

Chloroquin- und Mefloquinempfindlichkeit von Plasmodium falciparum im Nordwesten Thailands

Ulrike Sponer¹, S. Prajakwong², Y.-M. Tiedt¹, G. Wiedermann¹,
W. H. Wernsdorfer^{1,3}, G. Wernsdorfer³

Einleitung

Als Chloroquin (Abb. 1) kurz nach dem 2. Weltkrieg zum Mittel der Wahl für die orale Behandlung aller Formen unkomplizierter Malaria wurde, erwartete man von diesem Medikament, analog zu Chinin, eine lange Brauchbarkeitsdauer. Der erste Bericht über das Auftreten chloroquinresistenter Falciparum-Malaria in der Alten Welt stammt aus Thailand (1). Im Jahre 1959, also etwa ein Jahrzehnt nach der Einführung des Mittels, waren in der an der Grenze zu Kambodscha gelegenen Provinz Trat Malariafälle beobachtet worden, bei welchen die übliche Behandlung mit Chloroquin nicht mehr zur Ausheilung führte. Es handelte sich ausnahmslos um Infektionen mit *Plasmodium falciparum*. Die Patienten hatten sich die Malaria zumeist im grenznahen Kambodscha gelegenen Distrikt von Pailin zugezogen. Als Grund für das Auftreten des Herdes wird massiver Arzneimittel- druck infolge der Anwendung von chloroquinierterm Kochsalz im Distrikt von Pailin angenommen (4). In der Folge breitete sich die Chloroquinresistenz rasch innerhalb von Thailand und Kambodscha aus. Schließlich griff sie auf den gesamten hinterindischen Raum über (3). In Thailand hatte Chloroquin Mitte der 70er Jahre seine Wirksamkeit bei Falciparum-Malaria so weit verloren, daß es in der Routinebehandlung dieser Malariaformen durch Sulfonamid/Pyrimethamin-Kombinationen ersetzt werden mußte. Bald kam es auch zur Resistenz gegen diese Medikamente, welche 1982 durch Chinin und Tetrazyklin abgelöst wurden. Während bis dahin die Therapie auf Verdacht von Falciparum-Malaria gegeben wurde, erfolgte die Behandlung mit Chinin und Tetrazyklin aus Kostengründen nur bei mikroskopisch gesicherter Infektion mit *Plasmodium falciparum*. Zu diesem Zweck wurde das Behandlungssystem im ganzen Land auf Sofortdiagnose im Rahmen der Malariakliniken umgestellt. Bei der ambulanten Therapie mit Chinin und Tetrazyklin war die Compliance mit der erforderlichen 7tägigen Medikation wegen der mit Chinin verbundenen Nebenwirkungen mangelhaft. So war es nicht verwunderlich, daß die Heilungsrate im ambulanten Bereich im Durchschnitt nur 68% erreichte, während sie bei klinisch-stationärer Therapie bei nahezu 100% lag (5). Infolge der hohen Rekrudenzrate kam es zwischen 1982 und 1984 zu einem merklichen Rückgang der Chininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* (5). Seit Anfang 1985 wird Mefloquin (Abb. 2) zur Routinebehandlung mikroskopisch gesicherter Infektionen mit *P. falciparum* gegeben. Allerdings wurde im Grenzgebiet von Thailand und Kambodscha schon 1992 eine erhebliche Wirkungseinbuße von Mefloquin festgestellt, welche schließlich auch einen Teil des Grenzgebiets von Thailand und Myanmar (Burma) erfaßte (8). In diesen Gebieten war die Heilungsrate mit Mefloquin allein bis 1995 unter 50% gesunken. Hier wird seit 1995 eine kombinierte Therapie mit Artesunat und Mefloquin angewendet, welche bisher noch eine Heilungsrate von nahezu 100% erreichen läßt.

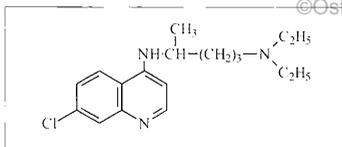


Abbildung 1:
Chloroquin.

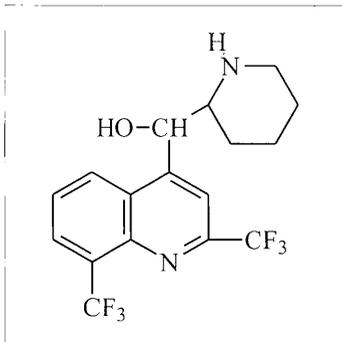


Abbildung 2:
Mefloquin.

Die Mefloquinempfindlichkeit von *P. falciparum* in Thailand ist derzeit heterogen. Der Schwerpunkt der Resistenz liegt offenbar im Mittelabschnitt der Grenze zu Myanmar, im Distrikt von Mae Sot. Alle anderen Abschnitte der Grenze zu Myanmar gelten als resistenzgefährdet und erfordern eine regelmäßige Überwachung des Sensibilitätsstatus.

Material und Methoden

Die hier beschriebenen longitudinalen Studien wurden zwischen 1994 und 1997 in der Provinz von Mae Hong Son im Nordwesten Thailands im Rahmen der Kooperation zwischen dem Ministerium für Öffentliche Gesundheit von Thailand und dem Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien durchgeführt. Sie waren Teil des thailändischen Programms für die Überwachung der Arzneimittelempfindlichkeit von *P. falciparum*. Das im Nordabschnitt der Grenze zu Myanmar gelegene Studiengebiet ist durch Mefloquinresistenz gefährdet. Es liegt nur etwa 300 km nördlich vom vorher erwähnten Zentrum der Mefloquinresistenz. Auf der thailändischen Seite der Grenze ist die Malariaübertragung relativ gering, im gegenüber liegenden Teil Myanmars ist sie intensiv.

Die Chloroquin- und Mefloquinempfindlichkeit von *P. falciparum* wurde in vitro mittels WHO Standardtest für die Messung der Schizontenreifungshemmung bestimmt (9). Die hierfür verwendeten Materialien, einschließlich RPMI-1640 LPLF Medium stammten aus WHO Standardtestsätzen. Die *P. falciparum*-Isolate mußten die Kriterien von Monoinfektion mit dieser Spezies und asexueller Parasitendichte zwischen 1000 und 80000 pro μ l Blut erfüllen. Einschlägige Vorbehandlung des Patienten während der vorangegangenen 9 Wochen war ein Ausschlusskriterium.

Die vordosierten Testplatten (FALCON 3070) enthielten aufsteigende Konzentrationen der Medikamente in den Vertiefungen B - H. Vertiefung A diente als medikamentfreie Kontrolle. Die Chloroquinplatten waren in den Vertiefungen B - H mit 1 - 64 pmol Chloroquindiphosphat (entsprechend 200 - 12.800 nmol/l Blut) vordosiert, die Mefloquinplatten mit 2 - 128 pmol Mefloquinhydrochlorid (entsprechend 400 - 25.600 nmol/l Blut).

Zur Durchführung des Tests wurde dem Patienten mittels steriler heparinisierter Mikropipette Blut aus der Fingerbeere entnommen, welches sogleich in 9 Teilen RPMI 1640 LPLF Medium suspendiert wurde. Sodann wurde ein dicker Tropfen zur Bestimmung der aktuellen Parasitendichte angefertigt. Anschließend wurden jeweils 50 μ l der Blut-Medium-Mischung (BMM) in die Vertiefungen der Testplatten gegeben. Die Platten wurden nach dem Schließen (Sterildeckel FALCON 3071) in einen vorgewärmten Kerzentopf verbracht und für 24 - 26 Stunden bei 37,5°C bebrütet. Hierauf wurden, nach Entfernung der überstehenden Medium-Plasma-Mischung, dicke Tropfen aus dem Zellsediment der Plattenvertiefungen angefertigt. Diese wurden am darauffolgenden Tag bei pH 6,9 nach GIEMSA gefärbt.

Die Bestimmung der aktuellen Parasitendichte bei Testbeginn erfolgte nach der WHO-Standardmethode durch Parallelzählung von asexuellen Parasiten und Leukozyten (10). Zur Bestimmung der Schizontenreifung wurde die Anzahl von Schizonten in einer Gesamtzahl von 200 asexuellen Parasiten ermittelt. Als Schizonten gelten sämtliche asexuellen Parasiten mit 3 oder mehr Chromatinkörpern (9). Tests mit einer Schizontenreifung von mindestens 10% in der Kontrolle gelten als erfolgreich. Die medikamentbedingte relative Hemmung der Schizontenreifung wird auf der Basis des Kontrollwachstums errechnet.

Die Auswertung der Sensibilitätsprüfungen erfolgte nach dem Verfahren von LITCHFIELD & WILCOXON (2) durch lineare Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Quadrate) nach logarithmischer Transformation der Arzneimittelkonzentrationen und Probittransformation der Hemmwerte. Hierzu wurde eine EDV-Adaptation dieses Verfahrens benutzt (6).

Tabelle 1:

Wirkungsparameter von Chloroquin und Mefloquin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, 1994 und 1997.

Parameter	Chloroquin		Mefloquin	
	1994	1997	1994	1997
Anzahl der Isolate	19	20	43	42
Mittlere Schizontenreifung (in % der Kontrollen)	45,5	52,4	33,7	53,7
Mittlere EC-50*	1335	701	782	477
Mittlere EC-90*	6667	1700	2099	1448
Mittlerer Endpunkt d. Schizontenreifung*	9437	2691	4209	2417
Steigung $[(EC-84/EC-50 + EC-50/EC-16) / 2]$	3,48	1,99	2,15	2,37
Steigungsfaktor fs	1,50	1,22	1,12	1,24
Faktor der EC-50 (f_{EC-50})	1,49	1,35	1,21	1,30
χ^2 für Heterogenität	0,8501	0,6015	0,4033	1,3274

*) Angaben in nmol/l Blut

Ergebnisse

Zwischen 1994 und 1997 wurden insgesamt 76 *P. falciparum* Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Chloroquin und 126 Isolate auf ihre Sensibilität gegenüber Mefloquin geprüft. Die wichtigsten Wirkungsparameter der Jahre 1994 und 1997 sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Regressionslinien für Chloroquin und Mefloquin aus dem Jahre 1997 sind in Abbildung 3 und Abbildung 4 wieder gegeben.

Die EC-50 für Chloroquin ging zwischen 1994 und 1997 von 1335 auf 701 nmol/l Blut zurück, die EC-90 von 6667 auf 1700 nmol/l Blut. Während des gleichen Zeitraums fiel die mittlere, zur völligen Hemmung der Schizontenreifung erforderliche Chloroquinkonzentration von 9437 auf 2691 nmol/l Blut. Im Jahre 1994 zeigte ein einziges Isolat grenzwertige Sensibilität, die anderen 18 waren deutlich resistent. Im Jahre 1997 erwies sich ein Isolat als sensibel, 8 weitere zeigten sich grenzwertig empfindlich, die anderen 11 waren deutlich resistent. Ein Vergleich der Regressionsgeraden (Abb. 5) zeigt ein deutlich steileres Verhalten in 1997. Dies wird durch den signifikanten Unterschied zwischen den Steigungswerten (S) für 1994 und 1997 bestätigt. Daher sind die

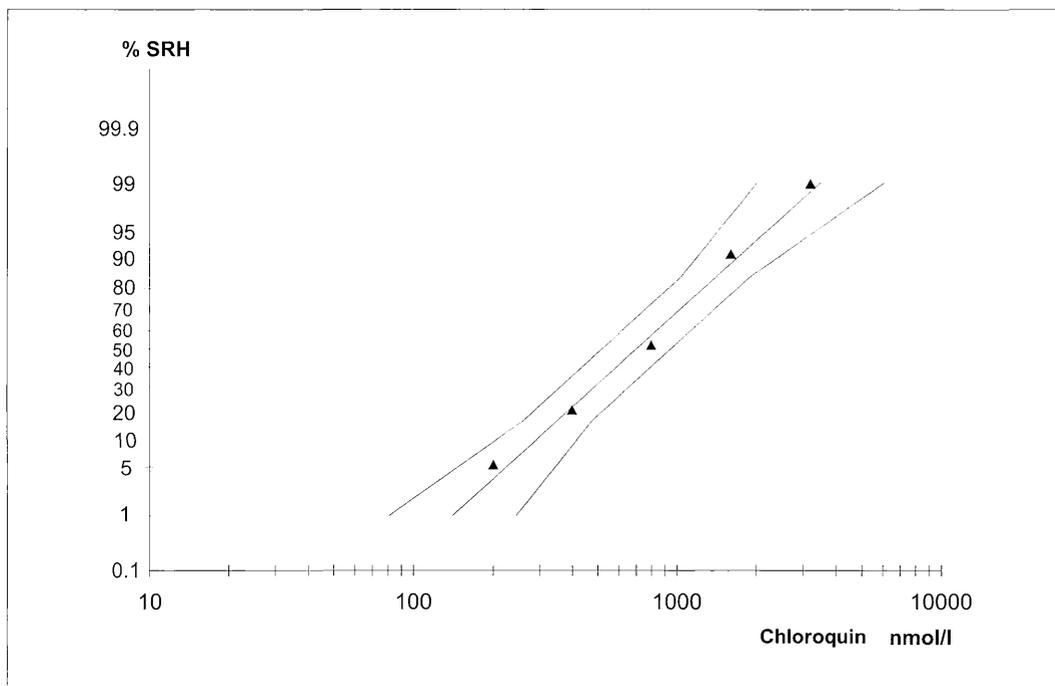


Abbildung 3:

Sensibilität von *Plasmodium falciparum* gegenüber Chloroquin. Mae Hong Son, 1997. Logprobit Regression mit 95% Vertrauensgrenzen. SRH = Hemmung der Schizontenreifung.

beiden Regressionslinien nicht parallel und das übliche Verfahren des Wirkungsvergleichs (2) ist nicht durchführbar. Der parametrische Vergleich der Mittelwerte ergab $t = 2,6057$ ($p < 0,02$) für die EC-50 und $t = 3,5955$ ($p < 0,001$) für die EC-90.

Bei Mefloquin war zwischen 1994 und 1997 ein Rückgang der mittleren EC-50 von 782 auf 477 nmol/l Blut zu verzeichnen, die mittlere EC-90 fiel von 2099 auf 1448 nmol/l Blut. Der Mittelwert der vollen Hemmkonzentration reduzierte sich von 4209 auf 2417 nmol/l Blut. 1994 waren 20 der 43 Isolate voll sensibel, weitere 20 waren grenzwertig sensibel und die restlichen drei voll resistent. Im Jahre 1997 überwogen die voll sensiblen Isolate mit 26 von 42, und nur ein Isolat zeigte ausgeprägte Resistenz. Die Regressionsgeraden von 1994 und 1997 zeigen paralleles Verhalten (Abb. 6). Dies geht auch aus dem Vergleich von Steigungsverhältnis (SR) und Faktor des Steigungsver-

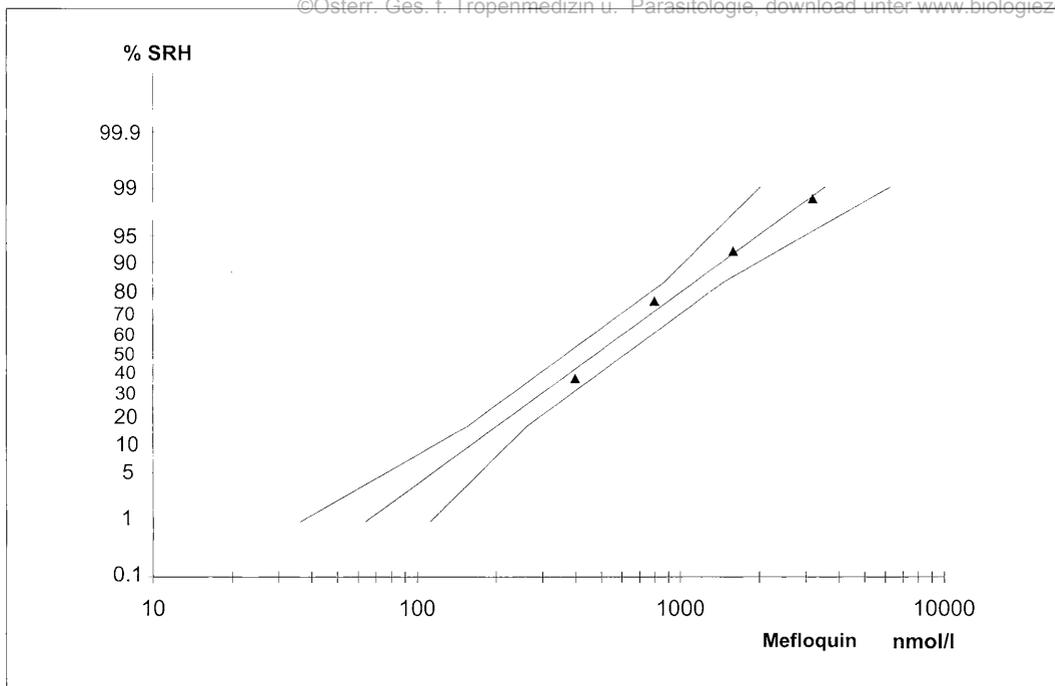


Abbildung 4:
Sensibilität von *Plasmodium falciparum* gegenüber Mefloquin. Mae Hong Son, 1997. Logprobit Regression mit 95% Vertrauensgrenzen. SRH = Hemmung der Schizontenreifung.

idealen Verhältnis der Prüfpunkte zu den Regressionslinien hervor (Abb. 3 und 4). Auch die 95% Vertrauensbereiche der einzelnen Wirkungsparameter (z. B. EC-50 und EC-90) sind relativ eng. Die zwischen 1994 und 1997 in Mae Hong Son beobachtete Besserung der Mefloquinsensibilität von *P. falciparum* muß daher als gesichert gelten. Dies gilt in noch höherem Maß für Chloroquin. Während man aufgrund früherer Studien einen Anstieg der Chloroquinempfindlichkeit bei gleichzeitigem Abfall der Mefloquinsensibilität hätte erwarten können (7), ist das hier beobachtete Phänomen zunächst unverständlich. Seine Klärung ist in den epidemiologischen Gegebenheiten zu suchen.

Die Provinz Mae Hong Son grenzt westlich in voller Länge an Myanmar. Zunächst war diese Grenze für Staatsangehörige von Thailand und Myanmar geöffnet. Dies änderte sich Anfang 1995 als Folge bewaffneter Auseinandersetzungen. Während bis dahin die Mehrzahl der in Mae Hong Son behandelten Malariapatienten aus Myanmar stammte oder sich die Infektion dort zugezogen hatte, waren die nach Grenzschießung behandelten Patienten und deren Infektionen mehrheitlich thailändischer Herkunft. Für die Patienten aus Myanmar war die Behandlung in thailändischen Malariakliniken attraktiv, da sie unentgeltlich und mit wirksamen Mitteln (Mefloquin) erfolgt, welche dem Gesundheitsdienst in Myanmar nicht zur Verfügung stehen. Wegen der strukturellen Mängel des Gesundheitsdienstes in Myanmar wird dort auch sehr viel häufiger auf Selbstbehandlung zurückgegriffen, wobei Chloroquin und Artemisinin-derivate eine führende Rolle spielen. In Thailand hingegen sind sämtliche Malariagebiete mit einem dichten Netz von Malariakliniken versorgt, welches sofortige mikroskopische Blutuntersuchung und einschlägige Behandlung durchführt. Selbstbehandlung hat in Thailand derzeit einen geringen Stellenwert, da es einfacher und billiger ist, eine Malariaklinik aufzusuchen. Zudem sind die bei *Falciparum*-Malaria wirksamen Mittel nur in Malariakliniken und, für stationäre Patienten, in größeren Krankenhäusern erhältlich. Ein weiterer Unterschied betrifft die Intensität der Malariaübertragung in den Herkunftsgebieten der Patienten. Die Patienten aus Myanmar kamen vorwiegend aus Gegenden mit intensiver Malariaübertragung und ohne Vektorbekämpfung, während die Malaria in der Provinz Mae Hong Son nur hypo-endemisch und ihre Übertragung durch fokale Vektorbekämpfung wirksam eingeschränkt ist.

hänntnisses (f_{SR}) hervor, da $SR < f_{SR}$ (oder $1,1005 < 1,2765$). Der Wirkungsamkeitsvergleich kann daher nach der klassischen Methode erfolgen (2). Das Wirkungsverhältnis (PR) ist höher als der gemeinsame Faktor der EC-50 Werte ($PR > f_{EC-50}$ oder $1,6406 > 1,3777$). Daher ist der zwischen 1994 und 1997 beobachtete Sensibilitätsunterschied als signifikant anzusehen.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Regressionsparameter für Chloroquin und Mefloquin weisen in den Jahren 1994 und 1997 sehr geringe und weit unterhalb der kritischen Grenze für Heterogenität liegende χ^2 Werte auf. Dies geht auch aus dem nahezu

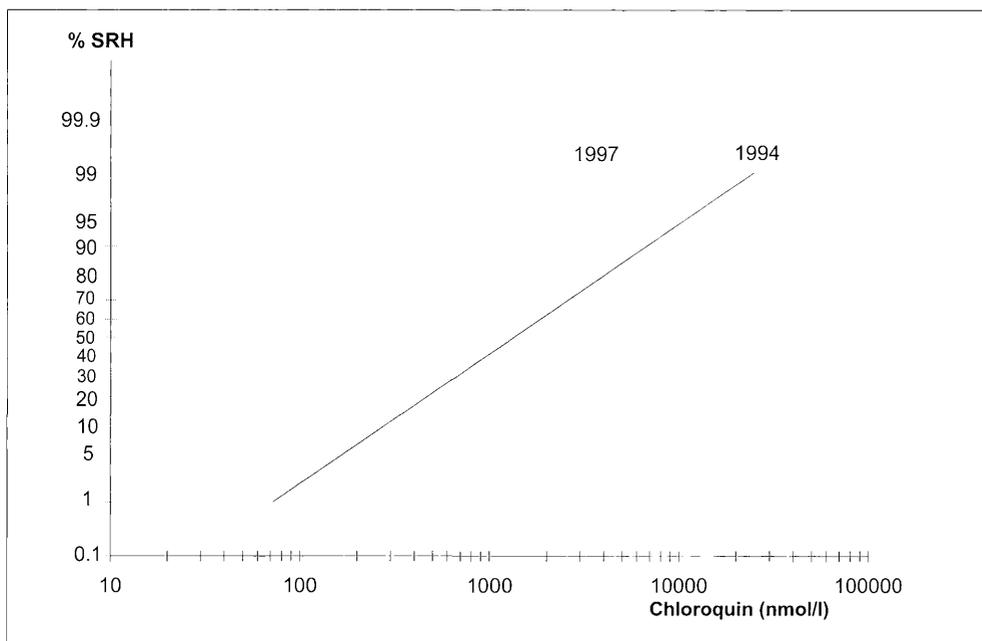


Abbildung 5:

Vergleich der Chloroquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum*, 1994 und 1997, in Mae Hong Son.

Logprobit Regressionen.

SRH = Hemmung der Schizontenreifung.

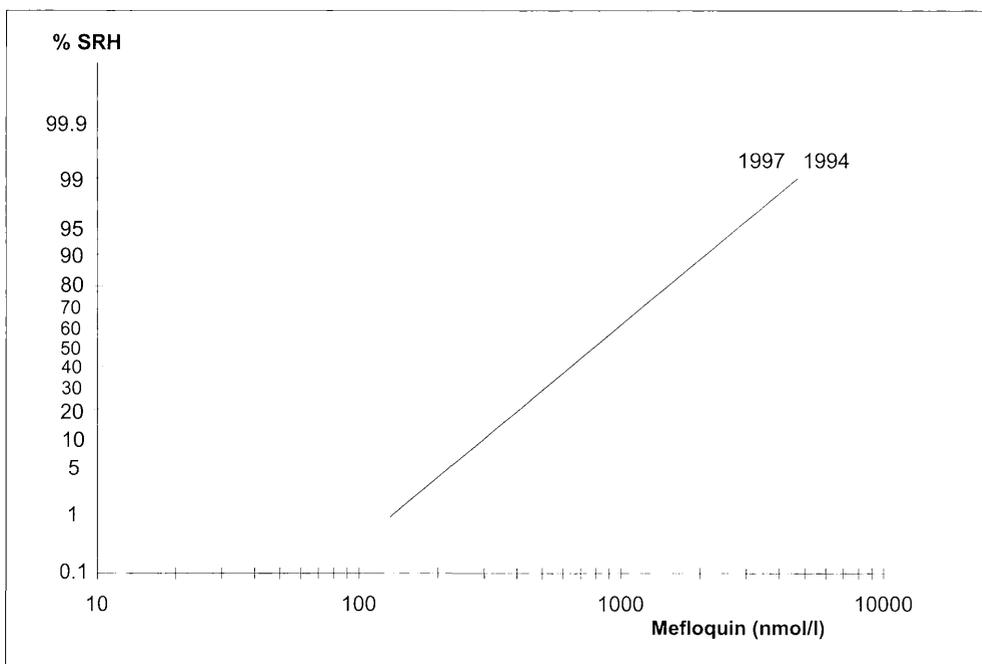


Abbildung 6:

Vergleich der Mefloquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum*, 1994 und 1997, in Mae Hong Son.

Logprobit Regressionen.

SRH = Hemmung der Schizontenreifung.

Die Ergebnisse aus dem Jahr 1994 zeigen die Malaria-situation in den Herkunftsgegenden der Patienten:

Hohe Chloroquinresistenz von *Plasmodium falciparum* als Folge intensiven Arzneimitteldrucks, und beginnende Mefloquinresistenz infolge residueller Mefloquinpiegel nach Therapie in Thailand. Diese Situation ähnelt jener, welche einige Jahre vorher zum Auftreten von Mefloquinresistenz an der Grenze von Thailand und Kambodscha geführt hatte (8). Im Jahre 1997 beschränkte sich das Krankengut weitgehend auf Patienten thailändischer Herkunft.

Die 1997 beobachtete Sensibilitätslage sollte nicht unbedingt im Sinne einer Rückkehr der Chloroquinsensibilität gedeutet werden, denn die geschätzte Heilungsrate erreicht nicht einmal 30% und dürfte dem früheren, bei Umstellung auf Alternativmedikation bestehenden Wirkungsgrad entsprechen. Die höhere Mefloquinsensibilität hat sich auch in einer Besserung der klinisch-parasitologischen Behandlungsergebnisse ausgedrückt. Infolgedessen bleibt Monotherapie mit Mefloquin im Nordwesten Thailands weiterhin die Therapie der Wahl für unkomplizierte Falciparum-Malaria. Allerdings könnte sich die Lage nach erneuter Öffnung der Grenze zu Myanmar rasch ändern, sobald der Selektionsprozeß jenseits der Grenze neue Impulse bekommt und die Einschleppung resistenter Parasitenpopulationen deren autochthone Übertragung in Thailand ermöglicht.

Zusammenfassung Zwischen 1994 und 1997 wurden in der Provinz Mae Hong Son, im Nordwesten Thailands, longitudinale in vitro Studien über die Chloroquin- und Mefloquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* durchgeführt. Insgesamt 76 *P. falciparum* Isolate wurden erfolgreich mit Chloroquin geprüft und 126 Isolate mit Mefloquin. Die mittlere EC-50 für Chloroquin ging zwischen 1994 und 1997 von 1335 auf 701 nmol/l Blut zurück, die EC-90 von 6667 auf 1700 nmol/l Blut. Die mittlere EC-50 für Mefloquin sank zwischen 1994 und 1997 von 782 auf 477 nmol / l Blut, die EC-90 von 2099 auf 1448 nmol/l Blut. Auch die mittleren Endkonzentrationen für Schizontenreifung zeigten eine signifikante Abnahme. Durch die Anfang 1995 erfolgte Sperrung der Grenze zwischen Thailand und Myanmar reduzierte sich der Anteil von Infektionen aus Myanmar. Durch die Grenzschießung dürfte auch der durch posttherapeutische, residuelle Mefloquinspiegel bedingte Selektionsdruck im benachbarten Gebiet Myanmars zurückgegangen sein.

Schlüsselwörter Malaria, *Plasmodium falciparum*, Chloroquin, Mefloquin, Resistenz, Thailand.

Summary *Sensitivity to chloroquine and mefloquine of Plasmodium falciparum in northwestern Thailand*

Longitudinal in vitro studies on the sensitivity of *P. falciparum* to chloroquine and mefloquine were carried out between 1994 and 1997 in the Province of Mae Hong Son, northwestern Thailand. In total 76 *P. falciparum* isolates were successfully tested with chloroquine, and 128 with mefloquine. Between 1994 and 1997 the mean EC-50 for chloroquine dropped from 1335 to 701 nmol/l blood, and the mean EC-90 from 6667 to 1700 nmol/l blood. During the same period the mean EC-50 for mefloquine decreased from 782 to 477 nmol/l blood, and the EC-90 from 2099 to 1448 nmol/l blood. Also the mean cut-off points of schizont maturation showed a significant reduction. The closing of the border between Thailand and Myanmar in early 1995 resulted in a decrease of infections which were acquired in Myanmar. The closure of the border is likely to have reduced, in neighbouring Myanmar, the selection pressure exerted by post-therapeutic, residual concentrations of mefloquine.

Key words Malaria, *Plasmodium falciparum*, chloroquine, mefloquine, resistance, Thailand.

Danksagung Der besondere Dank der Autoren gilt dem Personal des Office for Vector-Borne Disease Control, Chiang Mai, der Malariaklinik des Sektors 8 und der Poliklinik des Provinzkrankenhauses Mae Hong Son für die effiziente und stets harmonische Zusammenarbeit.

Dem Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr sei für die Mittel gedankt, welche U. S. und Y.-M. T. die Teilnahme an dieser Studie ermöglichten.

Hinweis Liste der verwendeten Abkürzungen siehe Arbeit ZATLOUKAL et al. (Seite 170).

Literatur

1. HARINASUTA, T., MIGASEN, S., BOONAG, D. (1962):
Chloroquine resistance in Thailand.
Verhandlungsbericht d. UNESCO 1st Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites. University of Singapore, pp. 143-153.
2. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
3. PAYNE, D. (1987):
The history and development of the WHO standard in vivo and in vitro test systems for the sensitivity of Plasmodium falciparum and other human plasmodia to antimalarial drugs.
Ph. D. Dissertation, London School of Hygiene and Tropical Medicine.
4. PAYNE, D. (1988):
Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum ?
Parasitology Today 4, 112-115.
5. SUEBSAENG, L., WERNSDORFER, W. H., ROONEY, W. (1986):
Sensitivity to quinine and mefloquine of Plasmodium falciparum in Thailand.
Bull. WHO 64, 759-765.
6. 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.
7. WERNSDORFER, W. H., LANDGRAF, B., WIEDERMANN, G., KOLLARITSCH, H. (1994):
Inverse correlation of sensitivity in vitro of Plasmodium falciparum to chloroquine and mefloquine in Ghana.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 443-444.
8. WERNSDORFER, W. H., CHONGSUPHAJASIDDHI, T., SALAZAR, N. P. (1994):
A symposium on containment of mefloquine-resistant falciparum malaria in Southeast Asia with special reference to border malaria.
Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth 25, 11-18.
9. 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.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1991):
Basic malaria microscopy. Part I.
WHO, Genf.

Korrespondenzadresse Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der 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): Sponer Ulrike Ulrike, Prajakwong Somsak, Tiedt Yelena-Marietta, Wiedermann Gerhard, Wernsdorfer Walther H., Wernsdorfer Gunther

Artikel/Article: [Chloroquin- und Mefloquinempfindlichkeit von Plasmodiumfalciparum im Nordwesten Thailands. 189-196](#)