

Longitudinale Beobachtungen über die Artemisininempfindlichkeit von Plasmodium falciparum in Thailand

Claudia Zatloukal¹, Birgit Woitsch¹, H. Noedl¹, S. Prajakwong²,
G. Wernsdorfer³, W. H. Wernsdorfer^{1,3}

Einleitung Die Heilkräfte von Qinghao, der später als *Artemisia annua* LINNÉ bekannt gewordenen Pflanze, wurden erstmals in einer chinesischen Handschrift aus dem 2. Jahrhundert v. Chr. erwähnt. Schon wenige Jahrhunderte später, etwa um das Jahr 341 wurde Qinghao von Ge Hong im „Handbuch der Rezepturen für die Notfallbehandlungen“ (Zhou Hou Bei Ji Fang) als Mittel zur Behandlung von Fieber und Malaria genannt. In Anbetracht der relativ geringen Artemisininmengen dürfte die Wirksamkeit der darin beschriebenen Rezepte jedoch eher den antipyretischen Eigenschaften des Pflanzenmaterials als einer spezifischen Wirkung auf Plasmodien zuzuschreiben sein (11).

Im Jahre 1972 wurde Artemisinin (Qinghaosu) in China erstmals als Reinsubstanz aus *Artemisia annua* gewonnen. Der Artemisiningehalt variiert zwischen 0,05 und 2%, abhängig von Standort der Pflanzen und Herkunft der Samen (4). Der Wirkstoff findet sich insbesondere in den Blättern und jungen Knospen von *Artemisia annua*.

Artemisinin (Abb. 1) ist ein Sesquiterpen-Lakton mit einer Peroxidbrücke, welche für die spezifische blutschizontozide Wirkung verantwortlich ist (8). Die aus Artemisinin gewonnenen halbsynthetischen Derivate Artemether und Na-Artesunat zeigen noch höhere Aktivität als Artemisinin. Diese ursprünglich für die parenterale Therapie entwickelten Derivate sind auch bei oraler Verabreichung hoch wirksam. Bei Na-Artesunat beruht dies auf einer nahezu vollständigen, schon vor der Absorption erfolgenden Hydrolyse unter Bildung von Dihydro-Artemisinin, dem bisher wirksamsten aller Artemisininabkömmlinge. Artemether wird unverändert absorbiert und erst dann metabolisch, unter Demethylierung, zu Dihydro-Artemisinin transformiert. Im Tierversuch und in klinischen Studien beim Menschen zeigten sich Artemisinin und seine Derivate sehr viel besser verträglich als die weithin als Malariamittel gebräuchlichen synthetischen und natürlichen Chinolinabkömmlinge (1, 4, 6).

Artemether und Na-Artesunat werden heute in Südostasien bereits zur Routinebehandlung von Infektionen mit multiresistentem *Plasmodium falciparum* eingesetzt, u. a. seit 1996 auch in gewissen Teilen Thailands. Es lag darum nahe, die Empfindlichkeit von *P. falciparum* gegenüber Artemisinin vor breiterem Einsatz dieser Medikamente zu prüfen und den Sensibilitätszustand weiter zu verfolgen.

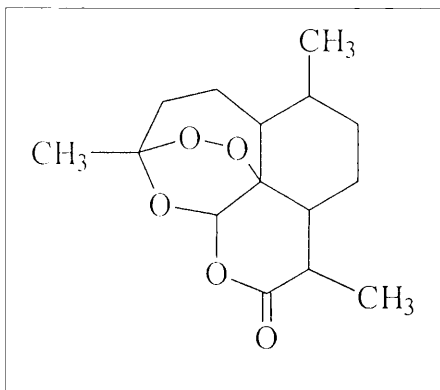


Abbildung 1:
Artemisinin

Material und Methoden

Die Studie wurde in der Provinz Mae Hong Son im Nordwesten Thailands auf Veranlassung und mit Unterstützung des Gesundheitsministeriums von Thailand durchgeführt. Das Studiengebiet liegt unweit der Grenze zu Myanmar (Burma). Die nachstehend beschriebenen Ergebnisse stammen aus den Jahren 1994 und 1997. Die Untersuchungen erfolgten jeweils zu Beginn der Regenzeit.

Für die Sensibilitätsprüfungen wurde Artemisinin als Repräsentant der gesamten Artemisiningruppe verwendet. Es ist wegen seiner relativ hohen Stabilität für diesen Zweck am besten geeignet. Zudem besteht eine sehr ausgeprägte Korrelation zwischen den Aktivitäten von Artemisinin, Artemether und Dihydro-Artemisinin.

Insgesamt wurden 109 frische Isolate von *P. falciparum* erfolgreich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Artemisinin getestet. Sie stammten von ambulanten Patienten der Malariaambulanz Sektor 8 oder des Provinzspitals von Mae Hong Son. Sämtliche Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie klinisch symptomatische Monoinfektion mit *P. falciparum* und eine Parasitendichte von 1000 - 80.000 asexuellen Formen pro μl Blut. Ausgeschlossen waren Patienten, welche innerhalb der vorangegangenen 9 Wochen Malariamittel eingenommen hatten.

Die Durchführung der Tests entsprach der WHO Standardmethodik für den Mikrotest Mark II (12). Bei diesem Verfahren wird die medikamentbedingte Hemmung der Schizontenreifung bestimmt. Jedem Patienten wurden mittels heparinisierten Mikropipetten 300 μl Blut aus der Fingerbeere entnommen. Dieses wurde in 2,7 ml RPMI 1640 LPLF Medium suspendiert. Ein gleichzeitig angefertigter dicker Tropfen diente zur exakten Bestimmung der Parasitendichte vor Inkubation.

Zum Ansetzen des Tests wurden jeweils 50 μl Blut-Medium-Mischung (BMM) in die Vertiefungen der Kulturplatten eingebracht. Die Platte wurde sodann mit einem locker aufsitzenden, sterilen Deckel abgedeckt, in einen Kerzentopf verbracht und bei 37,5°C für 25 Stunden bebrütet. Hierauf wurden aus dem Zellsediment der einzelnen Vertiefungen dicke Tropfen angefertigt und bei pH 6,95 nach Giemsa gefärbt. Zur mikroskopischen Auswertung wurde in jedem dicken Tropfen die Schizontenzahl pro 200 Parasiten ausgezählt. Die an medikamentfreien Kontrollen erhobenen Schizontenwerte dienten als Grundlage zur Berechnung der medikamentbedingten Reifungshemmung. Gemäß Konvention (12) galten Tests mit einer Schizontenreifung von mindestens 10% in der Kontrolle (entsprechend 20 Schizonten pro insgesamt 200 Parasiten) als erfolgreich.

Die Auswertung der Daten erfolgte auf mathematischem Wege (10) nach der von LITCHFIELD & WILCOXON (5) angegebenen klassischen Methode unter Probittransformation der Hemmwerte, logarithmischer Transformation der Arzneimittelkonzentrationen und linearer Regressionsanalyse.

Ergebnisse

Im Jahre 1994 wurden 51 Isolate von *P. falciparum* erfolgreich auf ihre Sensibilität gegenüber Artemisinin geprüft. Im Jahre 1997 waren es 58. Die mathematisch abgeleiteten Regressionsgeraden zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den beobachteten mittleren Hemmpunkten. Daher lagen die χ^2 -Werte für Heterogenität bei beiden Regressionen weit unterhalb der erlaubten Höchstgrenze.

Obgleich in beiden Jahren eine vollständige Hemmung der Schizontenreifung bei einzelnen Isolaten erst bei einer Artemisininkonzentration von 3000 nmol/l BMM erreicht wurde, lagen für die Gesamtheit der Isolate die Punkte vollständiger Hemmung im Jahre 1994 höher als im Jahre 1997. Dementsprechend ergibt sich für den Mittelwert der EC-50 zwischen 1994 und 1997 ein Abfall von 35,85 auf 12,14 nmol/l BMM und für die EC-90 eine Reduktion von 436,41 auf 52,72 nmol/l BMM. Die Regressionslinie für 1994 verläuft sehr viel flacher als jene für 1997. Dies kommt auch in den unterschiedlichen Werten für die Neigung der Regressionsgeraden zum Ausdruck (Slope S = 3,13 für 1997 gegenüber S = 6,95 für 1994).

Tabelle 1:

Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Nordwest-Thailand
Effektive Konzentrationen und Regressionsparameter 1994 und 1997.

Parameter	1994	1997
Anzahl der Isolate	51	58
EC-50 (nmol / l BMM)	35,85	12,14
95% Vertrauensbereich	23,22-55,35	9,05-16,27
EC-90 (nmol / l BMM)	436,41	52,77
95% Vertrauensbereich	218,33-872,34	36,71-75,87
Korrelationskoeffizient r	0,9709	0,9984
χ^2 für Heterogenität	3,3601	0,4384
Erlaubter Höchstwert für χ^2	11,1	11,1
Steigungsfunktion S	6,9540	3,1260
Steigungsfaktor f	1,5144	1,1790
Faktor der EC-50 f_{EC-50}	1,5439	1,3406

Tabelle 1 gibt über die effektiven Artemisininkonzentrationen und die Regressionsparameter Aufschluß. Die graphische Auswertung der Daten für 1997 ist in Abbildung 2 wiedergegeben, in Abbildung 3 sind die Regressionen von 1994 und 1997 verglichen.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Wirksamkeit von Artemisinin und dessen Derivaten gegen multiresistentes *P. falciparum* wurde in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien bestätigt (2, 6). Auch die im Rahmen dieser Untersuchungen erhobenen Daten belegen die *in vitro* Sensibilität gegenüber Artemisinin bei multiresistenten Parasitenisolaten.

Die in dieser Studie festgestellte Zunahme der Artemisininempfindlichkeit zwischen 1994 und 1997 ist zunächst überraschend. Da die für 1994 und 1997 erhobenen Regressionsgeraden nicht parallel sind ($f_{SR} < SR$ oder $1,5628 < 2,2246$) mußte statt direkten Aktivitätsvergleichs ein parametrischer Vergleich vorgenommen werden. Dieser ergab bei EC-50 und EC-90 einen hoch signifikanten Unterschied, welcher auch aus der Verschiedenheit der 95% Vertrauensbereiche ersichtlich ist (Tab. 1).

Da während des gesamten Beobachtungszeitraums von 1994 bis 1997 in der Provinz von Mae Hong Son Artemisinin oder seine Derivate weder im Gesundheitsdienst verwendet wurden noch in Apotheken oder anderen Verkaufsstellen erhältlich waren, drängt sich die Folgerung auf, daß die Sensibilitätsunterschiede auf die Herkunft der *P. falciparum* Infektionen zurückzuführen sind. Dies war in der Tat der Fall. Im Jahre 1994 war die Grenze zwischen Thailand und Myanmar offen. Ein großer Teil der in Mae Hong Son behandelten Patienten kam aus Myanmar oder hatte sich die Infektion dort zugezogen. Die Patienten bevorzugten die Behandlung in Thailand, da wirksame Medikamente (insbesondere Mefloquin) verfügbar waren und die Therapie kostenlos erfolgte. In Myanmar sind Artemisinin-derivate, insbesondere Artemether, seit Mitte der 1980er Jahre frei im Privatsektor zugänglich. Sie werden aus Kostengründen zwar vom staatlichen Gesundheitsdienst nicht verwendet, doch weichen die Patienten auf derartige Präparate aus, da die in den öffentlichen Einrichtungen verfügbaren Malariamittel, Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin, nicht ausreichend wirksam sind. Artemisininpräparate werden in Myanmar vorwiegend zur Selbstbehandlung verwendet. Hierbei kommt es, ebenfalls aus Kostengründen, meist zu Unterdosierung. Da diese Therapie zwar die Symptome rasch beseitigt, aber selten zur Elimination der Infektion führt, ist in Myanmar ein hoher Selektionsdruck entstanden. Anfang 1995 wurde die Grenze zwischen Thailand und Myanmar zunächst ganz geschlossen, im Jahre 1997 erfolgte eine geringfügige Lockerung der Einreisebestimmungen, die große Mehrzahl der Patienten stammte jedoch aus Thailand und hatte sich die Infektion in Thailand zugezogen. Diese Patienten sprachen in der Regel gut und mit vollständiger Ausheilung auf Mefloquin an, so daß hier auch für 1998 noch keine Indikation für den routinemäßigen Einsatz von Artemisinin-derivaten vorliegt.

Im Vergleich zu 1993 in Tanzania erhobenen Ergebnissen mit einer EC-50 von 21 nmol/l BMM und einer EC-95 von 313 nmol/l BMM erwies sich die im Jahre 1997 in Mae Hong Son beobachtete Artemisinin-sensibilität als deutlich höher, die im Jahre 1994 festgestellte jedoch als geringer.

Die Untersuchungsergebnisse unterstreichen die Rolle des Selektionsdrucks in der Abnahme der Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum*. Nach der in den nächsten Jahren in Mae Hong Son zu erwartenden Einführung von Artemisinin-derivaten in die Routinebehandlung von *P. falciparum* Infektionen ist mit einer raschen und beträchtlichen Abnahme der Sensibilität gegenüber Artemisinin zu rechnen, soweit es nicht gelingt, diese Entwicklung durch die gleichzeitige Therapie mit

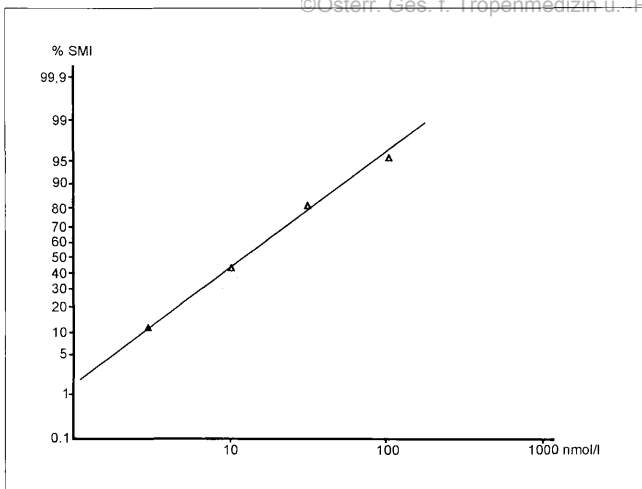


Abbildung 2:

Sensibilität von *Plasmodium falciparum* zu Artemisinin in Nordwest-Thailand, 1997.

Logprobit Regression mit 95 % Vertrauensgrenzen. SMI = Hemmung der Schizontenreifung.

1994. Die erhebliche Verbesserung der Sensibilitätslage innerhalb dieses Zeitraums spiegelt offensichtlich die 1995 erfolgte Schließung der nahegelegenen Grenze zu Myanmar und die daraus resultierende Verschiebung in der Herkunft des Krankenguts wieder. Die Ergebnisse bestätigen die ausgeprägte Wirkung von Artemisinin auch gegenüber multiresistentem *P. falciparum* in Thailand.

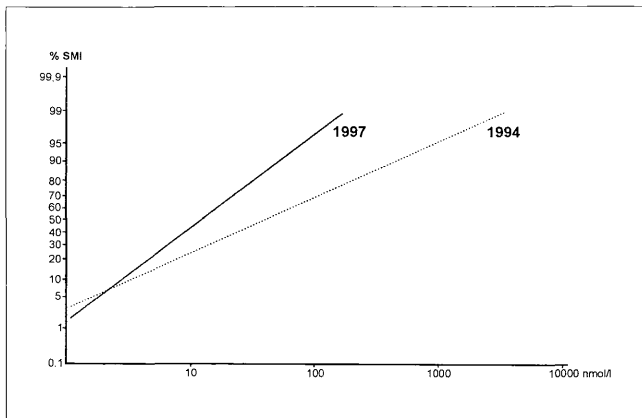


Abbildung 3:

Sensibilität von *Plasmodium falciparum* zu Artemisinin in Nordwest-Thailand.

Vergleich der Logprobit Regressionen von 1994 und 1997. SMI = Hemmung der Schizontenreifung.

BMM; EC-90 = 52.77 nmol/l BMM). The regression line of 1997 was steeper than that of 1994. The considerable improvement of the sensitivity to artemisinin between 1994 and 1997 obviously reflects the closure of the near border to Myanmar and the resulting changes in the origin of the patients. The results confirm the consistent activity of artemisinin against multiresistant *P. falciparum* in Thailand.

einem geeigneten Partnermedikament zu verhindern. Hierzu eignet sich derzeit noch Mefloquin. Zunehmender Wirkungsverlust von Mefloquin (7, 9) dürfte in Zukunft auch die Heilungsraten der Kombinationstherapie mit Artemisininderivaten beeinträchtigen. Es ist deshalb erforderlich, alternative Kombinationspartner für die Artemisininderivate zu identifizieren und zu erproben, z. B. Benflumetol.

Zusammenfassung

In den Jahren 1994 und 1997 wurden in der Provinz Mae Hong Son, Nordwest-Thailand, 51 bzw. 58 frische Isolate von *Plasmodium falciparum* erfolgreich auf ihre in vitro Sensibilität gegenüber Artemisinin untersucht. Hierzu diente der WHO Standard Mikrottest (Mark II). Die mittleren EC-50 und EC-90 Werte lagen im Jahr 1994 bei 35,85 und 436,41 nmol/l Blut-Medium-Mischung (BMM). Mit 12,14 und 52,77 nmol/l BMM waren die entsprechenden Werte für 1997 deutlich geringer. Die Regressionsgerade für 1997 war wesentlich steiler als jene für

Schlüsselwörter

Malaria, *Plasmodium falciparum*, Artemisinin, Arzneimittelempfindlichkeit, Resistenz.

Summary

Longitudinal investigation of the sensitivity to artemisinin of Plasmodium falciparum in Thailand.

Using the WHO Standard Microtest (Mark II) the sensitivity of fresh isolates of *Plasmodium falciparum* to artemisinin was investigated in the Province of Mae Hong Son, northwestern Thailand, with 51 successful tests in 1994 and 58 in 1997. In 1994 the mean EC-50 and EC-90 were 35.85 and 436.41 nmol/l blood-medium-mixture (BMM), respectively. The corresponding values for 1997 were lower (EC-50 = 12.14 nmol/l

Key words

Malaria, *Plasmodium falciparum*, artemisinin, drug sensitivity, resistance.

Danksagung Dem Personal des Office for Vector-Borne Disease Control, Chiang Mai, der Unit-8 Malariaklinik und der Poliklinik des Provinzkrankenhauses in Mae Hong Son gebührt besonderer Dank für harmonische und effiziente Zusammenarbeit.

Dem Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr sei für die Mittel gedankt, welche C. Z., B. W. und H. N. die Teilnahme an dieser Studie ermöglichen.

Literatur

1. GRAZ, A., PETO, L., PETO, T. E. A. (1993):
Adverse effects of antimalarials
Drug Safety 8, 295-311.
2. GUA-QIAO LI, XING-BO GUO, LIN-CHUN FU, HUA-XIANG JIAN, XIAN-HUA WANG (1994):
Clinical trials of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria in China.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, Suppl., 5-6.
3. HASSAN ALIN, M. (1995):
Efficacy of oral and intravenous artesunate in male Tanzanian adults with *Plasmodium falciparum* malaria and in vitro susceptibility to artemisinin, chloroquine and mefloquine.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 53, 639-
4. HIEN, T. T., WHITE, N. J. (1993):
Qinghaosu.
Lancet 341, 603-608.
5. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
6. LOOAREESUWAN; S. (1994):
Overview of clinical studies on artemisinin derivatives in Thailand.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, Suppl., 9-11.
7. NOSTEN, F. et al. (1991):
Mefloquine resistant *falciparum* malaria on the Thai-Burmese border.
Lancet 337, 1140-1143.
8. WEBSTER, H. K., LEHNERT, E. K. (1994):
Chemistry of artemisinin: an overview.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, Suppl., 27-29.
9. WERNSDORFER, W. H. (1991):
The development and spread of drug resistant malaria.
Parasitology Today 7, 297-303.
10. WERNSDORFER, W. H., WERNSDORFER, M. G. (1995):
The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in *Plasmodium falciparum*.
Mitt. Österr. Ges. Tropmed. Parasitol. 17, 221-228.
11. WERNSDORFER, W. H. (1997):
Antimalarial drugs.
Health Co-operation Papers 15, 151-198.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):
In vitro micro-test (Mark II) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine / pyrimethamine and amodiaquine.
WHO Document MAP/87.2, Rev. 1.

Abkürzungen

- EC-50 „Effective Concentration 50“
d. h. Medikamentkonzentration, welche eine 50%ige Hemmung der Schizontenreifung bewirkt.
- EC-90 „Effective Concentration 90“
d. h. Medikamentkonzentration, welche eine 90%ige Hemmung der Schizontenreifung bewirkt.
- f_s „Slope factor“
d. h. 95%ige Vertrauensgrenze für die Steigerung der Regression (siehe unten).
- f_{SR} „Slope function ratio“
d. h. der gemeinsame „Slope factor“ für zwei zu vergleichende Regressionen.
- f_{EC-50} Faktor für die 95%ige vertrauensgrenze der EC-50.
- f „Factor of the power ratio“
d. h. der gemeinsame Aktivitätsfaktor für zwei zu vergleichende Regressionen.
- MIC „Minimum Inhibitory Concentration“
d. h. die Mindestkonzentration, welche volle Hemmung der Schizontenreifung bewirkt;
meist der EC-99 gleichgestellt.
- PR „Power Ratio“
oder $EC-50_1 / EC-50_2$ zweier Regressionen, wobei $EC-50_1$ der größere Wert.
- r Regressionskoeffizient (Pearson).
- S „Slope“
oder Steigerung ($([EC-84/EC-50 + EC-50/EC-16] / 2)$).
- SR „Slope Ratio“
 S_1 / S_2 oder Steigungsverhältnis beider Regressionen, wobei $S_1 > S_2$.
- S_E Standardfehler.

Korrespondenzadresse Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

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: 1998

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Zatloukal Zatloukal Claudia, Woitsch Birgit, Noedl Harald, Prajakwong Somsak, Wernsdorfer Gunther, Wernsdorfer Walther H.

Artikel/Article: [Longitudinale Beobachtungen über die Artemisininempfindlichkeit von Plasmodiumfalciparum in Thailand. 165-170](#)