (0)	9 (0)
Diarrhöe	8 (3)	6 (<1)	4 (1)	3 (1)	2 (0)
IOL	7 (0)	8 (0)	5 (0)	0 (0)	0 (0)
Dyspepsie	5 (4)	3 (2)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
Rücken- schmerzen	4 (<1)	8 (<1)	4 (<1)	0 (0)	0 (0)
Gastritis	3 (2)	3 (3)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
Erbrechen	2 (<1)	1 (<1)	<1 (<1)	6 (6)	7 (7)
Gesamt	65 (32)	54 (17)	49 (17)	62 (41)	60 (42)

Tab 5.: Teilnehmer mit UW ohne und mit Therapiekausalität

IOL = Infektion der oberen Luftwege

Neuerdings wird jedoch angezweifelt, dass die reine Coaktivität von Proguanil einerseits als DHFR-Inhibitor und Atovaquon andererseits als Hemmstoff des mitochondrialen Elektronentransports als alleinige Erklärung für den synergischen Effekt ausreicht. Vielmehr wurde herausgefunden, dass Proguanil die für das Zusammenbrechen des Elektropotentials an der inneren Mitochondrienmembran nötige Konzentration an Atovaquon verringert. Dies könnte zumindest erklären, warum Atovaquon-Proguanil selbst in Regionen mit hohen Resistenzraten gegen DHFR-Inhibitoren wie Proguanil eine bewiesenermaßen hohe Wirksamkeit besitzt [33].

1.6 Typhus

1.6.1 Allgemeines und Epidemiologie

Der Erreger, *Salmonella typhi*, ist weltweit verbreitet. Die jährliche Inzidenz von Typhus abdominalis wird auf etwa 17 Millionen Erkrankungen und 600.000 Todesfälle geschätzt. In Ländern mit unzureichenden hygienischen Bedingungen sind besonders hohe Erkrankungszahlen und wiederholt Ausbrüche und Epidemien zu verzeichnen, z. B. in Afrika, Südamerika und Südostasien (s. Abb 5.). In Deutschland konnte die Zahl der Erkrankungen durch die Versorgung der Bevölkerung mit hygienisch einwandfreiem Trinkwasser, Vorschriften für Dauerausscheider und andere Maßnahmen stark vermindert werden.

Im Jahr 1999 lag die Zahl der gemeldeten Erkrankungen an Typhus abdominalis mit 109 etwas höher als in den Vorjahren (1997: 75; 1998: 76). Die Zahl der gemeldeten Paratyphus-Erkrankungen lag in den Jahren von 1997 bis 1999 zwischen 59 und 84. Etwa 80-90 % aller Typhus- und Paratyphuserkrankungen werden gegenwärtig importiert, insbesondere aus Entwicklungsländern, in denen Typhus und Paratyphus stark verbreitet sind und die häufig beliebte Reiseziele darstellen (z. B. Pakistan, Indien, Thailand, Indonesien, Ägypten, Türkei und Marokko). Als Infektionsgebiete treten vor allem auch Regionen in Erscheinung, in denen sich die sanitären und allgemein hygienischen Verhältnisse aufgrund von Katastrophen oder Kriegseinwirkung dramatisch verschlechtert haben [34].

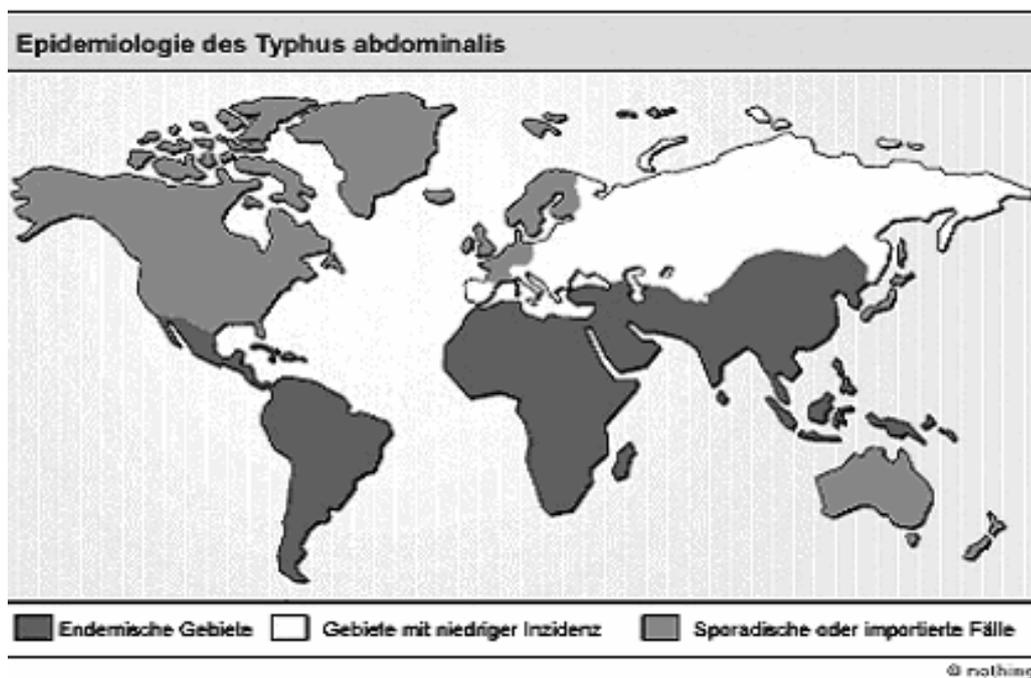


Abb.5 Verbreitungsgebiete des Typhus abdominalis

1.6.2 Klinik, Serologie und Therapie

Der Typhus abdominalis wird vor allem von *Salmonella typhi*, seltener von *Salmonella paratyphi* A oder B hervorgerufen, welche zur Gruppe der gramnegativen Stäbchen gehören.

Die Übertragung erfolgt fäkal-oral, besonders durch verunreinigtes Trinkwasser. Es handelt sich um eine Allgemeininfektion mit einer mittleren Inkubationszeit von 2 Wochen. Die klinische Symptomatik beginnt mit Allgemeinsymptomen wie Fieber und Kopfschmerzen, häufig zeigt die Zunge einen dicken weißlichen Belag. Im weiteren Verlauf können Bewusstseinsstörungen in den Vordergrund treten. Hämatogene Streuung der Erreger ist möglich und stark prognosereduzierend [35].

Der serologische Antikörpernachweis mittels der Widal'schen Reaktion wird zeitigstens nach der ersten Krankheitswoche positiv, wobei ein IgG-Antikörpertiter von $> 1:100$ stets verdächtig auf eine Infektion ist [35]. Den definitiven Beweis einer Infektion liefert der Erregernachweis in der Blutkultur.

Therapeutisch werden, nicht zuletzt in Anbetracht der Resistenzlage, hauptsächlich Fluorochinolone, Cotrimoxazol oder ein Aminopenicillin als Mittel der ersten Wahl eingesetzt [34].

1.7 Cholera

1.7.1 Allgemeines und Epidemiologie

Diese erstmals von Robert Koch 1883 näher beschriebene Erkrankung wird von *Vibrio cholerae*, *Biovar cholerae* und *Biovar el Tor* hervorgerufen. Sie ist weltweit verbreitet, breitet sich aber bevorzugt auf dem Boden von Naturkatastrophen und den daraus resultierenden schlechten hygienischen Umständen aus. Epidemien sind wiederholt auf dem indischen Subkontinent und in einigen Regionen Südamerikas aufgetreten [34].

1.7.2 Pathophysiologie und Klinik

Die klinische Symptomatik, der in der Regel durch orale Aufnahme von verunreinigtem Trinkwasser hervorgerufenen Erkrankung, wird durch die Wirkung des Choleratoxins, eines Exotoxins, bestehend aus einer A und B Untereinheit, verursacht. Die Anlagerung des Toxins an die Darmzelle führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase mit entsprechender Störung des Elektrolytaustausches und damit zu einer sekretorischen Diarrhöe. Eine Schädigung der Schleimhautzellen tritt nicht ein. Die Symptomatik ist, abhängig von der Toxinproduktion, mehr oder weniger stark ausgeprägt

Die Erkrankung beginnt ohne Prodromalsymptome mit zunehmend weichen, dann mehr und mehr wässrigen Stuhlentleerungen. Seltener leiden die Patienten auch unter Erbrechen. Bei schweren Erkrankungsformen kommt es zu profusen, wässrigen, schmerzlosen Durchfällen (Reiswasser-Stühle) mit

Flüssigkeitsverlusten bis zu 20 l/Tag. Die Patienten leiden unter starken Wadenkrämpfen, es kommt zu zunehmender Exsikkose, Elektrolytentgleisung und Azidose. Ohne Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution trüben die Patienten zunehmend ein, und es kommt aufgrund von Nierenversagen und Kreislaufkollaps zum Exitus letalis. Die Letalität der unbehandelten Erkrankung kann bis zu 60% betragen. Bei rechtzeitiger Elektrolyt- und Flüssigkeitssubstitutionstherapie ist die Prognose gut (Letalität 1%) [35].

1.8 Die Impfstoffe CVD103-HgR und Ty21a

Bei CVD103-HgR und Ty21a handelt es um attenuierte Lebendimpfstoffe, die zum Gebrauch zugelassen sind, und deren Anwendung bei Bewohnern und Reisenden in endemische Gebiete indiziert ist.

Bei CVD103-HgR handelt es sich um apathogene *Vibrio cholerae* CVD103-HgR, denen das Gen, das die A-Untereinheit des Cholera-toxins codiert, entfernt wurde. Durch die Lebendvakzine wird sowohl eine lokale intestinale Immunantwort provoziert, als auch spezifische Serumantikörper gebildet. Es besteht ein Impfschutz frühestens sieben Tage nach Einnahme des Impfstoffs. Der Impfschutz hält ca. 6 Monate. Die Induktion der Immunantwort erfolgt analog zu Ty21 a.

Ty21 a ist ein vom Swiss Serum and Vaccine Institute hergestellter attenuierter Lebendimpfstoff, der per os zugeführt wird. Es handelt sich um die apathogene *Salmonella typhi* Ty21a Spezies, welcher das Enzym *UDP-galactose-4-epimerase* entfernt wurde (Berna Biotech AG, Bern, Schweiz).

Der attenuierte Lebendimpfstoff wird von Zellen des mononukleären Systems erkannt und prozessiert. Anschließend werden Teile des bakteriellen Antigens und der bakteriellen DNA von diesen Zellen unter Zuhilfenahme ihrer membranständigen MHC1-Proteine dem T-Zellsystem präsentiert und es werden Memory-T-Zellen formiert, die nun die Aufgabe der spezifischen Immunabwehr gegen Typhus abdominalis übernehmen (s. Abb.6).

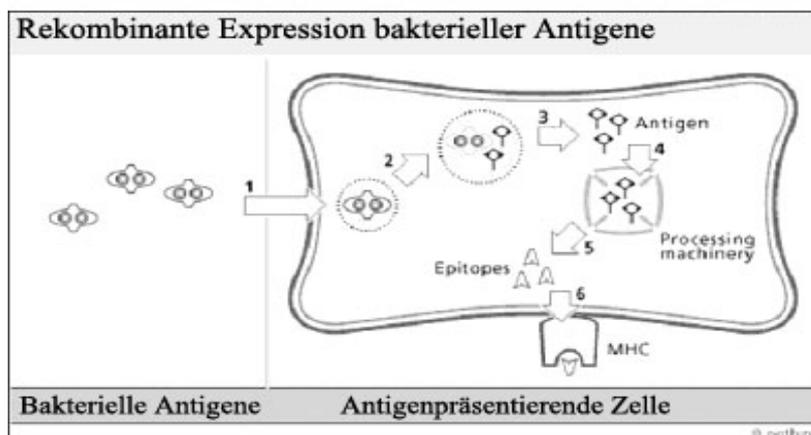


Abb.6: Rekombinante Expression bakterieller Antigene (Berna Biotech AG, Bern, Schweiz).

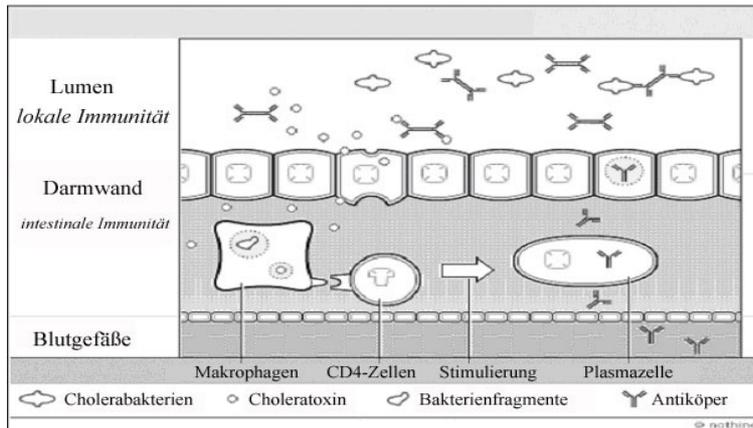


Abb7. Funktionalität des CVD-103HgR Impfstoffs (Berna Biotech AG, Bern, Schweiz)

1.8.1 Wirksamkeit und Verträglichkeit von Ty21a und CVD-103HgR

Bisher wurden verschiedene Studien durchgeführt, die die Verträglichkeit und Wirksamkeit der beiden Impfstoffe untersuchten. In einer Studie an 330 gesunden, freiwilligen Erwachsenen in Wien 1995 in welcher randomisiert entweder Ty21a / CVD-103HgR oder Placebo gegeben wurde (Ratio 4:1), konnte kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Nebenwirkungen wie Übelkeit, Durchfall oder Erbrechen gefunden werden [36].

In verschiedenen weiteren Studien wurden das Auftreten von Nebenwirkungen nach Gabe von CVD-103HgR u./o. Ty21a untersucht, und es wurden je nach Protokoll in der Regel Diarrhö (10-30%), Übelkeit (5-14%), Erbrechen (0-2%), abdominale Beschwerden (4-15%) gefunden [37,38].

1.8.2 Interaktionen von Ty21a und CVD-103HgR und Antimalariamedikamenten

Für die Induktion einer potenten Immunantwort bedarf es einer gewissen Replikationsfähigkeit der inokulierten Erreger, sodass es nahe liegt, dass Antibiotika oder Stoffe mit antibakterieller Potenz diese Replikation stören könnten [39]. Mefloquin und Chloroquin besitzen beide eine antibakterielle Potenz und können die Immunogenität der Ty21a Vakzine verringern [40-42]

Weiterhin wurde bereits die Wirksamkeit (induzierte Antikörperantwort) und die Verträglichkeit von Ty21a / CVD-103HgR in Komedikation mit Antimalariamedikamenten wie Chloroquin, Proguanil untersucht. Dort wurde festgestellt, dass insbesondere Chloroquin, aber auch Proguanil die Induktion einer Antikörperantwort auf CVD-103HgR allein, nicht aber auf eine Kombination von Ty21a und

CVD103HgR, signifikant verringern [43].

2 Methoden und Durchführung

2.1 Ziel der Studie

Studienziele:

- Untersuchung des Einflusses von Atovaquon/Proguanil auf die Immunantwort auf Ty 21a und CVD103-HgR Impfstoffen bei Kindern mit einem Körpergewicht zwischen 11 und 40 kg
- Untersuchung der Verträglichkeit von Atovaquon/Proguanil bei gleichzeitiger Gabe von Ty21a und CVD103-HgR Impfstoffen in der Prophylaxe der *Plasmodium falciparum* Malaria bei Kindern mit einem Körpergewicht zwischen 11 und 40 kg
- Untersuchung der Wirksamkeit von Atovaquon-Proguanil in der Prophylaxe der *Plasmodium falciparum* Malaria bei Kindern mit einem Körpergewicht zwischen 11 und 40 kg
- Untersuchung der Verträglichkeit von Atovaquon-Proguanil in der Prophylaxe der *Plasmodium-falciparum* Malaria bei Kindern mit einem Körpergewicht zwischen 11 und 40 kg

2.2 Angestrebte Ergebnisse der Studie

Primäres Ergebnis

- Anteil der Probanden mit Parasitämie unter Chemoprophylaxe

Sekundäres Ergebnis

- anti-*S. typhi* IgG and IgA Lipopolysaccharid-Serumantikörpertiter und *V. cholerae* Serumantikörpertiter
- Inzidenz von Nebenwirkungen

2.3 Aufbau der Studie

Es handelte sich hierbei um eine Phase 3 Studie, welche randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert vergleichend durchgeführt wurde. Sie besteht aus drei Etappen:

1. Entparasitierung für 3 Tage zum Ausschluss von Parasitämien an Tag 0
2. 4 Tage nach Abschluss der Entparasitierung tägliche Chemoprophylaxegabe im Zeitraum von 12 Wochen und in Woche 3 Impfgabe von Ty21a und CVD103-HgR gefolgt von einer Ty21a-Gabe 2 und 4 Tage später.
3. Nachsorgephase von 4 Wochen. Um eine adäquate Aussagekraft zu gewährleisten, wurden mindestens 25 Probanden mit Parasitämie zwischen der dritten und der 12. Woche benötigt. Für den Fall, dass dies nicht erreicht wurde, wurde die Studie bis zum Erreichen von 25 positiven Probanden fortgesetzt, jedoch maximal bis zu Woche 20.

2.4 Zusammensetzung der Probanden

Diese Studie begann mit 330 gesunden, männlich und weiblichen gabunischen Schulkindern zwischen 4 und 16 Jahren, die zwischen 11 und 40 kg wogen, 110 davon jeweils in einer der drei Gewichtsklassen →Tab 7.

Davon mussten 275 Probanden die Entparasitierungsphase abschließen, und in die Chemoprophylaxephase aufgenommen werden.

2.5 Inklusionskriterien

Für den Einschluss in die Studie mussten bei den Studienteilnehmern folgende Kriterien erfüllt sein:

1. männlich oder weiblich

weibliche Versuchsteilnehmerinnen mussten die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a Stadium der Prämenarche

oder

- b Bei bereits menstruierenden Mädchen mit negativem Schwangerschaftstest zum Zeitpunkt der Eingangsuntersuchungen in Verbindung mit Einverständnis zu:
- Vollständigem Verzicht auf Sexualverkehr von 2 Wochen vor Beginn der Chemoprophylaxegabe
 - Orale Kontrazeptiva (Kombinationspräparate oder nur Progesteron)
 - Jeder Art intrauteriner Schwangerschaftsverhütung (vorliegen von Publikationen, die die „Failure Rate“ des Produktes auf unter 1% pro Jahr angeben, ist erforderlich)
 - Kontrazeptiv wirksame Barrieremethoden (Okklusionspessar, Scheidendiaphragma) in Verbindung mit einer der oben genannten Methoden
- 1) guter Allgemeinzustand
 - 2) Vorhandensein eines Malariainfektionsrisikos
 - 3) Alter zwischen 4 und 16 Jahren
 - 4) Körpergewicht zwischen 11 kg und 40 kg
 - 6) Einverständnis der Eltern bzw. des Vormundes eine schriftliche Einverständniserklärung bezüglich des Studienprotokolls zu erteilen
 - 7) Zustimmung der Kinder selbst

2.6 Exklusionskriterien

Bei Zutreffen folgender Kriterien wird die Versuchsperson nicht zur Studienteilnahme zugelassen:

- 1) Schwangerschaft oder Stillperiode
- 2) Möglichkeit zur Schwangerschaft ist gegeben und es ist kein erkennbarer Wille zu sehen diese zu vermeiden
- 3) Bekannte Hypersensitivität gegen Atovaquon und/oder Proguanil
- 4) Klinisch signifikante Normabweichungen bei den erhobenen hämatologischen und/oder biochemischen Parametern welche den Studienteilnehmer einem erhöhten Risiko im Falle der Teilnahme an der Studie aussetzt
- 5) Vorhandene Absicht das geographische Einzugsgebiet der Studie vor deren Beendigung zu verlassen

- 6) Einnahme jeder Art von Medikamenten, die eine Wirksamkeit gegen Malaria besitzen
- 7) Cholera- oder Typhusimpfung innerhalb der letzten 3 Jahre vor Studienbeginn
- 8) Anzeichen von AIDS oder anderen Immundefekten
- 9) Kinder, von denen eingeschätzt wird, dass sie aus bestimmten Gründen die Studie nicht abschließen werden.

2.7 Behandlung während der Studie

2.7.1 Studienmedikamente und Dosierungen

2.7.1.1 Studienmedikamente und Dosierungen für die Entparasitierungsphase

Zum Zwecke der Entparasitierung wurden Tabletten à 50mg Artesunat verabreicht. Die Dosierung in Abhängigkeit vom Körpergewicht ist in der Tabelle 6 dargestellt.

Die in der Entparasitierungsphase verwendete Dosis von Artesunat betrug durchschnittlich 4mg/kg alle 24 h für drei Tage. Mehr als eine Million Patienten wurden bislang mit Artemisinderivaten behandelt, wobei keine schweren Nebenwirkungen beobachtet werden konnten. Artesunat ist bewiesenermaßen sicher [44], sowohl als Einzelpräparat wie auch in Kombination mit anderen Medikamenten.

Alle Probanden erhielten eine Entparasitierungsmedikation mit nicht-geblindeten Artesunat Tabletten für 3 Tage.

ARTESUNATDOSEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM KÖRPERGEWICHT			
Gewicht des Probanden	11-20 kg	>21-30 kg	>30-40 kg
Artesunat (50mg Tabletten)	1 Tablette täglich für 3 Tage	2 Tabletten täglich für 3 Tage	3 Tabletten täglich für 3 Tage

Tab.6 Artesunatdosen in Abhängigkeit vom Körpergewicht

2.7.1.2 Studienmedikamente und Dosierungen für die Chemoprophylaxe

Für die Chemoprophylaxe werden A-P Tabletten mit einer festen Dosierung von 62,5 mg Atovaquon und 25 mg Proguanilhydrochlorid verwendet, welche von Glaxo Wellcome in Kanada produziert wurden. Das Proguanilhydrochlorid wurde dem Hersteller von Jacobus Pharmaceuticals, Inc. zur Verfügung gestellt.

Nach dem erfolgreichen Absolvieren der Entparasitierungsphase sind die Versuchspersonen in die Chemoprophylaxephase eingetreten und in eine der 2 Behandlungsgruppen randomisiert.

Behandlungsgruppe 1: Atovaquon-Proguanil

Behandlungsgruppe 2: Placebo

Nach der Randomisierung erhielt jedes Kind A-P oder Placebo einmal täglich. Die A-P und Placebotabletten unterscheiden sich weder in Geruch, Form, Größe oder Gewicht, so dass eine äußerliche Unterscheidung unmöglich war. Daher wussten weder das Studienpersonal noch die Versuchspersonen welche Medikation verabreicht wurde. Die in der Chemoprophylaxephase eingesetzte Dosis von A-P ist identisch mit den verwendeten Dosen einer in der Vergangenheit in Gabun durchgeführten Chemoprophylaxestudie [32]. Diese Dosis wurde gut toleriert und hatte eine Wirksamkeit von 100%.

Die zu verabreichende Dosis A-P bzw. Placebo steht in folgender Abhängigkeit vom Körpergewicht:

Dosis von A-P oder Placebo in Abhängigkeit vom Körpergewicht			
Gewicht des Probanden	11-20 kg	21-30 kg	31-40 kg
A-P oder Placebo	1 Tablette täglich	2 Tabletten täglich	3 Tabletten täglich

Tab.7 Dosis von A-P oder Placebo in Abhängigkeit vom Körpergewicht

2.7.1.3 Impfstoffe und Dosierungen für die Typhus und- Choleraimpfung

Das Schweizer Serum und Impfstoffinstitut stellte für die Studie einen attenuierten Lebendtyphusimpfstoff (Ty21a) und eine Choleraimpfung (CVD103-HgR) zur Verfügung. Der Ty21a Impfstoff enthält einen attenuierten Stamm von *Salmonella typhi*. Die CVD103-HgR Vakzine enthält einen attenuierten Stamm von *Vibrio cholerae*.

Drei Wochen nach Beginn der Chemoprophylaxe wurde allen Versuchsteilnehmern ein attenuierter Typhuslebensimpfstoff (Ty21a) sowie eine attenuierte Choleravakzine (CVD103-HgR) appliziert. Jedem Kind werden insgesamt 3 Impfdosen verabreicht. Die erste Impfstoffgabe enthält den Typhus- sowie den Choleraimpfstoff, der Typhusimpfstoff bedurfte jedoch einer weiteren Gabe am 2. und am 4 Tag nach der 1. Applikation. Die beiden Vakzine sind nach Angaben des Herstellers und bezüglich verschiedener Studien [36-38] gut verträglich für Kinder von 3 Jahren an. Eine Dosierung in Abhängigkeit vom Körpergewicht war nicht erforderlich. Die Versuchsteilnehmer erhielten den Impfstoff gemäß den Angaben des Herstellers unter der Auflage der einstündigen Nahrungskarenz eine Stunde vor und nach der Applikation. Es wurde weiterhin darauf geachtet, dass 7 Tage vor und nach der Impfung keine Antibiotikagabe erfolgte.

2.8 Diagnostische Methoden

2.8.1 Malariadiagnostik

Als diagnostisches Mittel zur Feststellung einer Plasmodieninfektion wurde stets ein Dicker Tropfen durchgeführt. Wir führten alle Dicken Tropfen nach der „Lambaréné Methode“ durch wobei es sich um ein standardisiertes Verfahren handelt dessen diagnostische Qualität durch Studien belegt ist [45] und bereits vielfach Verwendung fand. Ein Dicker Tropfen wurde als negativ bewertet wenn in mindestens 100 Ölimmersionsfeldern im Mikroskop kein Parasit sichtbar war.

2.8.2 Bestimmung der Antikörper auf Ty 21a und CVD103-HgR

Die Antikörperserologie wurde in separaten Labors des Produzenten auf Basis gängiger ELISA-Tests durchgeführt.

2.9 Untersuchungen und Evaluierungen der Studienziele

2.9.1 Zeitplan

Ein genauer Zeitplan mit detaillierter Darstellung der einzelnen Studienabschnitte kann der Tabelle 8 entnommen werden. Die Selektion und Evaluierung der einzelnen Studienteilnehmer (Eingangsuntersuchungen) erfolgte bis max. 3 Wochen vor Studienbeginn.

Die Entparasitierungsphase begann eine Woche vor dem Beginn der Chemoprophylaxe. Die dritte Dosis Artesunat wurde 5 Tage vor Beginn der Chemoprophylaxe gegeben.

Tab.8 Zeitplan mit chronologischer Übersicht über durchgeführte Maßnahmen

Woche	Eingangs- untersu- chungen	Entparasitie- rungsphase	Chemoprophylaxephase												Nachsorgeunter- suchungsphase			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Einverständniserklärung	✓																	
Inklusions- und Exklusionskriterien	✓																	
Demographische Daten	✓																	
Anamnese / körperlichen Untersuchung	✓																	
Schwangerschaftstest ²	✓					✓								✓				
Hämatologie/ Klinische Chemie	✓																	
HIV-Antikörpertest	✓																	
Malariadiagnostik (Dicker Tropfen) ³		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
UW Exploration		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Erhebung der Beimedikation		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Artesunatbehandlung ⁴		✓																
Orale Typhus- und Choleraimpfung ⁵						✓												
A-P – Chemoprophylaxe			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Medikamentencompliance		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
BE Typhus- und Cholera Serologie	✓							✓										
BE für molekularbiologische Parasitologie	Stets bei Entwicklung einer Parasitämie während Chemoprophylaxe u.- Nachsorgephase																	

1. Chemoprophylaxe kann bis zu Woche 20 fortgesetzt werden
2. Zu Beginn, in Woche 4, am Ende der Chemoprophylaxegabe und stets bei Verdacht einer Schwangerschaft
3. Dicker Tropfen vor und 7 Tage nach Entparasitierung, danach wöchentlich und stets bei Verdacht auf Malaria und bei vorzeitigem Abbruch
4. dreitägige Medikamentengabe (Artesunat) unter Aufsicht während der Entparasitierungsphase
5. orale Typhusimpfung mittels 3 Dosen in Woche 4, Orale Choleraimpfung simultan mit der ersten Dosis der Typhusimpfung

2.9.1.1 Qualitätssicherung

Sämtliche Probanden mussten die Inklusions- und Exklusionskriterien aus Kap. 2.5 und 2.6. erfüllen. Die unterschriebenen Einverständniserklärungen müssen mit Beginn der Eingangsuntersuchung vorliegen.

2.9.1.2 Eingangsuntersuchung

Klinische Untersuchung: Die Eingangsuntersuchung potentieller Probanden umfasste folgende Maßnahmen:

- Erhebung allgemeiner Personendaten (Geburtsdatum, Geschlecht, Größe und Gewicht)
- Allgemeine Anamneseerhebung (Abklärung einer eventuell stattgehabten Plasmodieninfektion in den letzten 4 Wochen vor Studienbeginn)
- Erhebung der Medikamentenanamnese
- Körperliche Untersuchung (einschließlich Vitalfunktionen)

Laboruntersuchungen:

- Hämoglobinkonzentration
- Leukozytenzahl
- Thrombozytenzahl
- Kreatinin
- Alaninaminotransferase (ALT)
- Gesamtbilirubin
- Dicker Tropfen zur Malariadiagnostik
- Urinuntersuchung auf β -HCG (Schwangerschaftstest)
- Serumgewinnung zur Quantifizierung eines evtl. Cholera und/oder Typhusantikörpertiter

2.9.1.3 Entparasitierungsphase

Unmittelbar vor Verabreichung der ersten Dosis Artesunat wurde jedem Kind ein Dicker Tropfen und 3 ml Vollblut entnommen. Die Begleitmedikation, eventuelle Nebenwirkungen und Compliance werden an jedem der 3 Tage der Artesunatgabe erhoben.

2.9.1.4 Chemoprophylaxephase

Die Versuchskohorte trat am Tag 1 in die Chemoprophylaxephase ein und begleitete diese mindestens 12 Wochen. Die einzelnen Versuchspersonen erhielten entweder Malarone oder Placebo gemäß ihrer Randomisierungsnummer. Parallel stattfindende Medikation, Nebenwirkungen und Compliance werden täglich geprüft.

Ein Dicker Tropfen wurde vor Beginn der Chemoprophylaxe erhoben, einmal wöchentlich, stets bei Verdacht auf Malaria, und zum Zeitpunkt eines eventuellen Studienabbruchs.

Bei einem positiven Dicken Tropfen wurden stets 3 Blutproben entnommen:

1. 5ml zur pharmakokinetische Analyse
2. 3ml zur molekularbiologischen Diagnostik
3. 3ml werden kryokonserviert und zur *in vitro* Kultur für Resistenzprüfungen herangezogen

Die Zeitspanne zwischen der letzten Medikamentengabe und der Blutabnahme ist stets dokumentiert worden.

Drei Wochen nach Beginn der Chemoprophylaxe erhielten alle Studienteilnehmer die Cholera- und Typhusimpfungen. Vor der Impfgabe unterzogen sich alle weiblichen Teilnehmerinnen im gebärfähigen Alter einem Schwangerschaftstest (Urinuntersuchung auf β -HCG). Bei negativem Befund kann die Impfgabe wie folgt beginnen:

Tag 0: Gabe von Ty21a (Dosis1) und CVD103-HgR (Dosis1)

Tag 2: Gabe von Ty21a (Dosis2)

Tag 4: Gabe von Ty21a (Dosis3)

Nach einem Zeitraum von 14 Tagen wurde eine Blutprobe zur Analyse der Cholera- und Typhusantikörpertiter genommen.

Nach Abschluss der Chemoprophylaxe wurde nochmals ein Schwangerschaftstest (Urinuntersuchung auf β -HCG) durchgeführt.

2.9.1.5 Nachuntersuchungsphase

Auch in der Nachuntersuchungsphase wurden täglich die aktuelle Begleitmedikation, Nebenwirkungen und Compliance ermittelt. Einmal wöchentlich und in jedem Falle eines Verdachts auf Malaria wurde der Versuchsperson ein Dicker Tropfen entnommen. Weiterhin wurden 5 ml Vollblut zur Kryokonservierung und anschließender *in vitro* Kultivierung zur Resistenzprüfung entnommen.

2.9.2 Demographie

Die demographischen Evaluierungen der Testpersonen umfassen Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht. Weiterhin wurde die Anamnese erhoben, eine körperliche Untersuchung durchgeführt und alle relevanten Daten gesammelt, die eine endgültige Entscheidung über den Einschluss in die Studie erlaubten.

Alle weiblichen Probandinnen im gebärfähigen Alter mussten sich zum Zeitpunkt der Eingangsuntersuchungen einem Schwangerschaftstest unterziehen.

2.9.3 Wirksamkeit

Das primäre Endziel der Studie ist die Wirksamkeit der Chemoprophylaxe, die durch die Vermeidung von Parasitämien bei den Testpersonen determiniert wird. Ein Dicker Tropfen wurde unmittelbar vor und 7 Tage nach dem Beginn der Entparasitierungsphase, einmal wöchentlich und während der Chemoprophylaxegabe stets im Falle eines Malariaverdachts angefertigt.

Er wurde nach Giemsa (Standardverfahren) gefärbt. Er ist der einzige definitive Test um eine *Plasmodium falciparum* Malaria zu bestätigen.

Die Parasitenzahl wurde nach oben genannter Methode [45] bestimmt und als Parasitenzahl/ μ l angegeben. Ein Präparat gilt als negativ, wenn nach 100 Ölimmersionsfeldern im Mikroskop kein Parasit gefunden wurde.

Um neu stattgefundenen Infektionen von einer Rekrudeszenzen unterscheiden zu können, wurden die Parasiten von der ersten Blutentnahme zu Studienbeginn mit denen vom Zeitpunkt des Auftretens einer Malaria genetisch verglichen. Dazu wurden zu beiden Terminen 3 ml Vollblut EDTA abgenommen.

2.9.4 Typhus und- Choleraantikörpertiteruntersuchung

Blutproben zur Bestimmung der Titer von IgG and IgA anti-*S.typhi*-Lipopolysaccharid (LPS) und von anti-*V.cholerae* LPS werden im Rahmen der Eingangsuntersuchungen und in Woche 5 entnommen.

Die Weiterverarbeitung der Proben und die Bestimmung der immunologischen Messwerte erfolgt durch das „Swiss Serum and Vaccine Institute“.

2.9.5 Verträglichkeit

Die folgenden Parameter werden evaluiert:

- Medizinische Anamnese und körperliche Untersuchung
- Schwangerschaftstest (zur Eingangsuntersuchung, am Ende der Studie, und stets bei Verdacht)
- Hämatologie (kleines Blutbild) und Biochemie
- Nebenwirkungen (tägliche Evaluierung während der Entparasitierungsphase, täglich während der Chemoprophylaxe wöchentlich während der Nachsorgephase)

2.10 Frühzeitige Beendigung der Studie

Alle Probanden durften die Studie zu jedem Zeitpunkt frühzeitig beenden. Weiterhin konnte jeder Proband zu jeder Zeit von der Studie ausgeschlossen werden, wenn sich dies erforderlich zeigte. Bei einem vorzeitigen Abbruch der Studie wurde nach Möglichkeit versucht, folgende Untersuchungen durchzuführen:

- Klinische Untersuchung
- Schwangerschaftstest (Nachweis von β -HCG im Urin)
- Untersuchung auf potentielle Nebenwirkungen
- Begleitmedikation
- Sicherstellung unbenutzter Studienmedikamente
- Untersuchung der Compliance
- Evaluierung der Wirksamkeit des Medikaments

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Untersuchungen auf Wirksamkeit und Verträglichkeit

Von allen 1040 Schülern der Lalala – Schule in Lambaréné erklärten sich insgesamt 376 Schüler und deren Eltern zur Teilnahme an der Studie bereit, wovon sich 355 den Eingangsuntersuchungen unterzogen. Im Rahmen der Eingangsuntersuchungen mussten 25 Schüler aus folgenden Gründen ausscheiden: drei wegen erhöhter Alaninaminotransferaseaktivität, eines aufgrund eines zu niedrigen Hämoglobin-Wertes, ein weiteres zog seine Einverständniserklärung zurück, 3 waren verzogen und 17 Kinder schieden aufgrund klinischer Auffälligkeiten aus (Abb.8).

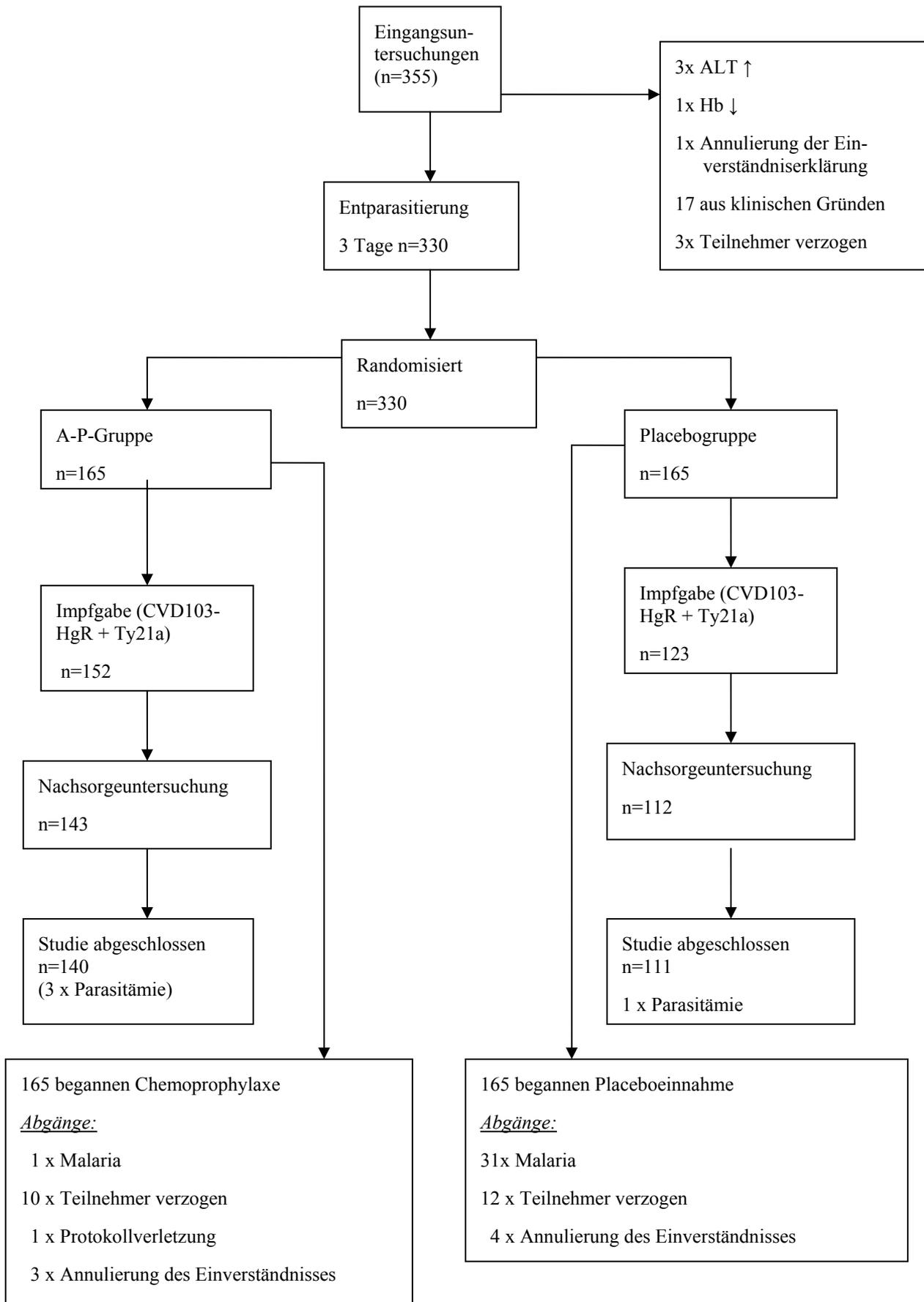
Folglich wurden 330 Kinder in die Studie aufgenommen und randomisiert einer der beiden Behandlungsgruppen zugewiesen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich Demographie, Laborwerten, Vitalzeichen und parasitärischen Werten. (Tabelle 9)

Vor dem Beginn der Entparasitierung hatten 112 Kinder (34%) einen positiven dicken Tropfen, davon 106 *Plasmodium falciparum*, 4 *Plasmodium malariae* und 2 *Plasmodium ovale*. Nach Beendigung der Entparasitierungsphase, d.h. am Tag 7 fanden sich lediglich bei einem der 330 Kinder noch ein positiver Dicker Tropfen (*Plasmodium malariae*), Von Tag 0 bis Tag 21 entwickelten 6 Kinder, die nach Abschluss der Placebogruppe zugerechnet werden konnten, eine Parasitämie, von denen 5 bereits vor der Entparasitierung parasitärisch waren. Eine dreitägige Behandlung mit Artesunat 4mg/kg KG führte bis zum Tag 21 nach Behandlungsbeginn bei 53 von 58 parasitärischen Kindern in der Placebogruppe zu einem negativen Dicken Tropfen

Bei insgesamt 36 von 330 Kindern wurden im Rahmen der Entparasitierung potentielle Nebenwirkungen beobachtet, jedoch keine einzige ernsthafter oder schwerwiegender Natur.

Im Verlauf der Chemoprophylaxe wurde bei 42% der Teilnehmer in der Placebogruppe und bei 44% in der A-P-Gruppe Nebenwirkungen registriert. Der Großteil davon war passager und sehr milde in ihrem Verlauf, wobei die am häufigsten aufgetretenen Nebenwirkungen in Tabelle 10 verzeichnet sind. Es ergab sich keine statistisch signifikante Häufung einer Nebenwirkung in einer der beiden Gruppen. Kein einziges diesbezügliches Ereignis führte zur Unterbrechung der Studienteilnahme. Folglich kann man sagen, dass die A-P Chemoprophylaxe sich als gut verträglich darstellte.

Abb.8: Reihendiagramm zur Zurechnung der Teilnehmer zu den entsprechenden Gruppen



Tab. 9 Randomisierungsparameter

Parameter	A-P-Gruppe N=165 *	Placebogruppe N=165*
Männlich/weiblich	76/89	76/89
Alter in Jahren	8,8 (2,4)	8,5 (2,3)
Gewicht (kg)	26 (7,4)	26 (7,6)
Parasitämie (gesamt): Anzahl der Teilnehmer (%)	54 (33)	58 (35)
<i>Davon P.falciparum</i>	51 (31)	55 (33)
Vitalzeichen		
Systolischer Blutdruck (mm Hg)	93 (10)	94 (12)
Diastolischer Blutdruck (mm Hg)	51 (8)	50 (10)
Herzfrequenz (/min)	90 (14)	87 (14)
Temperatur (°C)	36.5 (0,5)	36.5 (0,5)
Laborergebnisse		
Hämoglobin (g/dL)	10,6 (1,2)	10,6 (1,3)
Leukozyten (10 ⁹ /L)	6.9 (2,2)	7.2 (2,2)
Thrombozyten (10 ⁹ /L)	256 (80)	265 (87)
Kreatinin (µmol/L)	67 (8)	66 (7)
Gesamtbilirubin (µmol/L)	13,1 (4,5)	14,8 (8,0)
Alaninaminotransferase (ALT) (IU/L)	33 (16)	31 (13)

* Daten als Mittelwerte (Standardabweichung)

Tab.10: Vergleich der UW zwischen den beiden Gruppen

	ENTPARASITIERUNG (N=330)	CHEMOPROPHYLAXE *			
		A-P (N=165)		PLACEBO (N=165)	
	FÄLLE	FÄLLE	ID	FÄLLE	ID
Anzahl der Teilnehmer mit registrierten Nebenwirkungen	36 (11)	73 (44)	1,90	70 (42)	2,13
Kopfschmerzen	12 (4)	22 (13)	0,57	22 (13)	0,67
Abdominelle Beschwerden	11 (3)	22 (13)	0,57	13 (8)	0,40
Husten	4 (1)	16 (10)	0,42	17 (10)	0,52
Fieber	5 (2)	9 (5)	0,23	19 (12)	0,58
Erbrechen	5 (2)	9 (5)	0,23	5 (3)	0,15
Diarrhöe	1 (<1)	2 (1)	0,05	8 (5)	0,24

Fälle: Anzahl (%) der Patienten (Behandlungsassoziierte Nebenwirkungen in $\geq 5\%$ der Teilnehmer in der A-P und-Placebogruppe während der Chemoprophylaxephase)

*Behandlungsassoziierte Nebenwirkungen mit Beginn während der Chemoprophylaxephase.

ID: Inzidenz

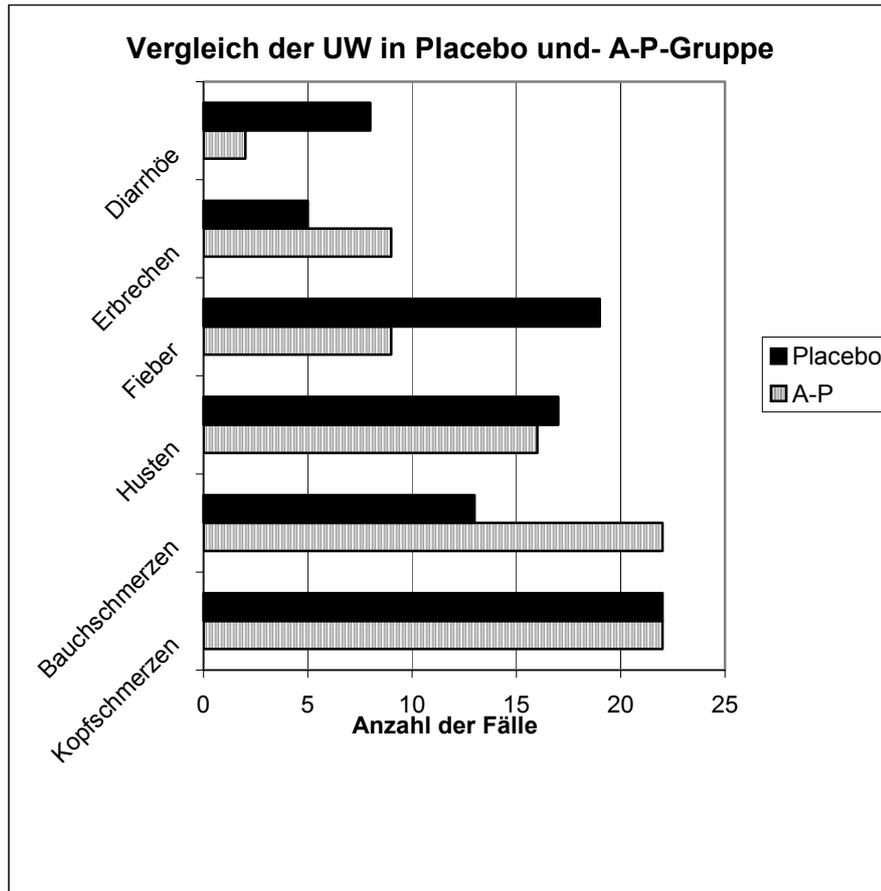


Abb.9 Verteilung der UW in Placebo und- A-P-Gruppe

Von den 330 ausgewählten Teilnehmern wurden randomisiert 165 der Placebogruppe und ebenfalls 165 der A-P-Gruppe zugeteilt. Im Verlauf der Studie stellten 18 Teilnehmer der Placebogruppe und 19 der A-P-Gruppe ihre Teilnahme aus nicht mit der Studienmedikation assoziierten Gründen ein. Während einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen, das entspricht 30,7 Personenjahren, wurden in der Chemoprophylaxephase bei 31 Kindern positive Dicke Tropfen gefunden, was einer Inzidenzdichte von 1,01 Erkrankungsfälle pro Jahr entspricht. In einem Beobachtungszeitraum von 36,9 Personenjahren in der A-P-Gruppe wurde bei einem Kind ein positiver Dicker Tropfen gefunden, was wiederum einer Inzidenz von 0,03 Erkrankungsfällen pro Jahr entspricht. Dies ergibt eine Wirksamkeit von 97% (Tabelle11).

Tabelle 11: Wirksamkeit der Behandlung (Behandlungspopulation laut Protokoll)

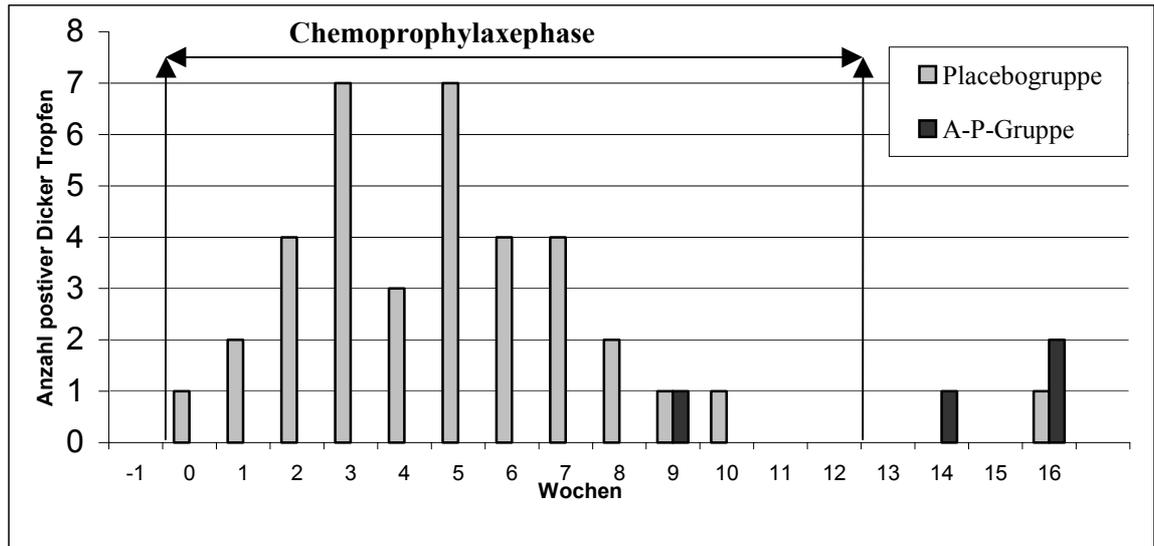
	CHEMOPROPHYLAXE			NACHUNTERSUCHUNGSPHASE	
	A-P N=150	PLACEBO N=144	P-WERT	A-P N=143	PLACEBO N=112
Teilnehmer mit pos. Dicken Tropfen (%)	1 (<1)	31 (22)	<0,01	3 (2)	1 (<1)
Inzidenzdichte	0,03	1,01			
Wirksamkeit (95 %CI; (79-100%))	97 % (79-100%)				

Wirksamkeit wurde berechnet aus der Formel $100 \times [1 - (\text{Anteil parasitämischer Kinder in der A-P-Gruppe} / \text{Anteil parasitämischer Kinder in der Placebogruppe})]$ – nur *P.falciparum*.

Gruppenvergleich nach Mantel-Haenszel-Test (Einteilung nach Gewicht)

Ein Teilnehmer aus der A-P-Gruppe wies bei der parasitologischen Untersuchung einen positiven Dicken Tropfen in der 9. Woche der Chemoprophylaxephase auf. Dieses Kind befand sich am unteren Ende der Gruppe 3 (Einteilung nach Gewicht) und wog 33 kg und erhielt demnach 3 Tabletten der A-P-Kombination täglich. Zum Zeitpunkt der parasitologischen Blutentnahme wies es einen Plasmaspiegel von Atovaquon 3,8 µg/mL, von Proguanil 22,3 ng/l und von Cycloguanil einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze auf. Diese Werte waren vergleichbar mit denen der Wochen 3 und 5 dieses Kindes und liegen im Bereich der bei anderen Kindern dieser Gewichtsklasse gemessenen Werte (ca. ein Drittel aller Kinder in dieser Gewichtsklasse hatte niedrige oder nicht bestimmbare Cycloguanil-Plasmaspiegel).

Im Rahmen der Nachuntersuchung im Anschluss an die Chemoprophylaxephase, in der die Kinder keine Studienmedikation mehr erhielten, traten vier positive Dicke Tropfen auf, drei davon in der A-P-Gruppe und einer in der Placebogruppe. Die drei positiven Fälle in der A-P-Gruppe ereigneten sich in den letzten beiden Wochen der Nachuntersuchungsphase in denen keine ausreichenden Plasmaspiegel mehr vorhanden sein können, und eine Infektion nach dem Ende der Medikamentengabe stattgefunden haben muss. Von den insgesamt 41 positiven Dicken Tropfen während der Chemoprophylaxephase und der Nachuntersuchung entfielen die meisten (36) auf *P. falciparum*, 4 auf *P. malariae* und einer auf *P. ovale*.



.Abb.10 Verteilung der positiven Dicken Tropfen in beiden Gruppen

3.2 Interaktionen mit oralen, attenuierten Lebendimpfungen Ty21a und CVD103-HgR

Weiterhin wurde die *in vitro* Aktivität von Proguanil auf CVD103-HgR und Ty21a gemessen. Hierbei fanden wir eine maximale Hemmstoffkonzentration (MHK) von Proguanil $>50\mu\text{g/ml}$ auf CVD103-HgR und von $>200\mu\text{g/ml}$ auf Ty21a, was eine gewisse antibakterielle Aktivität von Proguanil *in vitro* aufzeigt. Als Hauptanliegen galt jedoch, den *in vivo* Effekt von einer A-P-Medikation auf die IgG und IgA Antikörperantwort von CVD103HgR und Ty21a zu bestimmen. Hierfür standen Plasmaproben zur Verfügung die sowohl in der Placebo- als auch in der A-P-Gruppe vor bzw. nach der Impfgabe abgenommen wurden. Ein Kind wurde aufgrund heftigen Erbrechens nach Einnahme der Impfungen ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13-14 dargestellt. Der geometrische Mittelwert vor der Impfung mit CVD103-HgR betrug in der Placebogruppe 144 bzw. 139 in der A-P-Gruppe, nach der Impfung 198 in der Placebogruppe bzw. 229 in der A-P-Gruppe, wodurch davon auszugehen ist, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen existiert (Tab.13). Die Rate der Antikörperantworten auf die CVD103-HgR Impfung war dagegen recht gering mit 22% in der Placebogruppe bzw. 27% in der A-P-Gruppe. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Anstiegs des *V.cholerae*-LPS-Antikörpertiters nach CVD103-HgR-Impfung ($p=0.64$). Weiterhin untersuchten wir den Zusammenhang zwischen dem Choleraantikörpertiter vor Impfgabe und der Tendenz zur Serokonversion nach Impfgabe. Bei dieser Untersuchung sank die Serokonversionsrate mit zunehmenden Anfangstitern ($p<0.01$) (Tab.12, Abb.11).

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen dem Choleraantikörpertiter vor Impfgabe (Ausgangstiter) und der Serokonversion nach Impfgabe

AUSGANGSTITER CVD103-HGR	ANZAHL SEROKONVERT. TEILNEHMER / ANZAHL GEIMPFTER TEILNEHMER (%)
<20	6/6 (100)
20-40	1/1 (100)
40-80	13/21 (62)
80-160	28/118 (24)
≥160	20/129 (16)

Der Zusammenhang war statistisch signifikant ($p < 0.01$ runs test, post-hoc Analyse).

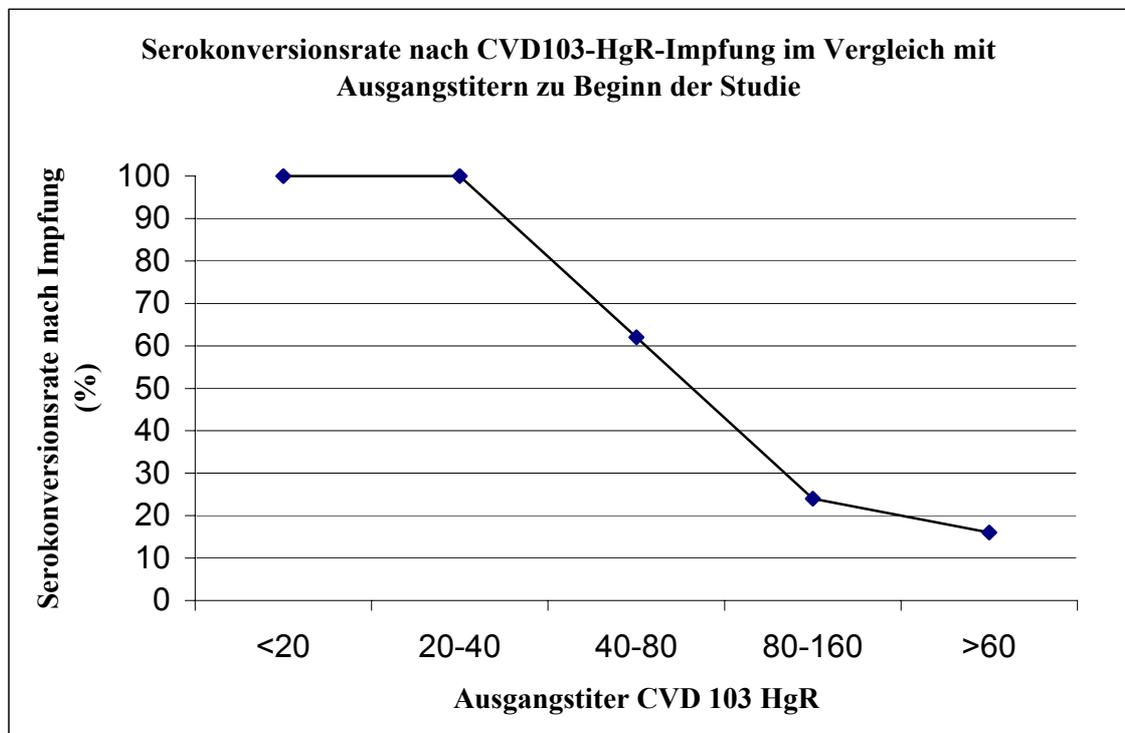


Abb.11

Der Lebendimmunisierung mit CVD103-HgR und Ty21a folgte ein Anstieg der anti-*S. typhi* IgG und IgA Antikörpertiter in beiden Gruppen, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tab.13). Die anti-*S.typhi* IgG LPS Serokonversionsrate lag bei 67% in der Placebogruppe und 74% in der A-P-Gruppe (Tab.14), die anti-*S.typhi* IgA LPS Serokonversionsrate hingegen lag bei 33% in der Placebo und 45% in der A-P-Gruppe (Tab.14). Es gab wiederum keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen bezüglich des Titers von anti-*S.typhi* IgG und IgA nach der Impfung ($p=0.96$ für IgG bzw. 0.07 für IgA) (Tab.13).

Tab.13 Mittlere Serum Antikörpertiter für *S. typhi* and *V. cholerae*

Antikörper	n	A-P	n	Placebo	P-value ^b
<i>S. typhi</i> (IgG) (EU/ml) ^a					
Prävakzinal	165	4,98 (1,43)	164	5,17 (1,28)	0.96
Postvakzinal	152	19,90 (1,21)	123	19,98 (1,27)	
Differenz	152	3,96 (1,17)	123	3,93 (1,16)	
<i>S.typhi</i> (IgA) (EU/ml) ^a					
Prävakzinal	165	1,11 (1,20)	164	1,29 (1,16)	0.07
Postvakzinal	152	2,63 (1,13)	123	2,41 (1,12)	
Differenz	152	2,33 (0,87)	123	1,91 (0,96)	
<i>V. cholera</i> LPS ^a					
Prävakzinal	165	138,7 (1,0)	165	143,5 (1,2)	0.64
Postvakzinal	152	229,4 (1,0)	123	198,2 (1,0)	
Differenz	152	1,65 (1,1)	123	1,60 (1,0)	

^a geometrische Mittelwerte (Standardabweichung) .

^b Gruppenvergleich mittels t-Test zum Vergleich zwischen Ausgangstiter und Titer nach erfolgter Impfung unter Verwendung von log-transformierten Daten.

Tab.14 *S. typhi* and *V. cholera* Serokonversionsraten

Antikörper	A-P n=152		Placebo n=123	
	Positiv ^a n (%)	Negativ n (%)	Positiv ^a n (%)	Negativ n (%)
<i>S. typhi</i> IgG	112 (74)	40 (26)	83 (67)	40 (33)
<i>S. typhi</i> IgA	69 (45)	83 (55)	40 (33)	83 (67)
<i>V. Cholera</i> LPS	41 (27)	111 (73)	27 (22)	96 (78)

^a Als erfolgte Serokonversion wurde eine ≥ 2 -fache Erhöhung des *S. typhi*-Antikörpertiters und eine ≥ 4 -fache Erhöhung des *V. cholera*-Antikörpertiters angenommen.

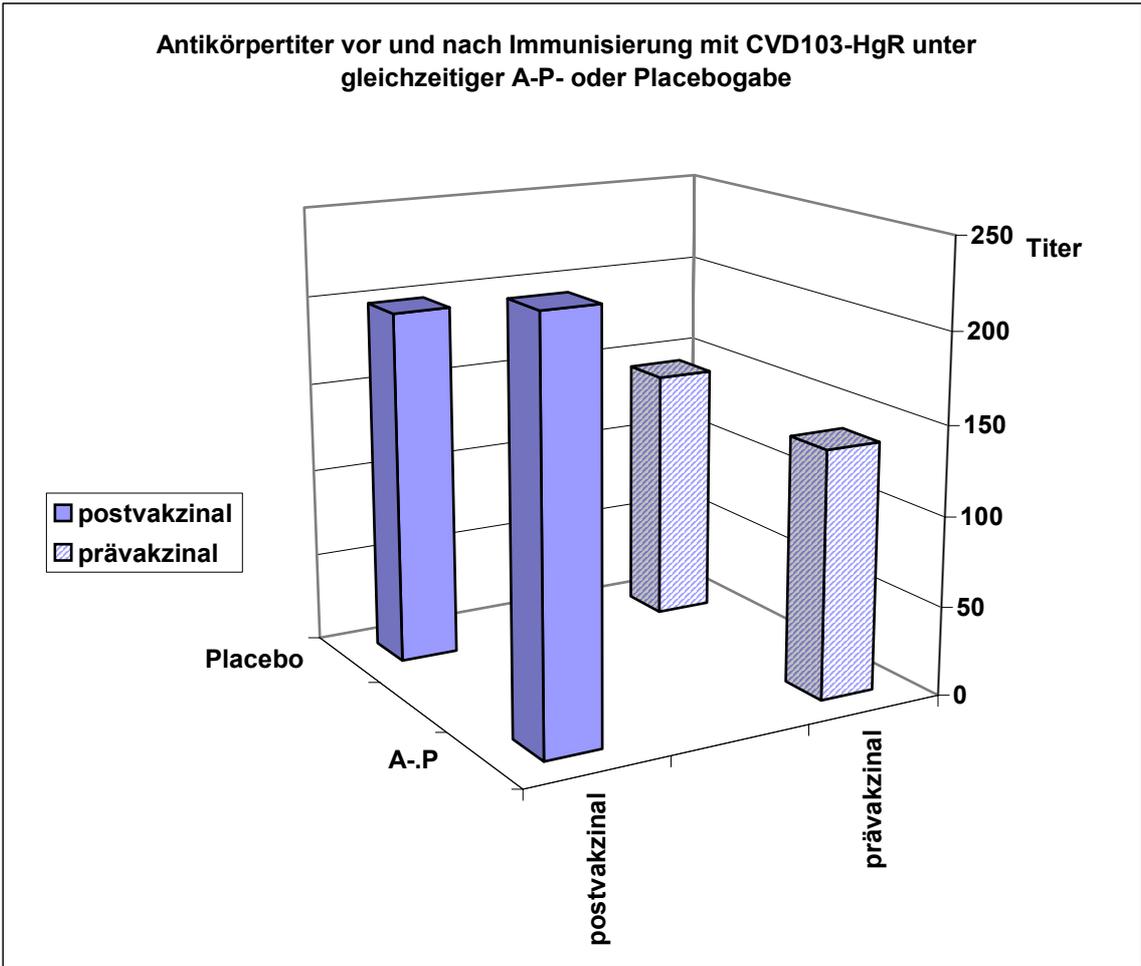


Abb.12

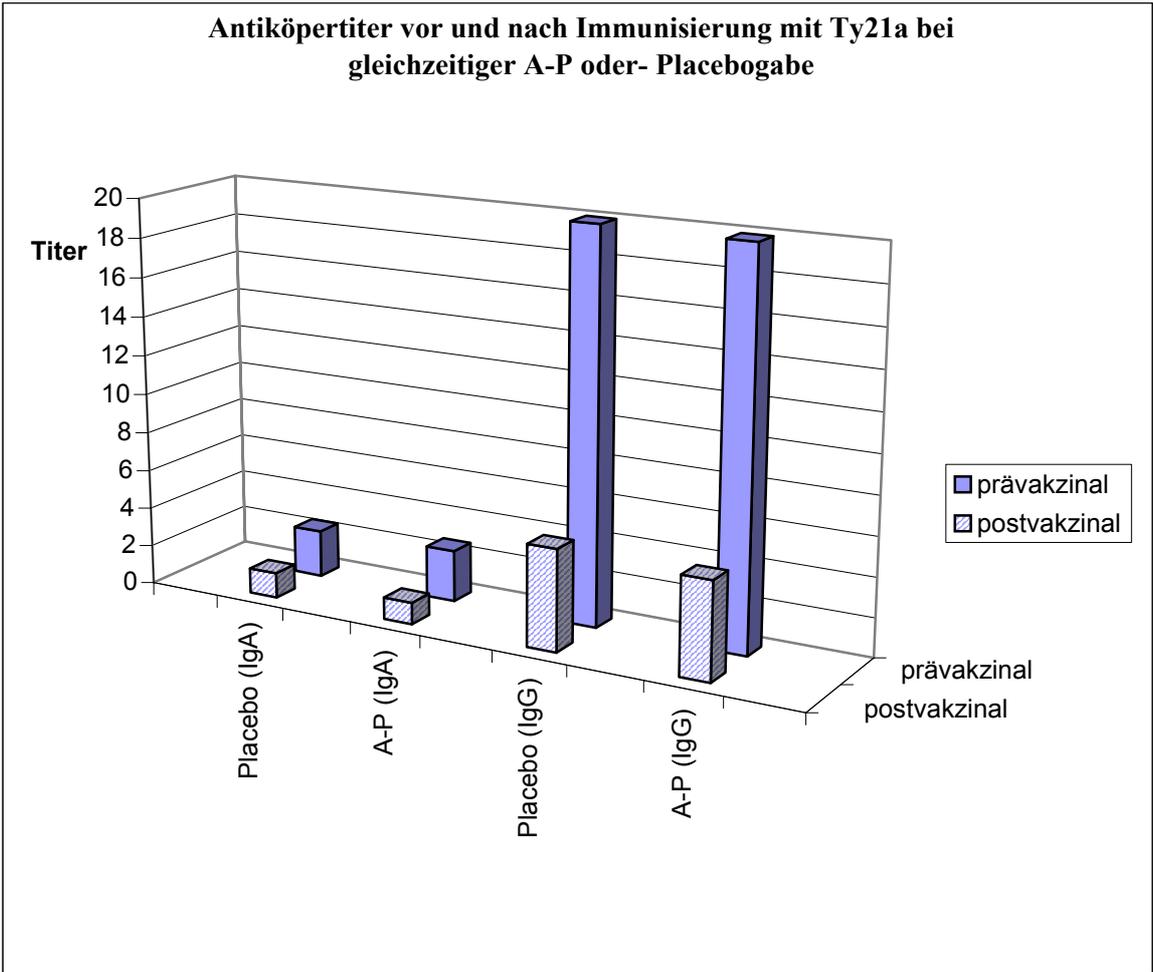


Abb.13

4 Diskussion

Das Ziel der Studie bestand darin, die pädiatrische Formulation von Atovaquon - Proguanil in ihrer Wirksamkeit und Sicherheit zu bestätigen und des Weiteren ihren Einfluss auf die Immunogenität der attenuierten, oralen Lebendvaccine CVD103-HgR und Ty21a aufzuzeigen.

Die hohe Wirksamkeit der A-P-Medikation in der Prophylaxe der Malaria ist bereits in verschiedenen Studien mit insgesamt 677 Teilnehmern (davon 265 Kinder und 479 Erwachsene) in Gebieten mit hoher Chloroquinresistenz belegt worden [29]. Vor allem die Ergebnisse der Studie von Lell et al [32], die an identischer Stelle durchgeführt wurde, konnten bezüglich der Wirksamkeit der Chemoprophylaxe mit Atovaquon-Proguanil bestätigt werden. Damals erreichte man eine Wirksamkeit von 100% (95%KI: 83-100%). Anhand der nun vorliegenden Studie konnte der Sachverhalt, dass die A-P-Medikation eine sehr hohe Wirksamkeit besitzt, erneut erhärtet werden.

In dieser Studie wurde eine Schutzwirkung von 97% erzielt, was vergleichbar mit den in den vorangegangenen Studien erzielten Ergebnissen ist, in der Wirksamkeiten von 95% bis 100% beobachtet wurden. Der Zusammenhang zwischen den Plasmaspiegeln der Studienmedikation und der Wirksamkeit in der Chemoprophylaxe wurde neulich noch einmal überarbeitet. Dabei wurde festgestellt, dass bei 2 von insgesamt 269 Teilnehmern, die trotz der A-P-Chemoprophylaxe eine Parasitämie entwickelten, ein sich im therapeutischen Bereich befindender Atovaquon-Plasmaspiegel vorlag, jedoch die Proguanil und Cycloguanilplasmaspiegel subtherapeutisch waren[29].

Aufgrund der hohen Wirksamkeit der A-P-Medikation entwickelte lediglich ein Patient eine Parasitämie. Er wies wiederum niedrige Proguanil- und Cycloguanilplasmaspiegel auf, welches einen Zusammenhang zwischen Behandlungsfehlern und niedrigen Plasmaspiegeln nahe legt. Jedoch wurden in der gleichen Studie bei 12 respektive 24 weiteren Patienten niedrige Plasmaspiegel für Proguanil bzw. Cycloguanil gefunden, von denen alle die Studie ohne Entwicklung einer Parasitämie abschlossen. Das bedeutet, dass bei einem von 12 Teilnehmern mit niedrigen Proguanil-Plasmaspiegeln zum Zeitpunkt der Parasitämie bzw. bei einem von 24 mit niedrigen Cycloguanil-Plasmaspiegeln eine Parasitämie auftrat. Die Tatsache, dass in der afrikanischen Bevölkerung bis zu 20% eine partielle oder vollständige Defizienz der verschiedenen Isoformen des Cytochrom P450 zeigen, das für die Konversion von Proguanil zu Cycloguanil verantwortlich ist, könnte eventuell erklären, warum ca. ein Drittel aller Kinder niedrige bzw. nicht bestimmbare Plasmaspiegel für Cycloguanil besaßen [27,28].

Weiterhin treten vor allem in Gegenden mit niedrigem hygienischem Standard gehäuft parasitäre Infektionen des Darms auf, zum Beispiel durch *Gardia lamblia* oder *Entamoeba histolytica*, die unter anderem zu einem Malabsorptionssyndrom mit konsekutiver Erniedrigung der Bioverfügbarkeit einzelner Medikamente führen können.

Unser primäres Studienziel war es, die Hypothese zu bestätigen, dass eine neue pädiatrische Formulation von A-P mit Proguanilhydrochlorid eines anderen Herstellers zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit führen würde, wie in der ersten pädiatrischen Studie von 1996 von Lell et al [32] und den Untersuchungen an erwachsenen Probanden [30,31]. Die nun vorliegende Studie zeigt einmal mehr die gute Verträglichkeit des Medikaments und damit die Sicherheit in der Anwendung. Alle registrierten Nebenwirkungen überwogen in der Placebogruppe bis auf abdominelle Beschwerden, deren relative Häufigkeit in der A-P-Gruppe leicht größer war, jedoch war nirgendwo ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar. Dieses Ergebnis deckt sich in etwa mit den Resultaten der vorangegangenen Studien, in denen ein identisches Spektrum an Nebenwirkungen beobachtet wurde und ebenfalls keine relative Häufung einer Nebenwirkung in der A-P-Gruppe bestand [29,32].

Bei der Betrachtung der hier aufgeführten Nebenwirkungen fällt auf, dass, zum Beispiel im Vergleich zu anderen Studien in Europa oder Nordamerika, in beiden Gruppen eine erhöhte Häufigkeit sämtlicher Symptomaten festgestellt wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Teilnehmer der Studie zu einem überwiegenden Teil aus einem sozial niedrig gestellten Umfeld zusammensetzten, was ebenfalls schlechte hygienische Standards wie mäßige Trinkwasserqualität impliziert und somit verschiedene Infektionen stark begünstigt. Diese Ergebnisse dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass es sich bei Atovaquon-Proguanil um ein sehr sicheres Medikament handelt, was besonders auch bei pädiatrischen Patienten über lange Zeit angewendet werden kann, ohne dabei ernsthafte Nebenwirkungen befürchten zu müssen. Natürlich ist diesbezüglich, sowohl in Entwicklungsländern wie auch in der westlichen Welt, auch immer eine gewisse psychologische Komponente involviert.

So besteht aus in Anbetracht der geringen Nebenwirkungen des Medikaments kein Hindernis mehr, eine dauerhafte Behandlung von Kindern in malariaendemischen Gebieten, zum Beispiel im Rahmen des „Malarone Donation Programme“, durchzuführen [46]. Hier kann man erstmals über lange Zeit ein Medikament zur Prophylaxe und Behandlung der Malaria anwenden und sich gleichzeitig sehr sicher sein, dass mindestens 95% der behandelten Personen geheilt werden bzw. nicht an Malaria erkranken werden und dies alles in Anbetracht der Tatsache, dass man selbst bei langfristiger Anwendung kaum mit ernsthaften Nebenwirkungen von Seiten des Medikaments zu rechnen hat.

Dagegen muss man bei dem weit verbreiteten Alternativmedikament zur Chemoprophylaxe Mefloquin mit einem breiten Nebenwirkungsspektrum von allergischen Hautreaktionen bis hin zu psychotischen Reaktionen rechnen, das aus Gründen der Sicherheit bezüglich einer langfristigen Anwendung sicher schlechter geeignet ist als Atovaquon - Proguanil, zumal ein promptes Absetzen der Mefloquin-Chemoprophylaxe aufgrund der langen Halbwertszeit des Medikaments nicht zur sofortigen Reduktion der Nebenwirkungen führt [47].

Dahingegen wurde vor kurzem in Nigeria ein Fall einer *in vitro* bestätigten Resistenz gegen Atovaquon bei einer *Plasmodium falciparum* Infektion bekannt, bei dem eine Mutation des Enzyms Cytochrom b des Parasitengenoms gesehen wurde, bei der an Stelle 268 Tyrosin gegen Asparginat ausgetauscht war (Tyr268Asn). Der Patient zeigte nach erfolgter dreitägiger Behandlung mit Atovaquon-Proguanil eine Rekrudescenz der Parasitämie am Tag 28 [48]. Es bleibt zu hoffen, dass die Verbreitung dieser Mutation, die wie gesehen, zu einem zumindest verminderten Ansprechen auf Atovaquon führt, nicht allzu schnell fortschreitet. Dies liegt in meiner Erwartung, da das Präparat schon allein aufgrund seiner günstigen Pharmakokinetik eine rasche Resistenzentwicklung nicht erwarten lässt. Bei dem in unserer Studie aufgetretenen Parasitämie unter A-P-Medikation handelte es sich nicht um eine *in vitro* bestätigte Resistenz des Parasiten auf eine der beiden Komponenten. Sie ist wie bereits diskutiert, aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine nicht ausreichende Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten des Proguanils Cycloguanil zurückzuführen.

Die dreitägige Artesunatgabe heilte 91% von 58 parasitämischen Kindern der Placebogruppe, so dass nur 5 Kinder innerhalb von 21 Tagen nach Beginn der Entparasitierung eine Rekrudescenz zeigten. Es muss hierbei darauf hingewiesen werden, dass kein anderes Medikament, außer dem Studienmedikament selbst und eventuell Chinin, eine ähnlich hohe Wirksamkeit bei einem ebenfalls geringem Nebenwirkungsspektrum gezeigt hätte. Eine Vorbehandlung mit Mefloquin wäre aufgrund seiner langen Halbwertszeit und seiner nicht unbeträchtlichen Nebenwirkungen, vor allem bezüglich psychischer Affektionen, unpassend. Auch Chinin scheidet aufgrund seines ungünstigen pharmakodynamischen Profils aus. Halofantrinderivate erschienen als nicht geeignet da keine höhere Wirksamkeit als Artesunat nachgewiesen ist. Zusätzlich hätte man aufgrund der kardialen Nebenwirkungen EKG-Kontrollen durchführen müssen.

Jedoch muss an dieser Stelle davor gewarnt werden, die Ergebnisse der Entparasitierung ohne Weiteres auf die Behandlung unkomplizierter Malaria auszudehnen, da es sich bei dem Kollektiv parasitämischer Kinder nicht um klinisch auffällige Malariafälle handelte und der Median der Parasitämien lediglich 620/ μ l betrug. Er ist damit um sehr vieles niedriger als man es von Patienten mit Malaria erwarten würde.

Auffallend war die hohe Inzidenz der initialen Parasitämien vor Eintritt in die Entparasitierungsphase. Es gab bei 112 von 330 Kindern, das sind knapp 34%, einen positiven Parasitennachweis. Der Median der Parasitämien betrug 620/ μ l. Dies deckt sich in etwa mit den Ergebnissen anderer Studien, die in Lambaréné und Umgebung durchgeführt wurden [6,[32]. Dort wurden ebenfalls annähernd 30%, bei der Vorgängerstudie 1998 von Lell et al sogar 36% der Studienkohorte, initial positiv auf *P.falciparum* getestet. Es zeigt einmal mehr, dass es sich bei hierbei um eine für Malaria hyperendemische Region handelt.

In vorangegangenen Studien sah man im Altersvergleich eine signifikant erhöhte Parasitenbelastung bei den 5-14-jährigen, was annähernd der Altersgruppe dieser Studie entspricht [6].

Weiterhin sieht man, dass die Studie im Februar begann, wo auch aus früheren Studien belegt, die höchste Parasitenbelastung der Population vorliegt [6], was sicher in den klimatischen Gegebenheiten der Regenzeit, bezüglich Temperatur und Niederschlagsmenge, begründet liegt.

Bislang existiert erst eine publizierte Studie über Interaktionen zwischen Antimalariamedikamenten und attenuierten Typhus bzw.- Choleralebendimpfstoffen. Darin wurde gezeigt, dass gemeinsam verabreichtes Chloroquin und Proguanil (200mg/d) negative Auswirkungen auf die Auslösbarkeit einer Immunantwort auf CVD103-HgR und Ty21a ausübt und die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die genannten Impfstoffe nicht gemeinsam mit Chloroquin und/oder Proguanil verabreicht werden sollten [43]. Momentan wird empfohlen, die CVD103-HgR / Ty21a Impfung und die Einnahme von Chloroquin / Proguanil in zehn- bzw. dreitägigem Abstand vorzunehmen [43]. In unserer Doppelblindstudie untersuchten wir ebenfalls den Einfluss der A-P-Kombination auf die Immunantwort auf die CVD103-HgR und Ty21a Lebendvakzine. Die Antikörperantworten auf Ty21a in beiden Gruppen waren ähnlich und damit nicht signifikant verschieden ($P=0,96$ für IgG und $P=0,07$ für IgA). Entsprechende Ergebnisse fanden wir für Immunantwort auf CVD103-HgR, wo ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der A-P-Gruppe und der Placebogruppe festgestellt werden konnte ($P=0,64$). Folglich ist eine Beeinflussung der humoralen Immunantwort auf Ty21a und CVD103-HgR durch die A-P-Medikation nicht anzunehmen.

Obwohl bislang galt, dass man die Ty21a Lebendimpfung in der Regel vor der Malariachemoprophylaxe geben sollte, kann es vor allem bei Tropenreisenden und Bewohnern endemischer Gebiete geschehen, dass sowohl die Ty21a Lebendimpfung als auch die A-P-Medikation gleichzeitig eingenommen werden müssen. Für solche Fälle bilden wir mit unseren Ergebnissen nun die wissenschaftliche Grundlage, dass die oralen Lebendimmunisierungen gegen Typhus abdominalis und Cholera mit oben genannten Impfstoffen adäquat bleibt.

Es ist nicht ganz verständlich, warum die A-P-Kombination keine Auswirkungen auf die Immunogenität der Impfstoffe hatte, obwohl Proguanil alleine eine geringe antibakterielle Potenz besitzt und dadurch die Immunantwort auf Ty21a verringert [43]. Möglicherweise ist es aber der Zusatz von Atovaquon, der die antibakterielle Aktivität von Proguanil verringert. Andererseits

beinhaltet das Kombinationsmedikament eine relativ geringe Konzentration an Proguanil, die eventuell nicht ausreichte, eine entsprechende Wirkung zu entfalten. Die Tatsache, dass die Ergebnisse, die *in vitro* mit Proguanil erzielt wurden sich nicht allgemein auf *in vivo* Bedingungen übertragen lassen [43] legt die Vermutung nahe, dass noch weitere Mechanismen unabhängig von der antibakteriellen Aktivität des Proguanils existieren [49], die die Immunogenität eines gleichzeitig verabreichten Ty21a oder- CVD103-HgR Lebendimpfstoffes beeinflussen. Es ist ein multifaktorielles Geschehen zwischen den Medikamenten mit antibakterieller Potenz und den Impfstoffen anzunehmen, worüber im Detail leider noch sehr wenig bekannt ist. Es bleibt zu hoffen, dass wir in den nächsten Jahren weitere Aufklärung darüber erfahren werden und sich insbesondere noch eventuelle immunologische Mechanismen aufdecken lassen.

Die immunologische Reaktion auf CVD103-HgR wurde zwar nicht von der A-P-Gabe beeinflusst, die Serokonversionsrate war jedoch relativ niedrig im Vergleich zu vorhergehenden Studien, die mit den gleichen attenuierten Lebendimpfstoffen in weniger entwickelten Ländern durchgeführt wurden [50-53]. Wir erreichten hier eine Serokonversionsrate von 22% in der Placebogruppe und 27% in der A-P-Gruppe, was im Vergleich zur Studie von Kollaritsch et al, in der Serokonversionsraten von 91% ohne gleichzeitig stattfindende Antimalariamedikation und 83% respektive 67% bei simultaner Proguanil- oder Chloroquinmedikation erreicht wurden, relativ gering ist. Da die Serokonversion nach Immunisierung mit CVD103-HgR umso niedriger war, desto höhere Titer man initial gemessen hatte, liegt die Vermutung nahe, dass das insgesamt geringere Ansprechen auf die Impfung Folge der bereits im Vorfeld der Studie in beiden randomisierten Gruppen vorhandenen hohen Antikörpertiter gegen *Vibrio cholerae* ist. Diese Theorie wird dadurch bestärkt, dass in anderen Studien, die sowohl in Industrieländern als auch in Entwicklungsländern durchgeführt worden waren, diejenigen Teilnehmer die serokonvertierten, einen signifikant niedrigeren Ausgangstiter besaßen als die, die nicht die gewünschte Serokonversion zeigten [50-54]. Das teils mangelhafte Ansprechen auf die Impfung führte dazu, dass immer höhere Dosen verwendet werden mussten, um den gewünschten Impferfolg zu erzielen [55]. Die hohen Ausgangstitern scheinen also einen hemmenden Mechanismus auf die erneute Impfung auszuüben, was einen Anstieg des Antikörpertiters nach CVD103-HgR-Impfgabe erfolgreich zu verhindern weiß [51].

Ein weiterer Erklärungsansatz für den höheren Bedarf an Impfstoff um einen Titeranstieg auszulösen, könnte in der im Studiengengebieten vorherrschenden hohen Prävalenz von *Ascaris lumbricoides* Infektionen zu finden sein, da der Spulwurm aller Wahrscheinlichkeit nach das Immunsystem dahingehend moduliert, dass er auch die Serokonversionsrate auf CVD103-HgR-Impfung nachhaltig beeinflussen kann [56,57]. Dies wurde in einer Studie untersucht, in der die Immunisierung mit CVD103-HgR mit und ohne antiparasitäre Zusatzmedikation mit Albendazol untersucht wurde. Dort wurden in der nicht mit Albendazol behandelten Gruppe signifikant höherer Serokonversionsraten gefunden als in der Vergleichsgruppe ohne entsprechende antiparasitäre Behandlung. Dabei fiel weiterhin auf, dass die Serokonversionsraten nach Impfung mit CVD-103 HgR bei Probanden mit Blutgruppe A, B und AB signifikant höher waren als bei Probanden mit Blutgruppe 0 [56]. In einer anderen Studie wurde herausgefunden, dass dies aller

Wahrscheinlichkeit nach mit dem signifikant verminderten Anstieg des IL-2 Titers nach Immunisierung mit CVD-103HgR in Patienten mit *Ascaris lumbricoides* Infektionen zusammenhängt [57].

Mir ist nicht bekannt, ob eine höhere Impfdosis eine adäquatere Immunantwort erbracht hätte. Letztlich kann man sehen, dass wir in Gabun einen bedeutend höheren initialen Antikörpertiter auf *Vibrio cholerae* antrafen, als es uns aus anderen Studien mit CVD103-HgR im Verbreitungsgebiet von *Vibrio cholerae* bekannt ist [50-53]. Gabun ist ein historisch bekanntes Endemiegebiet für Cholera. Es gab jedoch nach unserem Wissen im Studiengebiet keine Choleraepidemie in den letzten 10 Jahren und auch eine Studie über die Ätiologie akuter Gastroenteritis im Kindesalter fand keinen Fall von Cholera [58]. Somit ist es relativ schwierig, eine Erklärung für die hohen Antikörpertiter zu finden. Eine letzte mögliche, und auch die als am wahrscheinlichsten erscheinende Interpretation wäre, dass es bei der Bestimmung verschiedener Antikörper zu Kreuzreaktionen kommen kann, so zum Beispiel ist bekannt, dass bei der Bestimmung von anti-*V. cholerae*-LPS Antikörpern Kreuzreaktionen mit *Yersinia enterocolitica* auftreten können [59]. Dies würde in unserem Falle zu falsch positiven Ergebnissen führen und bedeuten, dass der hohe mittlere Ausgangstiter eventuell auf gastrointestinale Infektionen durch *Yersinia enterocolitica* zurückzuführen wäre. Dies würde auch heißen, dass diese eventuell vorliegende bakterielle Infektion, durch einen unbekanntem Mechanismus die Serokonversionsrate auf die Impfung mit CVD-103-HgR erniedrigt, da eine negative Korrelation zwischen dem gemessenen Ausgangstiters und der Serokonversionsrate statistisch gesichert ist.

Schließlich konnten wir zeigen, dass Atovaquon-Proguanil einen hochwertigen Schutz gegen Malaria in einem Gebiet mit einem hohen Resistenzniveau gegen Chloroquin, Amodiaquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin bietet und auch als Alternativmedikament zu dem in der Chemoprophylaxe der Malaria tropica heute noch sehr verbreiteten Mefloquin aufgrund seines äußerst geringen Nebenwirkungsspektrums und seiner guten Steuerbarkeit infolge der im Vergleich zu Mefloquin geringen Halbwertszeit, sehr gut abschneidet. Somit kann man hiermit bestätigen, dass sich das Kombinationspräparat Atovaquon-Proguanil hervorragend in der Prävention der Malaria tropica bei Reisen in endemische Gebiete vor allem in Regionen mit hohen Resistenzniveaus Chloroquin und Pyrimethamin/Sulfadoxin eignet.

Letztlich bleibt die Frage der Einsetzbarkeit des Medikaments in endemischen Malariagebieten, welche tendenziell zu den ökonomisch schwächeren Regionen der Welt gehören. In Anbetracht der Tatsache, dass eine Packung Malarone[®] mit 12 Tabletten in Deutschland für 56 Euro vom Hersteller verkauft wird [47] (in Gabun ist es unwesentlich billiger), würde das bedeuten, dass bei der einmonatigen Einnahme der Chemoprophylaxe Kosten von ca. 138 Euro entstehen würden. Von daher erscheint eine dauerhafte Einnahme von Malarone[®] durch größere Patientenkollektive in den betroffenen Gebieten als leider bislang wenig praktikabel. Eine Ausnahme stellt das „Malarone Donation Programme“ dar, in dessen Rahmen A-P kostenfrei an malariakranke Kinder in der dritten

Welt abgegeben wird [46]. Um jedoch eine dauerhafte Lösung des Problems der Zugänglichkeit des Medikaments zu finden und diesen medizinischen Fortschritt auch den von der Malaria am stärksten betroffenen Personenkreisen zukommen zu lassen, sind Herstellerindustrie, internationales Patentrecht und die Politik gefragt. Wenn es gelingen sollte, Malarone[®] auch finanziell in Konkurrenz zu den einzelnen Chloroquinpräparaten zu stellen, wäre dies ein Meilenstein in der Behandlung der Malaria tropica in endemischen Gebieten, denn nicht zuletzt bei Kindern stellt die Behandlung der akuten unkomplizierten Malaria mit Chloroquin eine wahrhafte Gefährdung des Erkrankten dar, da durch die insuffiziente Entparasitierung cerebralen und damit mitunter tödlichen Verlaufsformen der Weg geebnet wird.

In vielen malariaendemischen Gebieten ist es auch noch immer das in dieser Region nicht mehr wirksame Chloroquin, was unter anderem auch in der Schwangerschaft als Therapeutikum der ersten Wahl bei *Plasmodium falciparum* Infektionen eingesetzt wird. Sowohl Atovaquon als auch Proguanil überwinden ebenfalls die Plazentaschranke, üben jedoch wahrscheinlich keinen toxischen Effekt auf den Fetus aus [60]. Die Datenlage ist diesbezüglich noch sehr schlecht, und es bleibt nur zu hoffen, dass weitere Studien folgen, die sich vor allem auf die Behandlung an Malaria erkrankter Schwangerer fokussieren.

Weiterhin konnten wir feststellen, dass die A-P-Kombination die Immunantwort auf CVD103-HgR und Ty21a nicht negativ beeinflusst. Damit hat sich die Annahme aus einer vorangegangenen Studie [43], dass sich Proguanil als Bestandteil des Studienmedikaments, hemmend auf die Antikörperantwort auf die beiden oralen Lebendimpfstoffe auswirkt, nicht bestätigt.

Ich bin aus diesen Gründen, im Gegensatz zu Kollaritsch et al [43], der Überzeugung, dass die orale Lebendimpfung gegen Typhus abdominalis und Cholera problemlos simultan zu einer Chemoprophylaxe gegen Malaria mit Atovaquon - Proguanil verabreicht werden kann. Besonders aber auch in der Region, in der die Studie durchgeführt wurde, ist diese Studie von eminenter Wichtigkeit, da es sich hierbei, wie bereits erwähnt um eine Region handelt, die endemisch für Malaria, Typhus abdominalis und Cholera ist.

Für die gleichzeitige Gabe von Chloroquin, welches als Medikament zur Behandlung der Malaria in Gabun leider noch immer weite Verbreitung findet, muss ich mich auf die Daten von Kollaritsch et al [43] berufen, die schlussfolgerten dass die gleichzeitige Einnahme von Chloroquin nicht empfehlenswert ist. Dies könnte sich aus dem breiten pharmakodynamischen Spektrum des Chloroquins ergeben, zu dem auch eine leichte immunsuppressive Komponente gehört. Einige Studien zeigen eine hemmende Wirkung des Chloroquins auf die Ausschüttung von IL-1 [61], was ebenfalls die anerkannte Wirkung des Chloroquins als Basistherapeutikum rheumatischer Erkrankungen über eine Verminderung der Plasmakonzentrationen von Rheumafaktor und Akute-Phase-Proteinen erklären würde.

Unabhängig davon ist diese Studie auch von eminenter Wichtigkeit für Tropenreisende bzw. die sie beratenden Ärzte, da es sich bei Regionen mit endemischem oder sporadischem Vorkommen von

Typhus abdominalis und Cholera häufig ebenfalls um malariaendemische Gebiete handelt (Afrika (Subsahara), Indien, Südamerika) Die niedrigen Serokonversionsraten sind meiner Meinung nach, und auch bezüglich der vorangegangenen Studien [53-57] vorrangig auf die hohen Ausgangstiter zurückzuführen.

Nicht zuletzt ist erwähnenswert, dass eine nicht unerhebliche Anzahl von Kindern auch auf ganz direkte Art und Weise von dieser Studie profitierten, in dem alle Teilnehmer von uns einen hochwirksamen Impfschutz gegen zwei noch immer gefürchtete Infektionskrankheiten erhielten, die im staatlichen Impfprogramm Gabuns leider bislang noch nicht vorgesehen sind. Es bleibt zu hoffen, dass diese Studie einen weiteren Beitrag dazu leistet, den Impfschutz gabunischer Kinder um diese beiden Impfungen zu erweitern, da wir wiederholt zeigen konnten, dass es sich bei CVD103-HgR und Ty21a um eine fast bedenkenlos anwendbare Lebendvakzine handelt. Eine Impfung gegen Cholera und Typhus abdominalis wäre bei flächendeckender Anwendung in der Region, in der die Studie durchgeführt wurde, ein immenser gesundheitlicher und auch sozioökonomischer Fortschritt. So könnten Kosten für langwierige Krankenhausaufenthalte eingespart werden und außerdem könnte ein positiver Einfluss auf die noch immer hohe Sterblichkeit infolge dieser Infektionen genommen werden. Ich hoffe, dass wir mit dieser Studie dem Ziel einer flächendeckenden Einführung von Impfungen gegen Typhus abdominalis und Cholera, insofern näher gekommen sind, da Argumente bezüglich eventueller negativer Interaktionen mit einigen Malariamedikamenten ausgeräumt werden konnten. Die Sicherheit der Lebendvakzine ist bereits mehrfach bestätigt worden [36-38].

5 Zusammenfassung

Wir führten eine randomisierte Doppelblindstudie durch, um den Einfluss der Malariachemoprophylaxe mit Atovaquon-Proguanil auf die Antikörperantwort auf die oralen Lebendimpfungen gegen Cholera (CVD103-HgR) und Typhus (Ty21a) zu bestimmen. Dazu wurden insgesamt 330 gabunische Kinder den beiden Behandlungsgruppen A-P oder Placebo zugeteilt. In diesen verblieben sie während 12 Wochen Chemoprophylaxegabe und 4 Wochen Nachsorgephase. Die Impfungen mit den oben genannten Impfstoffen erfolgte 3 Wochen nach Beginn der Chemoprophylaxephase und die Abnahme der Parameter für die Serokonversion erfolgte 4 Wochen nach Impfgabe. Im Verlauf der Chemoprophylaxephase entwickelte ein Teilnehmer aus der A-P-Gruppe eine Parasitämie, was einer Wirksamkeit von 97% (95%KI, 97%-100%) entspricht. In der Placebogruppe trat bei 31 Teilnehmern eine Parasitämie auf. Die 2 Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht bezüglich des qualitativen Anstiegs der Titer nach der Impfung (P=0.96 für anti-*S.typhi* IgG, P=0.07 für anti-*S.typhi* IgA und 0.64 für anti *V.cholerae* IgG). Die Malariaphylaxe mit Atovaquon-Proguanil stellte sich folglich als hochwirksam heraus. Ein Einfluss auf die Immunogenität der oralen Lebendimpfungen gegen Typhus (Ty21a) und Cholera (CVD103HgR) konnte nicht bestätigt werden, womit gesichert wurde, dass die A-P-Chemoprophylaxe simultan mit diesen oralen Lebendimpfungen verabreicht werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

1. WHO. World malaria situation in 1994. Part III. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72:285-90.
2. Koko J, Dufillot D, Zima-Ebeyard AM, Duong TH, Gahouma D, and Kombila M. [Aspects of malaria in the hospitalized child in Gabon]. *Med Trop (Mars)* 1997; 57:177-80.
3. Behrens RH and Roberts JA. Is travel prophylaxis worth while? Economic appraisal of prophylactic measures against malaria, hepatitis A, and typhoid in travellers. *BMJ* 1994; 309:918-22.
4. Richard-Lenoble D, Kombila M, Chandenier J, Engohan E, Gannier M, and Dubourg C. [Malaria in Gabon. I. Study of 500 children with fever in Libreville]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1986; 79:284-7.
5. Richard-Lenoble D, Kombila M, Chandenier J et al. [Malaria in Gabon. 2. Evaluation of the qualitative and quantitative prevalence of parasites in the total school and preschool population of the country]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1987; 80:532-42.
6. Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, and Wernsdorfer WH. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop Med Parasitol* 1995; 46:77-82.
7. Elissa N, Karch S, Bureau P et al. Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooue, Gabon. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; 15:15-23.
8. Harrison, Tinsley R., *Harrisons Principles of Internal Medicine*, 15th ed. 2001.
9. Chwatt, Bruce. *Essential Malariology*. [3.Ausgabe]. 1996.
10. Garin D, Chaulet JF, Robet Y, Chapalain JC, Lamarque D, and Peyron F. [Malaria: chloroquine resistance]. *Med Trop (Mars)* 1991; 51:29-35.
11. Schapira A. The resistance of falciparum malaria in Africa to 4-aminoquinolines and antifolates. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990; 75:1-64.
12. Cortese JF and Plowe CV. Antifolate resistance due to new and known Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 94:205-14.
13. Fidock DA, Nomura T, Talley AK et al. Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000; 6:861-71.
14. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, and Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of P. falciparum. *Cell* 1989; 57:921-30.

15. Binder RK, Borrmann S, Adegnika AA, Missinou MA, Kremsner PG, and Kun JF. Polymorphisms in the parasite genes for *pfprt* and *pfmdr-1* as molecular markers for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon. *Parasitol Res* 2002; 88:475-6.
16. Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Neifer S, Bienzle U, and Graninger W. Clindamycin in combination with chloroquine or quinine is an effective therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children from Gabon. *J Infect Dis* 1994; 169:467-70.
17. Taylor WR, Widjaja H, Richie TL et al. Chloroquine/doxycycline combination versus chloroquine alone, and doxycycline alone for the treatment of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:223-8.
18. Labbe AC, Bualombai P, Pillai DR et al. Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95:781-8.
19. Deloron P, Mayombo J, Le Cardinal A et al. Sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:188-90.
20. Llanos-Cuentas A, Campos P, Clendenes M, Canfield CJ, and Hutchinson DB. Atovaquone and proguanil hydrochloride compared with chloroquine or pyrimethamine/sulfadoxine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. *Braz J Infect Dis* 2001; 5:67-72.
21. Staedke SG, Kanya MR, Dorsey G et al. Amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine, and combination therapy for treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Kampala, Uganda: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358:368-74.
22. Schwenke A, Brandts C, Philipps J, Winkler S, Wernsdorfer WH, and Kremsner PG. Declining chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon from 1992 to 1998. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113:63-4.
23. Forth, Wolfgang, Henschler, Dietrich, and Rummel, Walter. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, m. CD-ROM. 2001.
24. Foote SJ, Galatis D, and Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:3014-7.
25. Peterson DS, Milhous WK, and Wellems TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:3018-22.
26. Reeder JC, Rieckmann KH, Genton B, Lorry K, Wines B, and Cowman AF. Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes and in vitro susceptibility to pyrimethamine and cycloguanil of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:209-13.
27. Helsby NA, Edwards G, Breckenridge AM, and Ward SA. The multiple dose pharmacokinetics of proguanil. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 35:653-6.

28. Ward SA, Helsby NA, Skjelbo E, Brosen K, Gram LF, and Breckenridge AM. The activation of the biguanide antimalarial proguanil co-segregates with the mephenytoin oxidation polymorphism--a panel study. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31:689-92.
29. Shanks GD, Kremsner PG, Sukwa TY, Van der Berg JD, Shapiro TA, Scott TR, Chulay JD. Atovaquone and Proguanil Hydrochloride for Prophylaxis of Malaria. *J Travel Med* 1999; 6(Suppl 1):S21-S27..
30. Shanks GD, Gordon DM, Klotz FW et al. Efficacy and safety of atovaquone/proguanil as suppressive prophylaxis for *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* 1998; 27:494-9.
31. Sukwa TY, Mulenga M, Chisdaka N, Roskell NS, and Scott TR. A randomized, double-blind, placebo-controlled field trial to determine the efficacy and safety of Malarone (atovaquone/proguanil) for the prophylaxis of malaria in Zambia. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:521-5.
32. Lell B, Luckner D, Ndjave M, Scott T, and Kremsner PG. Randomised placebo-controlled study of atovaquone plus proguanil for malaria prophylaxis in children. *Lancet* 1998; 351:709-13.
33. Srivastava IK and Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1334-9.
34. Robert Koch Institut, Berlin. *Epidemiologisches Bulletin*. 2002.
35. Harrison, Tinsley R.; Fauci, Anthony S.; Braunwald, Eugene, (Dietel / Dudenhausen) *Harrisons Innere Medizin*, 15. Aufl. 2002
36. Kollaritsch H, Furer E, Herzog C, Wiedermann G, Que JU, and Cryz SJ, Jr. Randomized, double-blind placebo-controlled trial to evaluate the safety and immunogenicity of combined *Salmonella typhi* Ty21a and *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR live oral vaccines. *Infect Immun* 1996; 64:1454-7.
37. Cryz SJ, Jr., Que JU, Levine MM, Wiedermann G, and Kollaritsch H. Safety and immunogenicity of a live oral bivalent typhoid fever (*Salmonella typhi* Ty21a)-cholera (*Vibrio cholerae* CVD 103-HgR) vaccine in healthy adults. *Infect Immun* 1995; 63:1336-9.
38. Clements ML, Levine MM, Young CR et al. Magnitude, kinetics, and duration of vibriocidal antibody responses in North Americans after ingestion of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1982; 145:465-73.
39. Wolfe MS. Precautions with oral live typhoid (Ty 21a) vaccine. *Lancet* 1990; 336:631-2.
40. Horowitz H and Carbonaro CA. Inhibition of the *Salmonella typhi* oral vaccine strain, Ty21a, by mefloquine and chloroquine. *J Infect Dis* 1992; 166:1462-4.
41. Ambrosch F, Hirschl A, Kremsner P, Kundi M, Kunz C, Rappold E, Wiedermann G. Orale Typhus-Lebendimpfung. *Munch Med Wochenschr* 1985; 127: 775-8
42. Ambrosch F, Hirschl A, Kollaritsch H, Kremsner P, Rappold E, Wiedermann G. Untersuchungen zur Kompatibilität des neuen Malariamittels Mefloquin mit der oralen Typhus-Lebendimpfung. *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol* 1987; 9: 167-172

43. Kollaritsch H, Que JU, Kunz C, Wiedermann G, Herzog C, and Cryz SJ, Jr. Safety and immunogenicity of live oral cholera and typhoid vaccines administered alone or in combination with antimalarial drugs, oral polio vaccine, or yellow fever vaccine. *J Infect Dis* 1997; 175:871-5.
44. Adjuik M, Agnamey P, Babiker A et al. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002; 359:1365-72.
45. Planche T, Krishna S, Kombila M et al. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:599-602.
46. Bloland PB, Kazembe PN, Watkins WM, Doumbo OK, Nwanyanwu OC, and Ruebush TK. Malarone-donation programme in Africa. *Lancet* 1997; 350:1624-5.
47. Rote Liste. Rote Liste 2002.
48. Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, and Pasvol G. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* 2002; 1:1.
49. Woo PC, Tsoi HW, Wong LP, Leung HC, and Yuen KY. Antibiotics modulate vaccine-induced humoral immune response. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:832-7.
50. Su-Arehawaratana P, Singharaj P, Taylor DN et al. Safety and immunogenicity of different immunization regimens of CVD 103-HgR live oral cholera vaccine in soldiers and civilians in Thailand. *J Infect Dis* 1992; 165:1042-8.
51. Suharyono, Simanjuntak C, Witham N et al. Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in 5-9-year-old Indonesian children. *Lancet* 1992; 340:689-94.
52. Gotuzzo E, Butron B, Seas C et al. Safety, immunogenicity, and excretion pattern of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in Peruvian adults of high and low socioeconomic levels. *Infect Immun* 1993; 61:3994-7.
53. Perry RT, Plowe CV, Koumare B et al. A single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR is safe and immunogenic in HIV-infected and HIV-noninfected adults in Mali. *Bull World Health Organ* 1998; 76:63-71.
54. Cryz SJ, Jr., Levine MM, Losonsky G, Kaper JB, and Althaus B. Safety and immunogenicity of a booster dose of *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR live oral cholera vaccine in Swiss adults. *Infect Immun* 1992; 60:3916-7.
55. Levine MM and Kaper JB. Live oral vaccines against cholera: an update. *Vaccine* 1993; 11:207-12.
56. Cooper PJ, Chico ME, Losonsky G et al. Albendazole treatment of children with ascariasis enhances the vibriocidal antibody response to the live attenuated oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis* 2000; 182:1199-206.

57. Cooper PJ, Chico M, Sandoval C et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect Immun* 2001; 69:1574-80.
58. Gendrel D, Sitbon M, Richard-Lenoble D et al. [Etiology of acute infantile gastroenteritis in Gabon]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1985; 78:290-5.
59. Agarwal SC GN. Vibriocidal antibodies induced by *Yersinia enterocolitica* serotype IX. *J Hyg* 1972; 70(1): 161-9.
60. Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, and Canfield CJ. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54:62-6.
61. Titus EO. Recent developments in the understanding of the pharmacokinetics and mechanism of action of chloroquine. *Ther Drug Monit* 1989; 11:369-79.

Curriculum vitae

- Geboren am 23.01.1976 in Dresden

- Juni 1994 Abitur am Gymnasium „Romain Rolland“ in Dresden

- April 1996 Aufnahme des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin

- April 1998 Physikum und gleichzeitiger Wechsel an die Humboldt Universität zu Berlin

- April 1999 1. Staatsexamen

- Februar 2000 – Februar 2001 einjähriger Forschungsaufenthalt am „International Research Laboratory“ am Hôpital Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun im Rahmen einer Doktorarbeit am Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen (Betreuer: Herr Prof. Kreamsner)

- März 2002 2. Staatsexamen mit „gut“

- April 2002-März 2003 Ableistung des Praktischen Jahres in den Fächern Pädiatrie (Berlin), Innere Medizin (Berlin), Chirurgie (Montreux, CH)

- April 2003 3. Staatsexamen mit „sehr gut“