

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, AG May (Infektionsepidemiologie)

Prof. Dr. R. Horstmann (Vorstandsvorsitzender)

Folgeuntersuchung von Kindern nach einer intermittierenden präventiven Behandlung der Malaria mit Sulfadoxin-Pyrimethamin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Benedikt Hogan
aus Bad Oldesloe

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.07.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. May

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. R. Santer

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	6
3. Methoden.....	6
4. Ergebnisse.....	9
5. Diskussion.....	10
6. Anhang.....	12
6.1. Tabelle 2.	12
6.2. Tabelle 3.	13
6.3. Tabelle 4.	13
7. Literaturverzeichnis.....	14
8. Originalpublikation.....	21

1. Zusammenfassung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt eine intermittierende präventive Therapie (IPTi) der Malaria mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) bei Kleinkindern in endemischen Gebieten mit mäßiger bis hoher Übertragung von *Malaria tropica* und niedriger Resistenzlage gegen SP. Einige IPTi-Studien die mit SP durchgeführt wurden, konnten jedoch nach der Intervention in der SP-Gruppe ein erhöhtes Auftreten von Malariafällen und/oder Anämien nachweisen. Um diese sogenannten „Rebound-Effekte“ zu detektieren, wurde eine Folgeuntersuchung mit ehemaligen Teilnehmern einer IPTi-Studie durchgeführt. Malariometrische Parameter unterschieden sich in der SP- und der Placebo-Gruppe nicht. Immunglobulin G Antikörper-Titer (PfLIgG) gegen Anti-*Plasmodium falciparum* Lysat wurden als ein Schätzmaß für vorangegangene Malariaepisoden eingesetzt und waren bei Kindern des SP-Arms erniedrigt. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist eine insgesamt geringere Exposition mit parasitärem Antigen bei Kindern in der SP-Gruppe.

2. Einleitung

Malaria ist eine durch weibliche Anophelesmücken übertragene und durch Parasiten (Protozoen der Spezies *Plasmodium*) ausgelöste Infektionserkrankung. Die für den Menschen relevanten Erreger der Spezies *Plasmodium* sind *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und in den letzten Jahren mit zunehmender Bedeutung, *P. knowlesi* (White 2008). Laut Angaben der WHO sind 106 Länder endemisch für Malaria, wovon 86 endemisch für *P. falciparum* sind, dem Erreger der gefährlichen *Malaria tropica* (WHO World Malaria Report 2010). Der Erreger *P. falciparum* wird vorwiegend in Afrika gefunden, während *P. vivax* häufiger in Süd-Amerika, Südostasien und im Westpazifik anzutreffen ist. *P. malariae* ist wiederum eher in Afrika bekannt. Infektionen mit *P. knowlesi* sind bisher nur im südostasiatischen Raum aufgetreten (Cox-Singh *et al.* 2008). Weltweit wurden ca. 225 Mio. Malaria Fälle im Jahr 2009 geschätzt, ausgelöst in der Mehrheit durch *P. falciparum*, und es kam zu etwa 800 000 Todesfällen, die mit Malaria in Zusammenhang gebracht werden konnten. Etwa 85% der Todesfälle traten bei Kindern unter 5 Jahren auf (WHO World Malaria Report 2010). Andere Berechnung gehen von einer noch größeren Morbidität und Mortalität aus (Bremen 2001; Snow *et al.* 2005). Fast alle Todesfälle durch Malaria können *P. falciparum* zugeschrieben werden. Da im westlichen Afrika und deshalb auch in dem Untersuchungsgebiet der Studie, *P. falciparum* klinisch am bedeutsamsten ist, ist im Weiteren mit Malaria ausschließlich die durch *P. falciparum* verursachte *Malaria tropica* gemeint. Insbesondere Kinder unter fünf Jahren sind von Malaria betroffen und stehen deshalb im Fokus von Malariakontrollmaßnahmen.

Klinische Manifestationen der Malaria sind vor allem abhängig von der Immunitätslage des betroffenen Individuums. Bestimmte genetische und immunologische Faktoren geben einen Schutz vor dem klinischen Verlauf einer Infektion mit *P. falciparum*. Auf genetischer Ebene zählen hierzu die Sichelzellanämie (Allison 1954), die Ovalozytose (Allen *et al.* 1999), die α - und β -Thalassämien (Williams *et al.* 1996), der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Ruwende und Hill 1998), sowie verschiedene HLA- (Human Leucocyte Antigene) und Interleukin-Varianten (Hill *et al.* 1991; Meyer *et al.* 2011).

Desweiteren wird eine aktive Immunantwort entwickelt, wenn ein Individuum über einen längeren Zeitraum dem Erreger gegenüber exponiert ist. Neugeborene, die in Endemiegebieten zur Welt kommen, besitzen für einen Zeitraum bis maximal 9 Monate, eine passive Immunität vor Malaria durch maternale Antikörper (Kitua *et al.* 1996; Snow *et al.* 1998). Diese plazentagängigen Antikörper der Klasse IgG sind gegen spezifische Antigene von Plasmodien gerichtet und werden über die Nabelschnur auf das Kind übertragen (Deloron *et al.* 1997).

Auch ein hoher Gehalt an fetalem Hämoglobin wirkt sich zusätzlich schützend auf das Neugeborene aus (Pasvol *et al.* 1976).

Der Schutz des Neugeborenen durch maternale Antikörper verschwindet vollständig nach etwa 9 Monaten, wobei es eine Rolle spielt, ob eine ganzjährige oder nur saisonale Malariatransmission vorherrscht (Snow *et al.* 1998; Kitua 1996). Nach dem Verlust dieses sogenannten „Nestschutzes“ muss das noch unreife Immunsystem des Kleinkindes einen eigenständigen, aktiven Schutz gegen Plasmodien entwickeln. Eine protektive Immunität vor komplizierter Malaria mit zerebralen Verläufen wird schneller aufgebaut als gegenüber milden Malariaepisoden (Gupta *et al.* 1999; Doolan *et al.* 2009).

Um eine akute Infektion zu bekämpfen, werden bei Erstkontakt mit dem Erreger, zunächst unspezifische Abwehrmechanismen und später spezifische, Zell-vermittelte und humorale Mechanismen aktiviert. Die unspezifische Abwehr beinhaltet unter anderem die Phagozytose von infizierten Erythrozyten durch Makrophagen, welche durch proinflammatorische Zytokine (TNF α und INF γ) stimuliert wurden. Daraufhin erfolgt eine Freisetzung von toxischen Sauerstoffmetaboliten, Stickstoffmonoxid (NO) und lysosomalen Enzymen (Rockett *et al.* 1992; Richards 1997). Eine weitere wichtige Rolle in der ersten Abwehr nehmen natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten ein (Roetynck *et al.* 2006).

Die intermittierende präventive Behandlung der Malaria tropica bei Kleinkindern (IPTi, eng. *intermittent preventive treatment in infants*) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP) wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Gebiete mit mässiger bis hoher Malariatransmission und geringer SP-Resistenz empfohlen (WHO Policy recommendation 2010).

Bei dem IPTi erfolgt die Gabe eines langwirksamen Malariamedikamentes parallel zu den Routineimpfungen des Expanded Program on Immunization (EPI) der WHO, also zu drei Zeitpunkten in den ersten neun bis 15 Monaten, unabhängig von einer Infektion (Grobusch *et al.* 2007).

Eine ähnliche Malariakontrollmaßnahme wurde in Malawi (Verhoef *et al.* 1998) und Kenia (Shulman *et al.* 1999) mit der Gabe von Sulfadoxin-Pyrimethamin in der Schwangerschaft (SP-IPTp) eingeführt und von der WHO seit 2004 für die gesamten malariaendemischen Gebiete Afrikas empfohlen.

Die intermittierende Gabe von SP führt zu der Beseitigung einer möglichen Infektion und wird danach von einer vor Infektion schützenden Phase gefolgt (PTP, eng. *Post-treatment-prophylaxis*), die der Wirkdauer des Medikamentes entspricht. Sulfadoxin mit seiner langen Eliminationshalbwertszeit (ca. 200 h), und Pyrimethamin (Eliminationshalbwertszeit ca. 100 h) eignen sich deshalb besonders für IPT-Konzepte. Sinkt die Plasmakonzentration des Medikamentes unter die minimale inhibitorische Konzentration (MIK), setzt eine Vermehrung der im Blut befindlichen Parasiten ein (White 2005).

Subtherapeutische Spiegel ermöglichen durch die Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Erreger die Entwicklung einer Semi-Immunität gegen Malaria und wirken damit dem sogenannten „Rebound-Effekt“ entgegen, der das Umschlagen eines Schutzes während der

Medikamentenwirkung in ein erhöhtes Risiko für Erkrankung nach Elimination des Medikamentes aus der Blutbahn beschreibt (Menendez *et al.* 1997). Die subtherapeutischen Medikamentenspiegel führen aber zu einem erhöhten Risiko resistenter Stämme (Marks *et al.* 2005; Mayor *et al.* 2008). Auch stellte sich in einer Analyse zweier SP-IPTi-Studien aus Ghana und Gabon der nachhaltige therapeutische und prophylaktische Effekt der Maßnahme über einen Zeitraum von 30-60 Tagen hinaus als sehr gering dar (May *et al.* 2008).

Allerdings konnte eine der ersten SP-IPTi Studien mit Kleinkindern in Tansania eine beeindruckende Reduktion der Malariainzidenz um 59% nachweisen (Schellenberg *et al.* 2001). Der oben erwähnte „Rebound-Effekt“ für Malaria und Anämieepisodes in der SP-Gruppe trat in dieser Studie nicht auf, wurde jedoch in Folgestudien innerhalb des nachfolgenden Zeitraumes beobachtet und stand deshalb auch im Fokus aller nachfolgenden SP-IPTi-Studien (O’Meara *et al.* 2005). In jeweils drei SP-IPTi-Studien konnte dieser Effekt in Bezug auf Anämie, hohe Parasitendichte oder Krankenhausaufenthalte nachgewiesen werden (Kobbe *et al.* 2007; Chandramohan *et al.* 2005; Mockenhaupt *et al.* 2007). Eine gesammelte Auswertung von sechs IPTi-Studien die auf SP basierten und in vier afrikanischen Ländern durchgeführt worden waren, erbrachte eine protektive Effizienz von insgesamt 30.3% gegen unkomplizierte Malaria und 21.3% gegenüber Anämie (Aponte *et al.* 2009). Eine weitere IPTi-Studie aus dem Norden von Tansania, in der unterschiedliche Medikamente für IPTi miteinander verglichen wurden, konnte keine protektive Effizienz für SP nachweisen. Nach Aussage der Autoren war der wichtigste Grund die bereits vorher in der Region vorkommenden SP-Medikamentenresistenzen (Gosling *et al.* 2009).

Um Langzeiteffekte von SP-IPTi zu untersuchen, wurde eine Querschnittsuntersuchung der ehemaligen Studienteilnehmer ca. vier Jahre nach der erstmaligen Rekrutierung durchgeführt (Kobbe *et al.* 2007). Anti-*Plasmodium falciparum* Lysat Immunglobulin G Antikörper-Titer (PfLIgG) wurden bereits in einer vorherigen Studie in derselben Studiengegend als ein Schätzmaß für die Häufigkeit von vorangegangenen Malariaepisodes in einem beobachtungsfreien Zeitraum beschrieben und für die vorliegende Studie genutzt (Schreiber *et al.* 2007).

3. Methoden

Die Folgeuntersuchung wurde in den gleichen neun Dörfern (Afigya Sekyere District, Ashanti Region, Ghana) wie in der ursprünglichen Placebo kontrollierten, doppelblinden und randomisierten SP-IPTi Studie durchgeführt (Kobbe *et al.* 2007).

Der Distrikt liegt ca. 20 Kilometer nordöstlich von Kumasi, der zweitgrößten Stadt des Landes. Die hauptsächliche wirtschaftliche Aktivität der Landbevölkerung besteht aus selbstversorgender Landwirtschaft und Kleinhandel mit Waren des täglichen Bedarfs. Die Fläche des Studiengebiets beträgt ca. 200 km², der Abstand zwischen einzelnen Dörfern beträgt maximal fünf Kilometer (s. **Abbildung. 1**, S. 7). Die Bevölkerungszahl der Dörfer variiert zwischen 1492 im kleinsten und 12877 im größten Dorf. Die Bevölkerung besteht hauptsächlich aus Angehörigen des Volkes der Ashanti mit Zuwanderern aus dem Norden Ghanas (Kreuels *et al.* 2008).

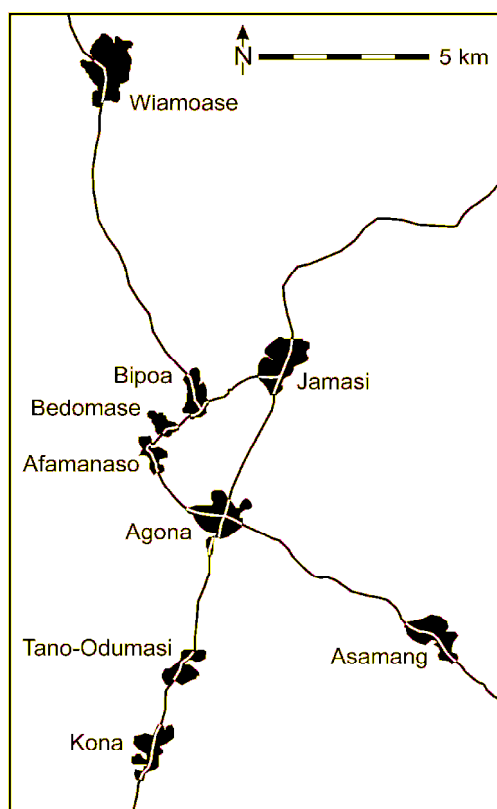


Abbildung 1. Karte der neun Dörfer im Afigya Sekyere District, Ashanti Region, Ghana. Schwarze Flächen bezeichnen Dörfer, durchgezogenen Linien stellen Straßen dar (Kreuels *et al.* 2008).

Die teilnehmenden Dörfer liegen in einem holoendemischen Malariagebiet mit saisonalen Schwankungen und ganzjähriger Übertragung von *P. falciparum*. Hauptvektoren der Malaria sind Mücken der Spezies *Anopheles gambiae* und *A. funestus*. Die durchschnittliche entomologische Inokulationsrate (EIR, Anzahl von Stichen durch mit *P. falciparum* infizierten Mücken pro Person pro Jahr) liegt bei mehr als 400 mit einem Gipfel von über 100 infektiösen Stichen pro Monat am Ende der Regenzeit. Die durchschnittliche Temperatur schwankt zwischen 20.4°C und 33.5°C, mit monatlichen Niederschlagsmengen von 15 mm im Januar bis 214 mm im Juli (Kreuels *et al.* 2008).

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer fand in dem Zeitraum von September bis November 2007 statt, ungefähr drei Jahre nach der Entblindung der ursprünglichen IPTi-Studie, welche im Jahre 2003 gestartet wurde.

Anhand eines Fragebogens wurden Krankengeschichte, Krankenhausaufenthalte, die Gabe von Antimalaria-Medikamenten und die persönliche Meinung der Erziehungsberechtigten zu SP-IPTi festgestellt. Arzt- und Krankenhausbesuche wurden anhand der „weighing card“ (ein kinderärztliches Untersuchungsheft, das vom Neugeborenen- bis Kleinkindalter geführt wird) versucht zu verifizieren. Ferner erfolgten eine kurze körperliche Untersuchung, die Messung von anthropometrischen Daten (Gewicht und Körpergröße) und eine axilläre Temperaturmessung. Zur Bestimmung des Hämoglobinspiegels wurde kapilläres Blut aus der Fingerkuppe entnommen und für die Anfertigung des „dicken Tropfen“ sowie Blutausstriche zur Malariadiagnostik genutzt (Kobbe *et al.* 2007). Etwa 500 µl Kapillarblut wurde für die Antikörpermessungen entnommen und das Serum nach Zentrifugieren bis zur quantitativen Bestimmung bei -20°C asserviert (Schreiber *et al.* 2007).

Definiert als Malaria wurde eine axilläre Temperatur von $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ und/oder durch die Begleitperson des Kindes berichtetes Fieber während der letzten 48 h ohne danach gefragt worden zu sein, begleitet von einer asexuellen *P. falciparum* Parasitämie mit über 500 Parasiten/ μl .

Kinder mit unkomplizierter Malaria wurden mit Artesunate (4mg/kg/d) plus Amodiaquine (10 mg/kg/d) für drei Tage, den nationalen Empfehlungen folgend, behandelt.

PfLIgG-Spiegel wurden wie zuvor mit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen und in Relative Units (RUs) angegeben (Schreiber *et al.* 2007). Die Methode der Messung der *PfLIgG* Spiegel war identisch mit der während der IPTi-Studie, nur fanden die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt.

Die erhobenen Daten wurden mit Stata/IC Software (Version 10.0; Stata Corp.) analysiert. Die Variablen zwischen den zwei Studienarmen wurden mit einem Kontingenz-Test (χ^2) für Größenverhältnisse und mit einem nichtparametrischen-Test (Wilcoxon rank-sum) für kontinuierliche Variablen statistisch verglichen. Die Rangkorrelation nach Spearman wurde benutzt, um die *PfLIgG*-Titer im Alter von 24 Monaten (während der IPTi-Studie) mit der Malariainzidenz während der ersten zwei Lebensjahre und die *PfLIgG*-Titer zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung zu vergleichen. Das Risiko einer Parasitämie zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung in Abhängigkeit von den Parasitämieraten während der ursprünglichen IPTi-Studie wurde anhand eines bivariaten logistischen Regressionsmodells mit SP-Gabe als mögliche Einflussvariable untersucht. P-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant gewertet.

Die Ziele und Methoden der vorliegenden Studie wurden den Erziehungsberechtigten der Teilnehmer erklärt. Anschließend wurde in Anwesenheit eines unabhängigen Beobachters die Einverständniserklärung unterschrieben oder mit einem Fingerabdruck des Erziehungsberechtigten versehen. Der Einwilligungen fanden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki statt. Alle Daten der Studienteilnehmer wurden vertraulich behandelt, die Datenbank war durch ein Passwort geschützt. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Kwame Nkrumah University of Science and Technology (Kumasi, Ghana) genehmigt.

4. Ergebnisse

Mehr als vier Jahre nach der ursprünglichen IPTi-Studie konnten 82.3% (siehe **Tabelle 1** der Publikation) der Kinder, die an allen Studienphasen der ursprünglichen Studie teilgenommen hatten, in die jetzige Studie eingeschlossen werden.

Fünf Kinder waren inzwischen verstorben, zwei in der Placebo und drei in der SP Kohorte, wobei vier Todesfälle in einem Zeitraum von vier Monaten und ein Todesfall vier Jahre nach der letzten aktiven Nachfolgeuntersuchung der ursprünglichen Studie aufgetreten sind. Anhand eines *Verbal Autopsy* Fragebogens (Setel *et al.* 2006) konnte im Interview mit Familienangehörigen die wahrscheinliche Todesursache ermittelt werden. Höchstwahrscheinlich waren zwei der Todesfälle, die gleichverteilt auf die zwei Studienarme auftraten, mit schwerer Malaria assoziiert. Ein Fall ähnelte einem akuten Nierenversagen ohne bekannte Ursache, während die übrigen zwei einer nicht mit Malaria assoziierten Sepsis entsprochen haben können. Weiterhin konnte kein Anzeichen für unerwünschte exfoliative, dermatologische Nebenwirkungen wie dem Stevens-Johnson Syndrom bei den Studienteilnehmern nachgewiesen werden (Kobbe *et al.* 2007; Aponte *et al.* 2009).

Zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung hatten insgesamt 246 (35.1%) der Studienteilnehmer eine Parasitämie und 52 (7.4%) waren an einer Malaria erkrankt. Sowohl die Höhe der Parasitämie ($p= 0.69$) als auch die Anzahl der Erkrankungen an Malaria ($p= 0.32$) waren in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Keine der Basisdaten oder der Variablen definierter Endpunkte wie Parasitämie, Malaria, Anämie sowie Parameter der Protein-Energie-Mangelernährung („*stunting*“ und „*wasting*“) waren zwischen SP- und Placebo-Studienarm signifikant unterschiedlich (s. **Tabelle 1** der Publikation und **Tabelle 2** im Anhang). Auch Erkrankungen und Krankenhausaufenthalte wurden von den Erziehungsberechtigten für beide Studienarme in gleicher Häufigkeit angegeben. Ferner wurde die Akzeptanz der Erziehungsberechtigten gegenüber dem Einsatz von IPTi sowohl in der SP- als auch in der Placebo-Gruppe als überwiegend positiv angegeben.

Unabhängig vom Behandlungsarm bestand für Studienteilnehmer, die während des 24-monatigen Behandlungszeitraumes mehrfach Parasitämien aufgewiesen hatten, eine ungefähr dreifach erhöhte Odds Ratio zum Zeitpunkt der Querschnittsuntersuchung eine Parasitämie zu haben (s. **Tabelle 3** im Anhang). Für das Vorhandensein einer klinischen Malaria zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung konnte aber kein Zusammenhang mit dem früheren Auftreten von Malaria-Episoden während der ursprünglichen Studie hergestellt werden (s. **Tabelle 4** im Anhang).

Im Alter von zwei Jahren war der *PfLIgG*-Antikörper-Titer bei Kindern in der Placebo Gruppe signifikant höher als bei Kindern der SP-Gruppe (32.3 versus 28.4 mean relative units (RUs), $p= 0.03$). Auch zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung konnte ein leicht erhöhter *PfLIgG*-Antikörper-Titer bei Kindern der Placebo-Gruppe gegenüber der SP-Gruppe nachgewiesen werden (s. **Tabelle 1** der Publikation).

Als Kontrolle, um die Aussagekraft des *PfLIgG*-Titers als stellvertretende Maßeinheit für die Anzahl der Malaria-Episoden während des Zeitraumes ohne aktive Überwachung zu überprüfen, konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Höhe des *PfLIgG*-Titers und den dokumentierten Malariainzidenz-Raten während des 21-monatigen Beobachtungszeitraumes mit ähnlichen Mustern in beiden Studiengruppen nachgewiesen werden (s. **Figure 1A** der Publikation).

Auch die *PfLIgG*-Titer der einzelnen Teilnehmer im Alter von 24 Monaten im Vergleich zur Höhe der Titer zum Zeitpunkt der Nachfolgestudie korrelierten trotz des langen Zeitintervalls zwischen den beiden Messzeitpunkten leicht positiv miteinander (s. **Figure 1B** der Publikation).

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie, die etwa drei Jahre nach der letzten SP-Gabe in der IPTi-Studie durchgeführt wurde, konnten keine Unterschiede zwischen den Studiengruppen in Bezug auf malariometrische Parameter, Morbidität oder Mortalität festgestellt werden.

Parameter der Protein-Energie-Mangelernährung („*stunting*“ und „*wasting*“) waren in beiden Gruppen gleich. Auch hier scheint die Gabe von SP im Rahmen einer IPTi keine messbaren Langzeitwirkungen aufzuweisen. Bisher konnten auch in einer vergleichbaren Studie keine messbaren Einflüsse von IPTi auf die Gewichtszunahme bei den Studienteilnehmern im Alter von 18 Monaten festgestellt werden (Schellenberg *et al.* 2005).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass weder ein „Rebound Effekt“ nach IPTi noch ein signifikanter anhaltender Langzeiteffekt zu erwarten ist. Da es sich bei der vorliegenden Studie jedoch nur um einen einzelnen Zeitpunkt handelt, muss auf weitere longitudinale, aussagekräftigere Untersuchungen gewartet werden. Allerdings konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass SP später als einen Monat nach seiner Gabe keine protektive Wirksamkeit mehr gegen klinische Malaria erreicht (May *et al.* 2008; Cairns *et al.* 2010).

Antiplasmodialen Antikörpern, in unserem Fall dem *Pf*LlgG-Titer, kommen eine besondere Bedeutung als ein Schätzmaß für Malariaepisoden im überwachungsfreien Intervall zu (Marsh *et al.* 1989; Schreiber *et al.* 2007). In der ursprünglichen Studie, sowie in der Nachfolgeuntersuchung wurden nicht Antikörper gegen variable Oberflächen-Antigenen (VSA), denen eine Bedeutung in der Protektion zugeschrieben wird, sondern gegen ein Plasmodium-Gesamtlysat gemessen. Dies sollte für die nachfolgenden Erklärungen beachtet werden.

Am Ende der ursprünglichen IPTi-Studie bei damals 24-Monate alten Teilnehmern waren die *Pf*LlgG-Titer signifikant höher in der Placebo-Gruppe als in der SP-Gruppe, höchstwahrscheinlich aufgrund der höheren Malaria Inzidenz Rate im Placebo-Arm (Schreiber *et al.* 2007). Interessanterweise waren zum Zeitpunkt dieser Nachfolgeuntersuchung die *Pf*LlgG-Titer in der Placebo-Gruppe noch immer höher als in der SP-Gruppe. Vermutet man ein ähnliches Malariainfektionsrisiko aufgrund gleicher Umweltfaktoren zwischen den beiden Gruppen, bieten sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diese Beobachtung an.

Eine Ursache für die niedrigeren *Pf*LlgG-Titer in der SP-Gruppe könnte ein nachwirkender, suppressiver Effekt der Medikamentengabe auf das Immunsystem sein. Diese Möglichkeit von immunosuppressiven Effekten von SP ist theoretisch möglich, jedoch in der Realität unwahrscheinlich, da sich in der gesamten Literatur keine direkten Hinweise auf solch einen Effekt finden. Eine Studie konnte zwar geringere spezifische antiplasmodiale VSA IgG-Spiegel nach einer intermittierenden präventiven Therapie mit SP bei erstgebärenden Schwangeren (IPTp) nachweisen, jedoch handelt es sich hierbei um eine spezielle Situation des Erwachsenen, mit einer Immunantwort, die sich von der eines Kleinkindes unterscheidet (Staalsoe *et al.* 2004). Auch konnte in einer Übersicht verschiedener Studien, in denen die Immunität der Teilnehmer nach gleichzeitiger Routineimpfung und SP-Gabe untersucht wurde, keine Unterschiede in der Immunantwort auf verschiedene Antigene festgestellt werden (Rosen *et al.* 2004). In einer anderen Studie unterschieden sich die Antikörperantworten gegen einzelne Erythrozyten Stadium-Antigene von *P. falciparum* nicht signifikant zwischen Kindern, die entweder Placebo oder SP im Rahmen von IPTi erhalten hatten. Eine Ausnahme bildete die IgG- und IgG₁-Antwort gegenüber dem *apical membrane antigen 1* (AMA 1) und dem *merozoit surface protein 1* (MSP 1). Diese Antikörper waren in

der SP-Gruppe sogar höher als in der Placebo-Gruppe (Quelhas *et al.* 2008). Eine nachfolgende Untersuchung derselben Kohorte konnte jedoch auch keinen Einfluss von SP auf die Entwicklung der natürlichen Immunität der Studienteilnehmer gegenüber Malaria nachweisen (Quelhas *et al.* 2011).

Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen *PfLIgG*-Titer zwischen den Gruppen könnte die Möglichkeit eines geringeren Auftretens von Malariaepisoden in der SP-Gruppe sein. Die protektive Effizienz von IPTi gegenüber der klinischen Malaria nahm in der ursprünglichen Studie nach den jeweiligen Dosisgaben kontinuierlich ab (Kobbe *et al.* 2007). Dementsprechend wird kein über mehrere Jahre wirkender Effekt erwartet, obwohl die Existenz eines solchen nachhaltigen Schutzes vor Malaria in einer Studie propagiert wurde (Schellenberg *et al.* 2005).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die *PfLIgG*-Titer seit dem Ende der ursprünglichen Studie zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung immer noch nicht ganz ausgeglichen sind. In der schon mehrfach zitierten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte dargestellt werden, dass die Höhe der *PfLIgG*-Titer im Alter von zwei Jahren abhängig von der Häufigkeit vorheriger Malariainfektionen ist (Schreiber *et al.* 2007). In der genannten Studie waren die *PfLIgG*-Titer bei Kindern der SP-Gruppe niedriger und die Höhe der *PfLIgG*-Titer abhängig von der Malariainzidenz des Heimatdorfes des Kindes. Diese Korrelation war stärker ausgeprägt im SP-Arm als im Placebo-Arm und könnte ein Hinweis für einen stärkeren Schutz vor parasitärer Exposition in Hochendemiegebieten sein (Kobbe *et al.* 2007b).

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass mit steigender Parasitämie-Inzidenz-Rate während des 21-monatigen Beobachtungszeitraums der ursprünglichen Studie ein erhöhtes Risiko für eine Parasitämie zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung bestand. Dies war unabhängig vom Behandlungsarm (s. **Tabelle 3** im Anhang). Diese Beobachtung stimmt mit einer positiven Korrelation der individuellen *PfLIgG*-Titer überein und weist darauf hin, dass Kinder mit einem zum damaligen Zeitpunkt hohen Antikörper-Titer auch Jahre später noch höhere Antikörper-Titer haben. Diese Resultate zeigen, dass eine individuelle Suszibilität für *P.falciparum* über Jahre erhalten bleibt und stehen somit in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass ein kleiner Anteil einer exponierten Population die Mehrzahl aller Infektionen erleidet (Smith *et al.* 2005). Diese Hoch-Risiko-Gruppen zu identifizieren und definieren, wäre ein essentieller Fortschritt für erfolgreiche Malariakontrollmaßnahmen.

Abschließend muss gesagt werden, dass seit der Empfehlung der WHO Anfang 2010 IPTi in Gebieten mit mäßiger bis hoher Malariatransmission und geringer SP-Resistenz einzusetzen, kein afrikanisches Land dieser Empfehlung gefolgt ist (Gosling *et al.* 2010). Vermutlich spielen hierbei die unterschiedlichen protektiven Effizienzen gegenüber Malariaepisoden und der fehlende messbare Einfluss auf die Mortalität der Studienteilnehmer eine Rolle sowie die für viele Länder schwierige Umsetzung des von der WHO geforderten molekularen Resistenzmonitorings bei der Anwendung von IPTi mit SP (WHO Policy recommendation 2010; Naidoo *et al.* 2011).

Zur Zeit befinden sich weitere IPTi-Studien mit verschiedenen anderen Medikamenten in der Durchführung, wobei auch erwogen wird, zusätzlich zu SP einen anderen Wirkstoff zu verabreichen. Trotz großer Bedenken darüber, dass sich durch SP-IPTi Medikamentenresistenzen bilden oder verstärken könnten, wurde vermutet, dass sich der prophylaktische Effekt der getesteten Medikamentenkombination eher auf den länger wirksamen SP Anteil zurückführen lässt (Odhiambo *et al.* 2010). Dies bestärkt die Annahme, dass SP, wenn auch nicht als Monotherapie, weiterhin ein wichtiger Bestandteil des IPTi Konzeptes darstellen wird, denn SP-IPTi wirkt zwar nicht selektiv, ist jedoch im Moment eine der kostengünstigsten, sichersten und effektivsten Malariakontrollmaßnahmen. Die Rolle von IPTi und dessen Implementierung sollte im Rahmen der neusten Eradikationspolitik neu diskutiert werden.

6. Anhang

Tabelle 2. Weitere Ergebnisse der Studienteilnehmer bei der Folgeuntersuchung

Ergebnis	Placebo Gruppe n= 350 (%)	SP Gruppe n= 380 (%)	p ^a
Gametozytämie			
Ja	10 (2.9)	13 (3.4)	0.84
Nein	327 (93.4)	351 (92.4)	
Fehlende Daten	13 (3.7)	16 (4.2)	
Fieber $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$			
Ja	15 (4.3)	20 (5.3)	0.83
Nein	334 (95.4)	359 (94.4)	
Fehlende Daten	1 (0.3)	1 (0.3)	
Z-scores^b			
Gewicht für Alter (Untergewicht)			
Jungen			0.08
<-2	27 (14.7)	17 (8.9)	
≥ -2	156 (85.3)	175 (91.1)	
Mädchen			0.13
<-2	29 (17.4)	22 (11.7)	
≥ -2	138 (82.6)	166 (88.3)	
Größe-für-Alter („Stunting“)			
Jungen			0.33
<-2	57 (31.1)	51 (26.6)	
≥ -2	126 (68.9)	141 (73.4)	
Mädchen			0.31
<-2	51 (30.5)	67 (35.6)	
≥ -2	116 (69.5)	121 (64.4)	
Gewicht-für-Größe („Wasting“)			
Jungen			0.94
<-2	5 (2.7)	5 (2.6)	
≥ -2	178 (97.3)	187 (97.4)	
Mädchen			0.86
< -2	4 (2.4)	5 (2.7)	
≥ -2	163 (97.6)	183 (97.3)	
Schwere zugrunde liegende Erkrankung			
Ja	14 (4)	19 (5)	0.52
Nein	336 (96)	361 (95)	
Erkrankung n (%)^{c,d}			
Ja, sehr häufig	119 (34)	120 (31.6)	0.76
Ja, häufig	141 (40.3)	159 (41.7)	
Ja, ab und zu	71 (20.3)	83 (21.7)	
Nein	18 (4.9)	18 (4.6)	
Fehlende Daten	1 (0.3)	0	

(Fortsetzung der Tabelle 2 auf der folgenden Seite)

Tabelle 2. Weitere Ergebnisse der Studienteilnehmer bei der Folgeuntersuchung

Ergebnis	Placebo Gruppe (n= 350)	SP Gruppe (n= 380)	p ^a
Antimalariamedikamente^d			
Ja, sehr häufig	41 (11.7)	29 (7.5)	0.37
Ja, häufig	142 (40.6)	163 (42.9)	
Ja, ab und zu	107 (30.6)	112 (29.5)	
Ja, Häufigkeit unbekannt	1 (0.2)	1 (0.2)	
Nein	59 (16.9)	75 (19.6)	
Fehlende Daten	0	1 (0.3)	
Falls Ja, welches Antimalariamedikament^c			
Chloroquine alleine	16 (5.5)	20 (6.6)	0.58
Amodiaquine alleine	214 (73.4)	223 (73.4)	0.96
Amodiaquine + Artesunate	114 (38.9)	132 (43.3)	0.28
Fansidar	8 (2.8)	4 (1.2)	0.20
Quinine	40 (13.8)	49 (15.9)	0.42
Andere/unbekannt	12 (3.9)	15 (4.8)	0.64
Adäquate Antimalariatherapie in den letzten 4 Wochen^c			
Ja	78 (22.3)	72 (19)	0.31
Nein	271 (77.4)	308 (81)	
Fehlende Daten	1 (0.3)	0	
Akzeptanz von IPTi^{c,e}			
1) „gut für die generelle Entwicklung“			
Ja	346 (98.8)	372 (97.9)	0.43
Nein	2 (0.6)	6 (1.6)	
Fehlende Daten	2 (0.6)	2 (0.5)	
2) „länger warten“			
Ja	346 (98.8)	373 (98.2)	0.59
Nein	2 (0.6)	5 (1.2)	
Fehlende Daten	2 (0.6)	2 (0.6)	
3) „weiterempfehlen“			
Ja	344 (98.4)	371 (98)	0.74
Nein	4 (0.9)	7 (1.6)	
Fehlende Daten	2 (0.7)	2 (0.4)	
4) „weiterhin an Studien teilnehmen“			
Ja	346 (98.8)	373 (98.2)	0.59
Nein	2 (0.6)	5 (1.3)	
Fehlende Daten	2 (0.6)	2 (0.5)	

Daten für Anzahl (= n) und Prozent (%) der Kinder. SP, Sulfadoxin-Pyrimethamin.

a) Bestimmt durch χ^2 -Test.

b) Nach den "US Center for Disease Control Growth Charts" für 2000.

c) Information durch Befragung der Erziehungsberechtigten der Studienteilnehmer erhalten.

d) seit letztem Studienbesuch 2005

e) Vollständige Fragen auf englisch: 1) Do you think that IPTi was good for the general development and health of your child? 2) Would you like IPTi to be given to your child (or brothers and sisters) at times of routine vaccinations even if you would have to wait longer at the clinic? 3) Would you recommend IPTi to be given to infants of your friends and family members? 4) Would you and your child ever take part in a research study again?

Tabelle 3. Risiko für eine Parasitämie über 500/ μ L zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung in Abhängigkeit von der Parasitämie-Inzidenz-Rate > 500/ μ L während des 21-monatigen Beobachtungszeitraums der ursprünglichen SP-IPTi-Studie.

Parasitämie Inzidenz Rate ^a	n ^b	Parasitämie >500/ μ L (%) ^c	OR (CI)	p ^d
0	125	15 (12.0)	1	
>0 - \leq 1	133	19 (14.3)	1.21 (0.58-2.51)	0.59
>1 - \leq 2	181	57 (31.5)	3.37 (1.81-6.28)	<0.001
>2 - \leq 3	130	55 (42.3)	5.38 (2.83-10.29)	<0.001
>3	132	62 (46.7)	6.48 (3.43-12.29)	<0.001

OR, Odds Ratio; CI, 95% Confidence Interval

a) Zwischen dem Alter von 3 Monaten und 24 Monaten, für Parasitämien >500/ μ L

b) Daten fehlen (n= 29)

c) Zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung

d) Gerechnet mit einem logistischen Regressions-Modell von Kindern für die alle Messgrößen vorhanden waren, p-Werte <0.05 werden als signifikant gewertet.

Tabelle 4. Risiko für eine Malaria mit über 500/ μ L Parasiten zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung in Abhängigkeit von der Malaria-Inzidenz-Rate während des 21-monatigen Beobachtungszeitraums der ursprünglichen SP-IPTi-Studie.

Malaria Inzidenz Rate ^a	n ^b	Malaria (%) ^{c+d}	OR (CI)	p ^e
0	203	11 (5.4)	1	
>0 - \leq 1	187	12 (6.4)	1.20 (0.50-2.77)	0.68
>1 - \leq 2	179	12 (6.7)	1.24 (0.54-2.92)	0.60
>2 - \leq 3	87	7 (8.0)	1.53 (0.56-4.07)	0.40
>3	45	3 (6.7)	1.24 (0.28-6.67)	0.72

OR, Odds Ratio; CI, 95% Confidence Interval

a) Zwischen 3 Monaten und 24 Monaten Alter

b) Daten fehlen (n = 29)

c) Zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung,

d) Axilläre Temperatur von $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ oder Fieber während der vorausgehenden 48 Stunden von den Erziehungsberechtigten ohne aktives Nachfragen berichtet, begleitet von asexueller *P. falciparum* Parasitämie mit > 500 Parasiten/ μ L, wurde als Malaria definiert.

e) Gerechnet mit einem logistischen Regressions-Modell von Kindern für die alle Messgrößen vorhanden waren, p-Werte <0.05 werden als signifikant gewertet.

7. Literaturverzeichnis

- Allison, AC.** (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* **1**, 290-4.
- Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Mgone CS, Peto TE, Clegg JB, Alpers MP, Weatherall DJ.** (1999). Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am J Trop Med Hyg.* **60**, 1056-60.
- Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, Breckenridge A, Carneiro I, Critchley J, Danquah I, Doodoo A, Kobbe R, Lell B, May J, Premji Z, Sanz S, Sevene E, Soulaymani-Becheikh R, Winstanley P, Adjei S, Anemana S, Chandramohan D, Issifou S, Mockenhaupt F, Owusu-Agyei S, Greenwood B, Grobusch MP, Kremsner PG, Macete E, Mshinda H, Newman RD, Slutsker L, Tanner M, Alonso P, Menendez C.** (2009). Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet.* **374**, 1533-42.
- Breman JG.** (2001). The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg.* **64**, 1-11.
- Cairns M, Gosling R, Carneiro I, Gesase S, Mosha JF, Hashim R, Kaur H, Lemnge M, Mosha FW, Greenwood B, Chandramohan D.** (2010). Duration of protection against clinical malaria provided by three regimens of intermittent preventive treatment in Tanzanian infants. *PLoS One.* **5**, e9467.
- Chandramohan D, Owusu-Agyei S, Carneiro I, Awine T, Amponsa-Achiano K, Mensah N, Jaffar S, Baiden R, Hodgson A, Binka F, Greenwood B.** (2005). Cluster randomised trial of intermittent preventive treatment for malaria in infants in area of high, seasonal transmission in Ghana. *BMJ.* **331**, 727-33.
- Cox-Singh, J, Davis TME., Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B.** (2008). Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening. *CID* **46**, 165-171.
- Deloron P, Dubois B, Le Hesran JY, Riche D, Fievet N, Cornet M, Ringwald P, Cot M.** (1997). Isotypic analysis of maternally transmitted Plasmodium falciparum-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of P. falciparum infection. *Clin Exp Immunol.* **110**, 212-8.
- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK.** (1999). Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* **22**, 13-36.
- Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C.** (1999). Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med.* **5**, 340-3.
- Grobusch MP, Egan A, Gosling RD, Newman RD.** (2007). Intermittent preventive therapy for malaria: progress and future directions. *Curr Opin Infect Dis.* **20**, 613-20.
- Gosling RD, Gesase S, Mosha JF, Carneiro I, Hashim R, Lemnge M, Mosha FW, Greenwood B, Chandramohan D.** (2009). Protective efficacy and safety of three antimalarial regimens for intermittent preventive treatment for malaria in infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* **374**, 1521-32.
- Gosling RD, Cairns ME, Chico RM, Chandramohan D.** (2010). Intermittent preventive treatment against malaria: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **8**, 589-606.
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM.** (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Natur.* **352**, 595-600.

- Kitua AY, Smith T, Alonso PL, Masanja H, Urassa H, Menendez C, Kimario J, Tanner.** (1998). Plasmodium falciparum malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health.* **4**, 475-84.
- Kobbe R, Kreuzberg C, Adjei S, Thompson B, Langefeld I, Thompson PA, Abruquah HH, Kreuels B, Ayim M, Busch W, Marks F, Amoah K, Opoku E, Meyer CG, Adjei O, May J.** (2007). A randomized controlled trial of extended intermittent preventive antimalarial treatment in infants. *Clin Infect Dis.* **45**, 16-25.
- Kobbe R, Adjei S, Kreuzberg C, Kreuels B, Thompson B, Thompson PA, Marks F, Busch W, Tosun M, Schreiber N, Opoku E, Adjei O, Meyer CG, May J.** (2007). Malaria incidence and efficacy of intermittent preventive treatment in infants (IPTi). *Malar J.* **6**, 163.
- Kreuels B, Kobbe R, Adjei S, Kreuzberg C, von Reden C, Bäter K, Klug S, Busch W, Adjei O, May J.** (2008). Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogeneous area with high endemicity. *J Infect Dis.* **197**, 85-93.
- Marks F, von Kalckreuth V, Kobbe R, Adjei S, Adjei O, Horstmann RD, Meyer CG, May J.** (2005). Parasitological rebound effect and emergence of pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum after single-dose sulfadoxine-pyrimethamine. *J Infect Dis.* **192**, 1962-5.
- Marsh K, Otoo L, Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM.** (1998). Antibodies to blood stage antigens of Plasmodium falciparum in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **3**, 293-303.
- May J, Adjei S, Busch W, Gabor JJ, Issifou S, Kobbe R, Kreuels B, Lell B, Schwarz NG, Adjei O, Kremsner PG, Grobusch MP.** (2008). Therapeutic and prophylactic effect of intermittent preventive anti-malarial treatment in infants (IPTi) from Ghana and Gabon. *Malar J.* **7**, 198.
- Mayor A, Serra-Casas E, Sanz S, Aponte JJ, Macete E, Mandomando I, Puyol L, Berzosa P, Dobaño C, Aide P, Sacarlal J, Benito A, Alonso P, Menéndez C.** (2008). Molecular markers of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment for malaria in Mozambican infants. *J Infect Dis.* **197**, 1737-42.
- Menendez C, Kahigwa E, Hirt R, Vounatsou P, Aponte JJ, Font F, Acosta CJ, Schellenberg DM, Galindo CM, Kimario J, Urassa H, Brabin B, Smith TA, Kitua AY, Tanner M, Alonso PL.** (1997). Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet.* **350**, 844-50.
- Meyer CG, Calixto Fernandes MH, Intemann CD, Kreuels B, Kobbe R, Kreuzberg C, Ayim M, Ruether A, Loag W, Ehmen C, Adjei S, Adjei O, Horstmann RD, May J.** (2011) IL3 variant on chromosomal region 5q31-33 and protection from recurrent malaria attacks. *Hum Mol Genet.* **20**, 1173-81.
- Mockenhaupt FP, Reither K, Zanger P, Roepcke F, Danquah I, Saad E, Ziniel P, Dzisi SY, Frempong M, Agana-Nsiire P, Amoo-Sakyi F, Otchwemah R, Cramer JP, Anemana SD, Dietz E, Bienzle U.** (2007). Intermittent preventive treatment in infants as a means of malaria control: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in northern Ghana. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**, 3273-81.
- Naidoo I, Roper C.** (2011). Drug resistance maps to guide intermittent preventive treatment of malaria in African infants. *Parasitology.* **138**, 1469-79.

- Odiambo FO, Hamel MJ, Williamson J, Lindblade K, ter Kuile FO, Peterson E, Otieno P, Kariuki S, Vulule J, Slutsker L, Newman RD.** (2010). Intermittent preventive treatment in infants for the prevention of malaria in rural Western Kenya: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *PLoS One*. **5**, e10016.
- O'Meara WP, Breman JG, McKenzie FE.** (2005). The promise and potential challenges of intermittent preventive treatment for malaria in infants (IPTi). *Malar J*. **20**, 33.
- Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, Gilles HM.** (1976). Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet*. **1**, 1269-72.
- Quelhas D, Puyol L, Quintó L, Serra-Casas E, Nhampossa T, Macete E, Aide P, Mayor A, Mandomando I, Sanz S, Aponte JJ, Chauhan VS, Chitnis CE, Alonso PL, Menéndez C, Dobaño C.** (2008). Impact of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine on antibody responses to erythrocytic-stage *Plasmodium falciparum* antigens in infants in Mozambique. *Clin Vaccine Immunol*. **15**, 282-91.
- Quelhas D, Jiménez A, Quintó L, Serra-Casas E, Mayor A, Cisteró P, Puyol L, Wilson DW, Richards JS, Nhampossa T, Macete E, Aide P, Mandomando I, Sanz S, Aponte JJ, Alonso PL, Beeson JG, Menéndez C, Dobaño C.** (2011) IgG against *Plasmodium falciparum* variant surface antigens and growth inhibitory antibodies in Mozambican children receiving intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine. *Immunobiology*. **216**, 793-802.
- Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA.** (1992). In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun*. **60**, 3725-30.
- Richards AL.** (1997). Tumour necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. *Int J Parasitol*. **27**, 1251-63.
- Roetynck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S.** (2006). Natural killer cells and malaria. *Immunol Rev*. **214**, 251-63.
- Rosen JB, Breman JG.** (2004). Malaria intermittent preventive treatment in infants, chemoprophylaxis, and childhood vaccinations. *Lancet*. **363**, 1386-8.
- Ruwende C, Hill A.** (1998). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med*. **76**, 581-8.
- Schellenberg D, Menendez C, Kahigwa E, Aponte J, Vidal J, Tanner M, Mshinda H, Alonso P.** (2001). Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in Tanzanian infants: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. **357**, 1471-7.
- Schellenberg D, Menendez C, Aponte JJ, Kahigwa E, Tanner M, Mshinda H, Alonso P.** (2005) Intermittent preventive antimalarial treatment for Tanzanian infants: follow-up to age 2 years of a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. **365**, 1481-3.
- Schreiber N, Kobbe R, Adjei S, Adjei O, Klinkert MQ, May J.** (2007) Immune responses after single-dose sulphadoxine-pyrimethamine indicate underestimation of protective efficacy of intermittent preventive treatment in infants. *Trop Med Int Health*. **12**, 1157-63.
- Setel PW, Rao C, Hemed Y, Whiting DR, Yang G, Chandramohan D, Alberti KG, Lopez AD.** (2006). Core verbal autopsy procedures with comparative validation results from two countries. *PLoS Med*. **3**, e268.
- Shulman CE, Dorman EK, Cutts F, Kawuondo K, Bulmer JN, Peshu N, Marsh K.** (1999) Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. **353**, 632-6.
- Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI.** (2005). The entomological inoculation rate and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Nature*. **438**, 492-5.

- Snow RW, Nahlen B, Palmer A, Donnelly CA, Gupta S, Marsh K.** (1998). Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis.* **177**, 819-22.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI.** (2005). The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature.* **434**, 214-7.
- Staalsoe T, Shulman CE, Dorman EK, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L.** (2004). Intermittent preventive sulfadoxine-pyrimethamine treatment of primigravidae reduces levels of plasma immunoglobulin G, which protects against pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun.* **72**, 5027-30.
- Verhoef H, Hodgins E, West CE, Carter JY, Kok FJ.** (1998) Diagnosis of fever in Africa. *Lancet.* **351**, 372-3; author reply 373-4.
- Williams TN, Maitland K, Bennett S, Ganczakowski M, Peto TE, Newbold CI, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB.** (1996). High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature.* **383**, 480-1.
- White, NJ** (2008). Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite. *CID* **46**, 172-3.
- White, NJ.** (2005). Intermittent presumptive treatment for malaria. *PLoS Med.* **2**, e3.
- WHO.** (2010) *World Malaria Report*. World Health Organization
- WHO.** (2010) WHO Policy recommendation on Intermittent Preventive Treatment during infancy with sulphadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for Plasmodium falciparum malaria control in Africa.
http://www.who.int/malaria/news/WHO_policy_recommendation_IPTi_032010.pdf
Accessed 26 October 2011.

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jürgen May für die Betreuung und Förderung bedanken sowie für die Möglichkeit, für ein halbes Jahr in Kumasi, Ghana zu forschen und zu leben.

Ebenso gilt mein Dank Dr. med. Robin Kobbe, der mich besonders in Ghana unterstützt hat und mit dessen Zusammenarbeit die Publikation entstanden ist.

Während der Datenaufnahme im Feld waren der Übersetzer/Study-Nurse Dan-Ladi Godwin und der Medizinisch Technische Assistent Nana Boakye Yadom eine sehr große Hilfe. Auch gilt mein Dank allen ehemaligen Fieldworkern der ursprünglichen Studie. Ohne deren erneutes Mitwirken wäre die Datenaufnahme wesentlich schwieriger geworden.

Für die freundliche Zusammenarbeit möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Infektionsepidemiologie bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Wibke Loag und Benno Kreuels, die eine unschätzbare Hilfe beim Auswerten der Daten waren.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei allen Studienteilnehmern und deren Eltern für die Teilnahme an der Studie bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Benedikt J. Hogan

Follow-up Survey of Children Who Received Sulfadoxine-Pyrimethamine for Intermittent Preventive Antimalarial Treatment in Infants

Robin Kobbe,^{1,2,*} Benedikt Hogan,^{1,*} Samuel Adjei,⁴ Philipp Klein,¹ Benno Kreuels,³ Wibke Loag,¹ Ohene Adjei,⁵ and Jürgen May¹

¹Infectious Disease Epidemiology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, ²Department of Paediatrics and ³Section for Tropical Medicine, First Medical Department, University Medical Centre Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁴Ministry of Health/Ghana Health Service, District Health Directorate, Agona, Ashanti Region; and ⁵Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana

Recently, the World Health Organization emphasized the potential benefit of intermittent preventive treatment in infants (IPTi) to control malaria and officially recommended implementation of IPTi with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) in areas with moderate and high transmission, where SP resistance is not high. As reported rebound effects make further observation mandatory, we performed a survey of participants of a former IPTi trial. Malarionetric parameters were similar in the SP and the placebo group. In contrast, anti-*Plasmodium falciparum* lysate immunoglobulin G antibody levels, a proxy measure for preceding malaria episodes, remained lower in the SP arm. The most likely explanation is a lower overall exposure to parasitic antigens after IPTi.

Received 14 June 2010; accepted 9 November 2010; electronically published 20 December 2010.

Potential conflicts of interest: none reported.

Contributors: This work is part of the PhD thesis of B.H. Substantial input came from all investigators. R.K., B.H., and J.M. designed the study, were involved in all phases of the study, and have full access to all the data in the study. R.K. takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. O.A. was the principal investigator. R.K., S.A., B.H., and B.K. were responsible for work in the field, safety surveillance, and overall coordination of the cross-sectional survey. Analysis of data and writing of the manuscript were led by R.K., B.H., W.B., and J.M. All authors approved the final manuscript.

*R.K. and B.H. equally contributed to the publication.

Reprints or correspondence: Dr Robin Kobbe, Department of Paediatrics, University Medical Centre Eppendorf, Hamburg, Germany, Martinistr 52, D-20246 Hamburg, Germany (kobbe@bni-hamburg.de).

The Journal of Infectious Diseases 2010;203:556–560

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1537-6613/2010/2030-0001\$15.00

DOI: 10.1093/infdis/jiq079

Intermittent preventive treatment in infants (IPTi) is regarded as a promising malaria control tool, and the World Health Organization (WHO) has recommended implementation of IPTi with sulfadoxine-pyrimethamine (SP) in areas with moderate to high malaria transmission, where parasitic resistance to SP is not high [1]. The strategy behind IPTi is to administer full courses of antimalarials alongside routine vaccinations of the Expanded Program on Immunization of the WHO, regardless of whether an infant is parasitemic [2]. A pooled analysis of 6 trials using SP for IPTi in 4 African countries demonstrated a protective efficacy of 30.3% against uncomplicated malaria, 21.3% against anemia, and 22.9% against all-cause hospital admission during the first year of life [3]. In another trial from northern Tanzania comparing various drugs for IPTi, SP failed to provide protective efficacy due to preexisting drug resistance [4].

So far, however, long-term effects of IPTi such as possible extended efficacy or rebound phenomena are largely unknown. During the first SP-IPTi trial in Tanzania, an extended protective antimalarial effect beyond the duration of the pharmacological effects was described [5]. A detailed analysis of data from 2 studies from Ghana and Gabon suggested that SP-IPTi works mainly through a therapeutic and prophylactic effect over 30–60 d after drug application and that sustained effects beyond posttreatment prophylaxis might be very low [6]. In at least 3 of the SP-IPTi trials, distinct rebound effects of anemia, high-density parasitemia, or hospital admissions were reported [7–9]. Nevertheless, results from an extended follow-up study in Gabon do not appear to support the concept of rebound effects after SP-IPTi [10].

To assess the long-term effects of SP-IPTi, a cross-sectional follow-up survey of former study participants was performed 4 years after initial recruitment [7]. Anti-*Plasmodium falciparum* lysate immunoglobulin G antibody (*Pf*LIgG) levels were used as a proxy measure for the frequency of preceding malaria episodes, as has been shown to be expedient in this setting [11].

METHODS

The follow-up survey took place in the same 9 villages (Afigya Sekyere district, Ashanti region, Ghana) where the placebo-controlled, double-blind, randomized SP-IPTi trial was performed (registered at www.ClinicalTrials.gov; NCT00206739). Recruitment in the present study was between September and November 2007, which was 3 years after the unblinding in the IPTi trial. In the study area, there is intense perennial malaria transmission. Documentation of medical histories, physical

examinations, blood sampling, and laboratory testing were performed following the same standard operating procedures as described previously [7, 11]. Axillary temperature of $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ or fever during the preceding 48 h reported by caretakers without being asked, accompanied by asexual *P. falciparum* parasitemia of >500 parasites/ μL , was defined as malaria. Both attendance at outpatient clinics and admission to hospital in the time between the original trial and the current survey were assessed by interviewing caretakers and checking medical records.

Children with uncomplicated malaria were treated with artesunate (4 mg/kg/d) plus amodiaquine (10 mg/kg/d) for 3 d according to national guidelines. *PfLlgG* levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and expressed in relative units (RUs) as described previously [11]. Methods of *PfLlgG* assessment were identical in the IPTi trial and in the present study but were performed independently at different time points.

Analyses were performed using Stata/IC software (version 10.0; StataCorp). Variables were compared between study arms by a contingency test (χ^2) for proportions and a nonparametric test (Wilcoxon rank-sum) for continuous variables. The Spearman rank correlation test was used to correlate *PfLlgG* levels at age 24 months with malaria incidence rates during the first 2 years of life (original trial) and with *PfLlgG* levels measured at the time of the current survey. The risk of being parasite positive at the time of the survey in dependence on rates of parasitemia during the original trial was calculated using a bivariate logistic regression model, testing SP treatment as a possible confounding covariate. *P* values $<.05$ were considered significant.

The aim and principles of the study were explained to the caretakers of participants, and informed consent was signed or thumbprinted by participants' caregivers in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Committee on Human Research Publication and Ethics of the School of Medical Science of the Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana.

RESULTS

More than 4 years after initial recruitment, 730 (82.3%) of the 887 children who had completed the original IPTi trial could be included. Baseline characteristics were similar in both study arms (Table 1). In total, 45 (6.2%) children had uncomplicated malaria and 246 (33.7%) had *P. falciparum* parasitemia, without significant differences between the treatment arms.

At the age of 2 years, *PfLlgG* levels were significantly higher in children of the placebo group than in those of the SP group (median, 32.3 RUs [interquartile range, 13.7–55.8] vs 28.4 RUs [8.9–51.8], respectively; *P* = .03). Interestingly, at the time of the current survey, *PfLlgG* levels were—with borderline significance—still higher in the placebo group (Table 1). The validity of *PfLlgG* levels as a proxy measure for the number of

malaria episodes during the nonobservation period could be demonstrated by the positive correlation between *PfLlgG* levels and the malaria incidence rates during the 21-month observation period, showing a similar pattern in each of the study arms (Figure 1A). Accordingly, the individual *PfLlgG* level at the age of 24 months and that at the time of the current survey showed a slight but significant positive correlation, despite the long time interval between the 2 measurements (Figure 1B). It is noteworthy that the risk of parasite positivity at the time of the survey increased markedly with each measured episode of parasitemia during the first 2 years of life. This effect was approximately linear with an odds ratio of 1.28 (95% confidence interval, 1.20–1.36; *P* < .001) for each additional episode of parasitemia, independent of SP treatment.

Prevalences of outpatient visits, hospital admissions, and anemia were not significantly different between the SP and placebo arms, possibly due to a low power in those variables with rare events. Since the end of the original trial, 5 deaths were reported in the study population, 2 in the placebo arm and 3 in the SP arm. Verbal autopsies were performed during visits to families of the deceased children. Four deaths occurred within 5 months after the last active follow-up and 1 in a child 4 years of age. Two deaths, 1 in each study arm, were assumed to be related to severe malaria; 1 death resembled an acute renal failure of unknown origin; and the remaining 2 deaths were thought to be caused by typhoid fever. No evidence for Stevens-Johnson syndrome, known to be a rare serious adverse event of SP, was recorded.

DISCUSSION

In the present survey, which was performed almost 3 years after the last dose of SP had been given to participants in a clinical trial of IPTi, there were no differences in the malariometric measures, morbidity, or mortality between the 2 study groups. This finding supports the assumption of the absence of a rebound effect, but cross-sectional surveys only depict information at a single point in time, which is clearly inferior to longitudinal studies. Therefore, *PfLlgG* level was used as a proxy measure for malaria episodes during the nonobservation period [11, 12]. At the end of the original IPTi trial, when participants were 24 months of age, *PfLlgG* levels were significantly higher in the placebo group than in the SP group, most likely due to the higher malaria incidence rate in the unprotected placebo arm. Unexpectedly, *PfLlgG* levels still tended to be higher in children of the placebo arm at the time of the current survey. Assuming similar malaria exposure risks in the 2 arms due to environmental factors, there are 3 main interpretations for this observation: The lower *PfLlgG* level in the SP arm may indicate that (1) a rebound phenomenon with an inhibition of the development of immune responses during and/or after IPTi occurred, (2) malaria episodes were less frequent in the SP arm

Table 1. Characteristics and Outcomes of Study Participants at Follow-up

	Placebo (n = 350)	SP (n = 380)	P ^a
Characteristics			
Sex			
Male	183 (52.3)	192 (50.5)	.64
Female	167 (47.7)	188 (49.5)	
Age, months, mean ± SD	53.1 ± 3.7	52.8 ± 3.8	.37
β-Globin genotype ^b			
HbAA	258 (73.7)	275 (72.4)	.96
HbAS	39 (11.1)	44 (11.6)	
HbSS	1 (.3)	1 (.3)	
HbAC	34 (9.7)	45 (11.8)	
HbCC	1 (.3)	1 (.3)	
HbSC	4 (1.1)	4 (1.1)	
Missing data	13 (3.7)	10 (2.6)	
Absent at follow up			
Moved	51 (57.3)	38 (55.9)	.82
Withdrawn	16 (18.0)	14 (20.6)	
Lost to follow-up	20 (22.5)	13 (19.0)	
Died	2 (2.3)	3 (4.3)	
Outcomes			
Uncomplicated malaria ^c			
Yes	18 (5.1)	27 (7.1)	.50
No	319 (91.1)	337 (88.7)	
Missing data	13 (3.7)	16 (4.2)	
Parasitemia			
Positive	120 (34.3)	126 (33.2)	.91
Negative	217 (62.0)	238 (62.6)	
Missing data	13 (3.7)	16 (4.2)	
Total PfLIgG level, RUs, median (IQR)	22.2 (9.3-38.5)	19.1 (6.8-34.5)	<.05
Missing data	12 (3.4)	9 (2.4)	
Hb level, g/dL, mean ± SD	10.3 ± 1.6	10.3 ± 1.5	.77
Anemia			
Moderate anemia (<7.5 g/dL)	10 (2.9)	11 (2.9)	.98
Severe anemia (<5.0 g/dL)	0	2 (.5)	.39
Outpatient visits ^d			
Yes, many times	119 (34.0)	120 (31.6)	.77
Yes, sometimes	141 (40.3)	159 (41.8)	
Yes, once in a while	71 (20.3)	83 (21.8)	
No	18 (5.1)	18 (4.7)	
Missing data	1 (.3)	0	
Hospital admissions ^d			
No	277 (79.1)	305 (80.3)	.36
Yes, once	47 (13.4)	38 (10.0)	
Yes, more than once	23 (6.6)	34 (9.0)	
Yes, frequency unknown	3 (.9)	3 (.8)	

NOTE. Data are no. (%) of participants, unless otherwise indicated. Hb, hemoglobin; IQR, interquartile range; PfLIgG, anti-*Plasmodium falciparum* lysate IgG antibody; RUs, relative units; SD, standard deviation; SP, sulfadoxine-pyrimethamine.

^a Determined using Wilcoxon rank-sum test or χ^2 test. *P* values <.05 were considered significant.

^b β-Globin genotype was determined by polymerase chain reaction.

^c An episode of malaria was defined as fever (axillary temperature of $\geq 38.0^\circ\text{C}$ or fever during the preceding 48 h reported by caretakers without being asked accompanied by asexual *P. falciparum* parasite load of $>500/\mu\text{L}$.

^d Frequencies since last follow-up of core study. Information obtained by interviewing participants' mothers and caretakers and reviewing medical records.

since the end of the clinical trial, or (3) PfLIgG titers have not yet equalized in both study arms, leading to a remaining imbalance of PfLIgG levels 2 years after the end of the clinical trial. Notably, a selection or reporting bias is unlikely, since all data were derived from a randomized trial and the laboratory personnel measuring PfLIgG levels were blinded to treatment arms.

First, the possibility that SP treatment could have exhibited immunosuppressive effects is conceivable, but unlikely, and

such an effect on *P. falciparum* lysate responses has not been reported so far. Moreover, a review of studies assessing the immune responses after vaccination in combination with SP therapy reported no evidence of relevant differences [13]. Interestingly, antibody responses to single erythrocytic-stage *P. falciparum* antigens in infants in Mozambique did not significantly differ between children receiving IPTi with SP and those receiving placebo at any time point measured, with the

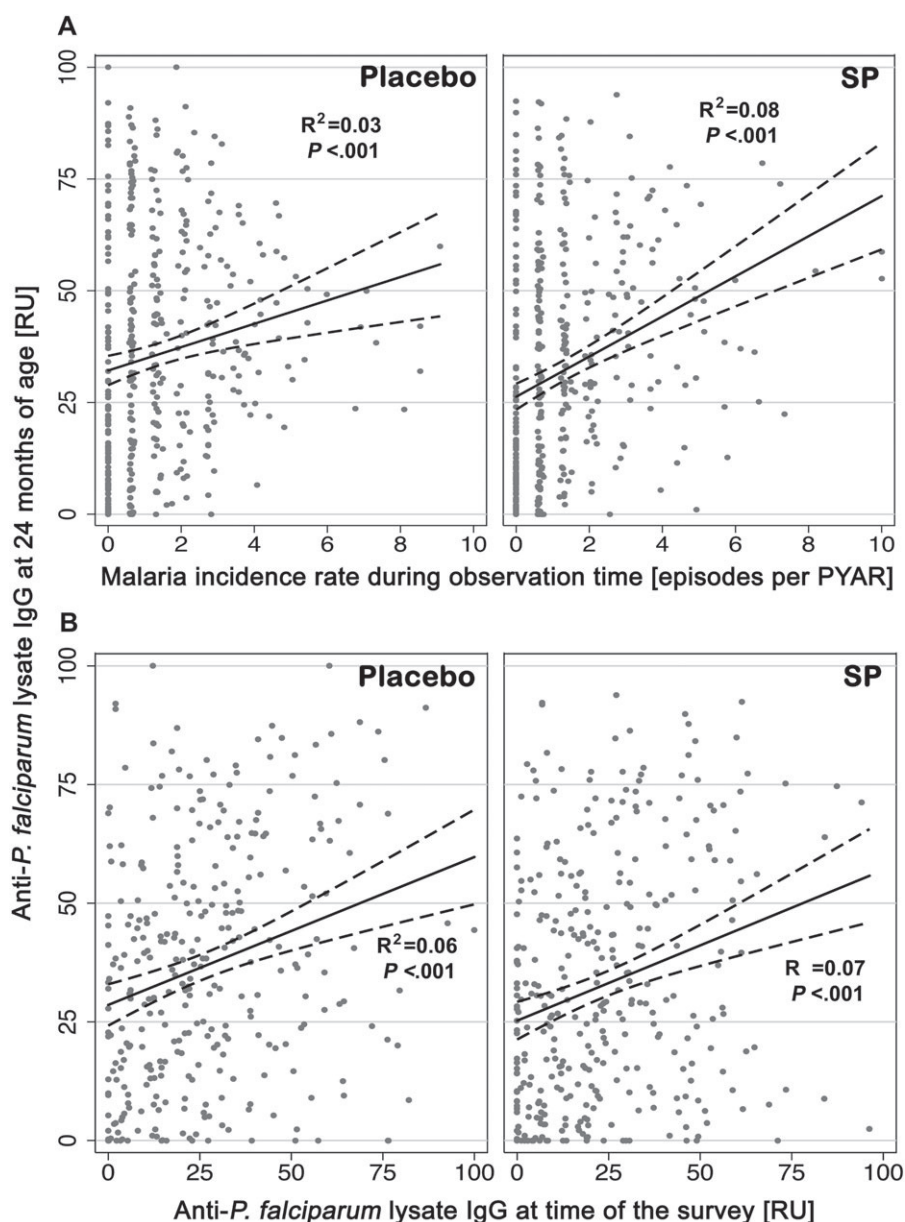


Figure 1. Correlation of anti-*Plasmodium falciparum* lysate IgG antibody (PflIgG) levels and malaria incidence rate. *A*, Correlation of PflIgG levels at the age of 24 months with the documented malaria incidence rates during the 21-month observation period. There is a similar pattern in children formerly treated with placebo or sulfadoxine-pyrimethamine (SP). *B*, Correlation between individual PflIgG levels at age 24 months and PflIgG levels at the time of the survey, plotted by treatment. Despite the long time interval between the 2 measurements, there is a positive correlation with a similar pattern in both study arms. PflIgG level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay and expressed in relative units (RUs) as described previously [11]. PYAR, person-years at risk.

exception of IgG and IgG1 responses to apical membrane antigen 1 and/or merozoite surface protein 1, which were even higher in the SP-treated group [14].

Second, during the observation period there was no further protective efficacy after elimination of SP from the children's blood, as shown previously [7]. Consequently, long-lasting protective effects beyond posttreatment prophylaxis are not expected, although a sustained protection has been described elsewhere [5]. This is in line with findings from a study in

northern Tanzania that tested different antimalarials for IPTi and showed that the benefits of IPTi are directly dependent on the pharmacodynamics of the drugs involved [15]. However, it cannot be excluded that small long-term effects on the risk of parasitemia exist, which could not have been observed clinically. Third, it has been demonstrated before that PflIgG levels in the second year of life are dependent on the frequency of preceding infections in both study arms [11]. In that study, PflIgG levels were generally lower in children protected by SP. Furthermore,

PfLlIgG levels were dependent on malaria incidences in children's home villages and this correlation was more pronounced in children in the SP arm than in those from the placebo arm, indicating a higher reduction of overall parasitic exposure in more intense transmission settings [16].

One interesting observation, that each parasitemia episode during the first 2 years of life increases the risk of parasite positivity at time of the survey, was independent of former SP treatment. This corresponds to the positive correlation of individual PfLlIgG level, which indicates that children with high levels of antibodies in the past also tend to have higher antibody levels years later. Apart from indirectly supporting the hypothesis that immune responses were not selectively inhibited by SP, these results show that individual susceptibilities to *P. falciparum* are sustainable over years. This is in line with earlier observations that a small percentage of the population suffers the majority of infections [17]. Identifying this high-risk group is essential to successfully targeting future malaria control interventions. Meanwhile, by presumptively treating all infants, IPTi is not very selective, but it is cheap, safe, and effective.

In summary, it seems appropriate to use PfLlIgG level as a proxy measure for the number of malaria episodes during the nonobservation period. Accordingly, the most likely explanation for lower PfLlIgG levels in children of the SP arm seems to be a lower overall exposure to parasitic antigens in comparison to children who received placebo. Taken together, these findings argue against long-term negative rebound effects after SP-IPTi in areas of high malaria transmission.

Funding

No external funding source, including the IPTi Consortium, had any influence on design and conduct of the study; preparation, review, and approval of the manuscript; or analysis and interpretation of the data.

Acknowledgments

We thank all participants and their parents and/or guardians for participating in the study.

References

1. WHO. Report of the Technical Consultation on Intermittent Preventive Treatment in Infants (IPTi), Technical Expert Group on Preventive Chemotherapy. Geneva: April 23–24, 2009. [2. Grobusch MP, Egan A, Gosling RD, Newman RD. Intermittent preventive therapy for malaria: progress and future directions. *Curr Opin Infect Dis* **2007**; 20:613–20.
 3. Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, et al. Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* **2009**; 374:1533–42.
 4. Gosling RD, Gesase S, Mosha JF, et al. Protective and efficacy safety of three antimalarial regimens for intermittent preventive treatment for malaria in infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2009**; 374:1521–32.
 5. Schellenberg D, Menendez C, Aponte JJ, et al. Intermittent preventive antimalarial treatment for Tanzanian infants: follow-up to age 2 years of a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **2005**; 365:1481–83.
 6. May J, Adjei S, Busch W, et al. Therapeutic and prophylactic effect of intermittent preventive anti-malarial treatment in infants \(IPTi\) from Ghana and Gabon. *Malar J* **2008**; 7:198.
 7. Kobbe R, Kreuzberg C, Adjei S, et al. A randomized controlled trial of extended intermittent preventive antimalarial treatment in infants. *Clin Infect Dis* **2007**; 45:16–25.
 8. Chandramohan D, Owusu-Agyei S, Carneiro I, et al. Cluster randomised trial of intermittent preventive treatment for malaria in infants in area of high, seasonal transmission in Ghana. *BMJ* **2005**; 331:727–33.
 9. Mockenhaupt FP, Reither K, Zanger P, et al. Intermittent preventive treatment in infants as a means of malaria control: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in northern Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51:3273–81.
 10. Grobusch MP, Gabor JJ, Aponte JJ, et al. No rebound of morbidity following intermittent preventive sulfadoxine-pyrimethamine treatment of malaria in infants in Gabon. *J Infect Dis* **2009**; 200:1658–61.
 11. Schreiber N, Kobbe R, Adjei S, Adjei O, Klinkert MQ, May J. Immune responses after single-dose sulphadoxine-pyrimethamine indicate underestimation of protective efficacy of intermittent preventive treatment in infants. *Trop Med Int Health* **2007**; 12:1157–63.
 12. Marsh K, Otoo L, Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1989**; 83:293–303.
 13. Rosen JB, Breman JG. Malaria intermittent preventive treatment in infants, chemoprophylaxis, and childhood vaccinations. *Lancet* **2004**; 363:1386–88.
 14. Quelhas D, Puyol L, Quintó L, et al. Impact of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine on antibody responses to erythrocytic-stage *Plasmodium falciparum* antigens in infants in Mozambique. *Clin Vaccine Immunol* **2008**; 15:1282–91.
 15. Cairns M, Gosling R, Carneiro I, et al. Duration of protection against clinical malaria provided by three regimens of intermittent preventive treatment in Tanzanian infants. *LoS One* **2010**; 5:e9467.
 16. Kobbe R, Adjei S, Kreuzberg C, et al. Malaria incidence and efficacy of intermittent preventive treatment in infants \(IPTi\). *Malar J* **2007**; 6:163.
 17. Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI. The entomological inoculation rate and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Nature* **2005**; 438:492–5.](http://malaria.</div><div data-bbox=)