

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 249 - 253

Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität, Wien
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. G. Wiedermann) (1)
Landesinstitut für Tropenmedizin, Berlin (Vorstand: Univ. Prof. Dr. G. Bienzle) (2)
Universitätsklinik für Chemotherapie, Wien (Vorstand: Univ. Prof. Dr. K. Moser) (3)
SUCAM Acre, Brasilien (Vorstand: Dr. R. M. Rocha) (4)
WHO, Genf (Chief of Malaria Action Program: Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer) (5)

In vitro Resistenzbestimmung von *Plasmodium falciparum* in Acre/Brasilien

(Zwischenbericht)

**P. G. Kremsner¹, G. M. Zotter¹, H. Feldmeier², W. Graninger³, H. Kollaritsch¹,
H. Stemberger¹, G. Wiedermann¹, R. M. Rocha⁴, W. H. Wernsdorfer⁵**

Einleitung

Seit über dreißig Jahren sind Resistenzphänomene des Erregers der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, bekannt. Sie betrafen zunächst die Biguanide, später die Diaminopyrimidine und schließlich in den Sechzigerjahren die 4-Aminochinolone. Aus Kolumbien und Brasilien kamen die ersten Berichte über das Versagen von Chloroquin bei *Plasmodium falciparum*-Infektionen (4, 7). Genaue Kenntnisse über das Resistenzverhalten von *Plasmodium falciparum* gegenüber den 4-Aminochinolinen in Brasilien existieren hauptsächlich vom östlichen Amazonien (8). Acre ist ein neuerschlossenes Gebiet im Westen Amazoniens, von dem keine Daten über die Resistenzsituation von *Plasmodium falciparum* bekannt sind. Ebenfalls interessant erschien es, die Suszeptibilität des Parasiten gegenüber Chinin, dem Jahrzehnte verwendeten Malariamittel einerseits und Mefloquin — der in diesem Bereich noch nicht verwendeten Substanz — andererseits zu prüfen und eventuell eine Primärresistenz gegenüber Mefloquin oder eine Kreuzresistenz von Mefloquin und Chinin aufzuzeigen.

Material und Methoden

Die Studie wurde von Jänner bis März 1987 bei der Superintendencia de Campanhas de Saude publica (SUCAM) in Rio Branco, Acre, Brasilien durchgeführt. Rio Branco liegt 10° südlich des Äquators und 68° westlich des Null-Meridians im Amazonasgebiet nahe der Grenze zu Bolivien und Peru.

70 Patienten, die SUCAM konsultierten und die Aufnahmekriterien erfüllten, wurden in die Studie aufgenommen. Folgende Aufnahmekriterien mußten gegeben sein: Eine reine *Plasmodium falciparum*-Infektion, eine Parasitämie zwischen 500 und 90.000 Trophozoiten/µl Blut, keine Einnahme von gegen Malaria wirksamen Chemotherapeutika in den vergangenen vier Wochen und Einverständnis zur Blutabnahme. Die Patienten waren von 0,2 bis 62 Jahre alt (Median: 25 Jahre). 17 Frauen und 53 Männer nahmen an der Studie teil. Die Parasitämie lag zwischen 500 und 90.000 Parasiten/µl Blut (Median: 5.200/µl).

Der Mikrotest nach RIECKMANN wurde für die Resistenzprüfung verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden von der WHO mit den zu prüfenden Chemotherapeutika vorbeschickt und bezogen. (Batches C 96, A 17, M 85, Q 16). Neben jeweils einem Kontrollansatz ohne Medikament waren die Konzentrationen pro Loch für Chloroquin: 1; 2; 4; 5,7; 8; 16 und 32pmol und für Amodiaquin: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 und 16 pmol und für Mefloquin: 0,5; 1; 2; 4; 5,7; 8 und 16 pmol und für Chinin: 4; 8; 16; 32; 64; 128 und 256 pmol. 0,2 ml venöses, hepariniertes Blut der Patienten wurde mit 1,8 ml Hepes und NaHCO₃ gepuffertem RPMI 1640 gemischt und unmittelbar nachher in Portionen zu je 50 µl in die Löcher der Testplatten verteilt. Die Parasiten wurden danach bei CO₂ angereicherter Atmosphäre bei 37,5° C für 24 bis 36 Stunden inkubiert. Dann wurde vom Bodensatz jedes Loches ein Dicker Tropfen gemacht und nach Giemsa (5%) 10 Minuten gefärbt. In jedem Dicken Tropfen wurden die reifen Schizonten pro 200 asexuellen Parasiten ausgezählt. Isolate, die in der Kontrolle weniger als 10% Reifung zeigten, wurden nicht für die Evaluierung herangezogen. Die von der WHO angegebenen Grenzwertkonzentrationen wurden für die Berechnung des Resistenzgrades der Plasmodien gegenüber dem jeweiligen Chemotherapeutikum benutzt. Die Signifikanzberechnung erfolgte durch den Vergleich zweier Häufigkeiten aufgrund der Binominalverteilung.

TABELLE 1
Resistenzgrad von *Plasmodium falciparum* gegenüber vier Medikamenten

Medikamenten- konzentration in µmol/l Blut	Zahl der gereiften Isolate			
	Chloroquin	Amodiaquin	Mefloquin	Chinin
0	33	34	34	34
0,05		34		
0,1		34	34	
0,2	33	33	33	
0,4	32	23	24	
0,8	31	9	5	34
1,14	28		1	
1,6	20	3	0	34
3,2	10	0	0	33
6,4	2			27
12,8				16
25,6				2
51,2				0

Ergebnisse

Je 70 Isolate wurden in Kultur gebracht und gegen Chloroquin, Amodiaquin, Chinin und Mefloquin im Test angesetzt. Zu geringe Reifung der Plasmodien oder technische Mängel bei der Arbeit im Feld ließen schließlich 48,2% der Tests zur Auswertung kommen.

Tabelle 1 zeigt die Zahlen der gereiften Isolate bei den verschiedenen Medikamentenkonzentrationen. Die Tests wurden nach den Richtlinien der WHO (persönliche Mitteilung W. H. Wernsdorfer) ausgewertet. Danach gilt ein *Plasmodium falciparum*-Isolat, das bei 3,2 µmol Mefloquin/l Blut oder bei 51,2 µmol Chinin/l Blut eine Schizontenreifung zeigt, als resistent. So waren 100% der Isolate gegenüber Chinin und Mefloquin sensibel. Im Test für Chloroquin wird eine Parasitenreifung bei 1,14 µmol/l als Zeichen für eine Resistenz angesehen. 28 Isolate (85%) von 33 reiften bis zumindest dieser Konzentration. Der entsprechende Grenzwert für Amodiaquin liegt bei 0,4 µmol/l. 23 (68%) von 34 Isolaten zeigten Schizogonie bis wenigstens zu dieser Verdünnung. Dieser Unterschied war statistisch gerade nicht signifikant ($p = 0,05$). Ein *Plasmodium falciparum*-Isolat zeigte eine Amodiaquin-Resistenz und Chloroquin-Empfindlichkeit, aber sieben Isolate waren resistent gegenüber Chloroquin und sensibel gegenüber Amodiaquin.

Diskussion

Seit Anfang 1987 ist die vorherrschende Malariaart in Acre *Plasmodium falciparum*. Resistenzprobleme bei der Malaria tropica in diesem Gebiet sind außerdem seit Jahren bekannt. Anfang der Achtzigerjahre erschienen Berichte über zunehmende Chloroquinresistenzen in Amazonien (5, 8). Eine umfassende Studie aus Kolumbien (2) wies ebenso wie die vorliegende Arbeit *Plasmodium falciparum* in 85 - 95% der Fälle als resistent gegenüber Chloroquin aus. Massive Einwanderung von nicht immuner Bevölkerung nach Amazonien und die jahrzehntelange, manchmal unsachgemäße Verwendung von Chloroquin könnte zu dieser Situation beigetragen haben. In Amazonien wird von einigen Firmen Chloroquin dem Salz und Essen beigemischt (eigene Beobachtung). Nach den Ergebnissen dieser letzten Untersuchungen kann Chloroquin keinesfalls mehr als Prophylaxe oder Therapie der Malaria tropica für diese Regionen empfohlen werden. Im Gegensatz zu anderen Studien (1, 2), bei denen Amodiaquin als wesentlich wirksamer im Vergleich zu Chloroquin beschrieben wurde, konnte in dieser Untersuchung kein sehr deutlicher Unterschied gefunden werden (68% Amodiaquin-Resistenz zu 85% Chloroquin-Resistenz, $p = 0,05$). Erste vorliegende in vivo Ergebnisse aus Acre über Amodiaquin-Therapie bei *Plasmodium falciparum*-Infektionen zeigten einen noch höheren Prozentsatz an Resistenzen (3). Diese offensichtlich rasche Resistenzentwicklung gegenüber Amodiaquin, das seit Beginn 1986 von SUCAM in Acre als Mittel der Wahl bei *Plasmodium falciparum*-Malaria verwendet wird, ist möglicherweise zum Teil auf eine Kreuzresistenz mit Chloroquin zurückzuführen.

Die krasse Unwirksamkeit der 4-Aminochinoline steht aber im Gegensatz zur guten Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gegen Chinin und Mefloquin in den vorliegend durchgeführten Tests. Alle 34 geprüften Isolate wurden bereits bei 1,6 µmol Mefloquin/l Blut vollständig inhibiert. Ebenfalls alle 34 Isolate wurden bei 51,2 µmol Chinin/l Blut komplett gehemmt. So kann Chinin, richtig angewendet (30 mg/kg/die sieben bis zehn Tage lang), weiterhin als höchstwirksames Therapeutikum bei der Malaria tropica im untersuchten Gebiet eingesetzt werden. Auch gegenüber Mefloquin konnte eine optimale Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gezeigt werden.

Zusammenfassung

Mit dem RIECKMANN-Mikro-Test wurde die Suszeptibilität von *Plasmodium falciparum* gegen vier Antimalariamittel bestimmt. Die Studie wurde in Acre, dem nordwestlichsten Staat Brasiliens, durchgeführt.

Die Tests wurden nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation durchgeführt und ausgewertet. Sensibilität gegen Mefloquin wurde in allen 34 getesteten *Plasmodium falciparum*-Isolaten festgestellt. Auch gegen Chinin waren alle 34 Isolate empfindlich. Hingegen zeigten 23 von 34 *Plasmodium falciparum*-Isolaten Resistenz gegen Amodiaquin und 28 von 33 Isolaten waren resistent gegen Chloroquin.

Schon die Zwischenergebnisse dieser Studie ließen deutlich eine hochgradige Unwirksamkeit der 4-Aminochinoline erkennen. Chloroquin und Amodiaquin können daher wenigstens in diesem Gebiet Amazoniens nicht mehr zur Therapie und Prophylaxe der Malaria tropica empfohlen werden.

Schlüsselwörter

Plasmodium falciparum, In vitro-Resistenz, Brasilien.

Summary

In Vitro Sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Acre, Brazil (A Preliminary Report).

In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to four antimalarial drugs was determined by the Rieckmann microtechnique. The study was performed in Acre, the most western state of Brazil.

According to World Health Organisation's established breakpoints, sensitivity to mefloquine was detected in all 34 *Plasmodium falciparum* isolates tested. All 34 isolates also were sensitive to quinine. But 23 of 34 *Plasmodium falciparum* isolates showed resistance to amodiaquine and 28 of 33 isolates were resistant to chloroquine.

Although these results are preliminary they still demonstrate the high degree of resistance of chloroquine and amodiaquine. Therefore, at least in the study area, the 4-aminoquinolines cannot be longer recommended for therapy and prophylaxis of *Plasmodium falciparum* infections.

Key words

Plasmodium falciparum, in vitro resistance, Brazil.

Danksagung

Diese Studie wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, Österreich (Projekt Nr. P 6233 M) finanziert und auf Einladung des Ministerio de Saude, Brasil, durchgeführt.

Literatur

1. COOSEMANS, M. M., HENDRIX, L., BARUTWANAYO, M., BUTAYI, G., ONORI, E. (1985): Pharmacoresistance de *Plasmodium falciparum* au Burundi. Bull. Org. mond. Santé 63, 331 - 338.
2. ESPINAL, C. A., CORTES, G. T., GUERRA, P., ARIAS, A. E. (1985): Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 675 - 680.

3. KREMSNER, P. G., ZOTTER, G. M., GRANINGER, W., FELDMEIER, H. (1987):
Amodiaquine Resistant Malaria in Brazil.
Lancet II, 684.
4. MOORE, D. V., LANIER, S. E (1961):
Observations on two *Plasmodium* infections with an abnormal response to chloroquine.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 10, 5 - 9.
5. REYES, S. (1981):
Infecções malaricas por *Plasmodium falciparum* resistente ao tratamento com cloroquina. Situação no Brasil (1960 - 1981).
Rev. bras. Malariol. D. trop. 33, 109 - 130.
6. RIECKMANN, K., SYX, L., CAMPBELL, G. H., MREMA, J. S. (1978):
Drug sensitivity to *Plasmodium falciparum*, an in vitro microtechnique.
Lancet 1, 22 - 23.
7. RODRIGUES, D. P. (1961):
Casos de malaria por *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento pelo cloroquina.
Arq. Hig. Saud. Pub. 26, 231 - 235.
8. VASCONCELOS, M. A, ROSARIO, V. E. (1983):
Testes de sensibilidade de amostras de *Plasmodium falciparum* da Baixa Amazonica (Brasil).
Rev. brasil. Malariol. D. trop. 35, 21 - 28.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. P. G. Kremsner
Landesinstitut für Tropenmedizin Berlin
Königin-Elisabeth-Straße 32
D-1000 Berlin 19
Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Kremsner Peter Gottfried, Zotter G. M., Feldmeier H., Graninger W., Kollaritsch Herwig, Stemberger Heinrich, Rocha Rosana M., Wemsdorfer W. H., Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [In vitro Resistenzbestimmung von Plasmodium falciparum in Acre/Brasilien \(Zwischenbericht\). 249-253](#)