

In vitro-Mefloquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Nordwest-Thailand

Nadia Soleman¹, S. Prajakwong², J. Sirichaisinthop³
G. Wiedermann¹, G. Wernsdorfer⁴, W. H. Wernsdorfer^{1, 4}

Einleitung

Die malariaspezifische Wirkung von Mefloquin, einer 4-Chinolinmethanolverbindung, wurde vor drei Jahrzehnten im Rahmen des Forschungsprogramms der US-Armee entdeckt (9). In der Folgezeit wurde das Medikament in Zusammenarbeit zwischen US-Armee, Industrie und WHO entwickelt und 1984 registriert. Mefloquin wird seither in der Therapie der Falciparum-Malaria und zur suppressiven Malariaphylaxe in Gegenden mit Chloroquin-resistentem *Plasmodium falciparum* eingesetzt. Mefloquin ist ein Blutschizontozid und als solches bei allen Malariaarten des Menschen wirksam. Abgesehen von Gametozyten von *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* hat es keine Wirkung gegen andere Parasitenstadien.

Thailand führte 1985 als erstes Land Mefloquin zur Standardbehandlung aller durch Blutuntersuchung bestätigten Fälle von Falciparum-Malaria ein, nachdem die mit Chloroquin sowie der Kombination von Sulfadoxin und Pyrimethamin erzielten Heilungsquoten erheblich gesunken waren und die als Interimlösung praktizierte Kombinationsbehandlung mit Chinin und Tetrazyklin wegen Problemen mit der Compliance aufgegeben werden musste. Obgleich eine spezifische Resistenz von *P. falciparum* bereits 1990 im Grenzgebiet von Kambodscha und Thailand aufgetreten ist und später auch in einem Teil des Grenzgebiets von Myanmar und Thailand um sich gegriffen hat, konnte Mefloquin seinen Platz in der Routinetherapie beibehalten, da es hochdosiert und in Kombination mit Artesunat weiterhin eine nahezu 100%ige klinisch-parasitologische Wirkungsquote aufweist (5). Weder Mefloquin noch Artemisinin und seine Derivate sind in Thailand kommerziell erhältlich. Ihre Verwendung beschränkt sich auf den öffentlichen Gesundheitsdienst und einige autorisierte Privatkrankenhäuser.

Eine Multiresistenz von *P. falciparum*, d. h. Resistenz gegen drei oder mehr strukturell verschiedene Medikamentklassen, beschränkt sich in Thailand derzeit auf zwei Gebiete an den Grenzen zu Kambodscha und Myanmar. Hier wird eine Kombinationstherapie mit Mefloquin und Artesunat eingesetzt. In den übrigen Landesteilen ist *P. falciparum* noch ausreichend mefloquinempfindlich. Allerdings wird die Sensibilität durch jährliche *in vitro*-Untersuchungen und die Nachbeobachtung der Behandelten überwacht, um gegebenenfalls die Therapierichtlinien rechtzeitig umstellen zu können. Der vorliegende Bericht gibt über die 1999 in zwei verschiedenen an der Grenze zu Myanmar gelegenen Regionen Thailands durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen Aufschluss.

Material und Methoden Die Untersuchungen wurden zwischen Mai und August 1999, d. h. während der Monate mit der jahreszeitlich höchsten Malariainzidenz, in Mae Hong Son und Mae Sot durchgeführt.

Mae Hong Son ist die Hauptstadt der gleichnamigen, im äußersten Nordwesten Thailands gelegenen Provinz, welche an den Shan-Staat Myanmars grenzt. Die Malariaübertragung auf der thailändischen Seite ist geringgradig, die benachbarte Region Myanmars gilt als hyperendemisch. In Mae Hong Son hat *P. falciparum* bisher gut auf Mefloquin angesprochen.

Mae Sot liegt etwa 350 km südlich von Mae Hong Son. Der Distrikt von Mae Sot grenzt auf einer Länge von mehr als 100 km an Myanmar. Gegenwärtig weist der Distrikt von Mae Sot die höchste Malariainzidenz Thailands auf, allerdings stammt die Mehrzahl der Infektionen aus dem benachbarten Myanmar. Die Grenzregion Myanmars ist ein Gebiet mit intensiver Malariaübertragung.

Die Studien wurden im Rahmen des thailändischen Programms zur Überwachung der Arzneimittelempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Zusammenarbeit zwischen dem Ministerium für Öffentliche Gesundheit Thailands und der Abteilung für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien an den Malariakliniken von Mae Hong Son und Mae Sot durchgeführt.

Patienten Die Parasitenisolate stammten ausschließlich von symptomatischen Patienten, welche die Malariaklinik zwecks Diagnose und Therapie aufsuchten und bei welchen eine Monoinfektion mit *P. falciparum* vorlag. Eine Vorbehandlung mit Malariamitteln während der vorangegangenen zwei Monate und eine asexuelle Parasitendichte außerhalb des Bereichs von 1000 – 80000/µl Blut waren Ausschlusskriterien. Nach Bestätigung der Monoinfektion mit geeigneter Parasitendichte wurde die Blutprobe für einen in vitro-Test und für eine exakte Bestimmung der Parasitendichte abgenommen.

In vitro-Test Die Mefloquinempfindlichkeit von *P. falciparum* wurde mittels WHO-Standard-Mikrotest für die Messung der Schizontenreifungshemmung bestimmt (10). Die hierfür verwendeten vordosierten Testplatten wurden vom WHO-Regionalbüro für den Westpazifik, Manila, geliefert. Diese Testplatten (FALCON 3070, Becton Dickinson) enthielten in den Vertiefungen B – H aufsteigende Mefloquinmengen von 2 bis 128 pmol.

Zur Durchführung des in vitro-Tests wurden 100 µl Blut mittels steriler heparinisierter Mikropipette aus der Fingerbeere entnommen und unverzüglich mit 2000 µl RPMI-1640 (komplett mit Natriumbikarbonat und HEPES) verdünnt. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Blut-Medium-Mischung (BMM) in die acht Vertiefungen der Testreihe der vordosierten Mikrotestplatte gegeben. Nach Schließen der Testplatte mittels sterilem Deckel (FALCON 3071) wurde die befüllte Testplatte in einen vorgewärmten Kerzentopf verbracht und für 24 Stunden bei 37,5°C im Inkubator bebrütet. Nach der Bebrütung wurde die überstehende Medium-Plasma-Mischung aus jeder Plattenvertiefung dekantiert. Aus dem Zellsediment wurden dicke Tropfen angefertigt. Da der normale Objektträger ausreichend Platz für 8 dicke Tropfen bietet, konnten die Proben aus Vertiefungen A-H auf einem einzigen Objektträger untergebracht werden. Nach gründlicher Trocknung wurden die Präparate bei pH 6,8-6,9 nach GIEMSA gefärbt.

Zur Bestimmung der relativen Schizontenreifung wurde in jedem dicken Tropfen die Anzahl von Schizonten pro jeweils 200 asexuelle Parasiten (alle Formen) gezählt. Vertiefung A diente als medikamentfreie Kontrolle. Konventionsgemäß wurden Tests mit einer Schizontenreifung von mindestens 10% in der Kontrolle als gültig gewertet (10). Die Bestimmung der Parasitendichte vor Inkubation folgte der WHO-Standardmethode (11). Diese basiert auf der Parallelzählung von asexuellen Parasiten und Leukozyten.

Auswertung der Sensibilitätsprüfungen Da die konzentrationsbedingte Schizontenreifungshemmung bei *P. falciparum* unter Mefloquin eine log-normale Verteilung zeigt, wurden die Testergebnisse nach der Methode von LITCHFIELD und WILCOXON ausgewertet (3). Bei diesem Verfahren werden die Arzneimittelkonzentrationen log-transformiert und die zugehörigen Hemmwerte in Probits ausgedrückt. Für Mefloquin entsteht hierdurch eine lineare Regression, welche nach dem System der kleinsten Quadrate berechnet wer-

Tabelle 1:

Hauptparameter der Mefloquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son und Mae Sot, Thailand, 1999.

PARAMETER	MAE HONG SON	MAE SOT
% SRH* bei		
840 nmol/l Blut	49,65	39,80
1680 nmol/l Blut	82,11	73,40
3360 nmol/l Blut	97,48	91,99
6720 nmol/l Blut	99,85	98,35
13440 nmol/l Blut	100,00	99,88
26880 nmol/l Blut	100,00	99,95
53760 nmol/l Blut	100,00	100,00
Anzahl Isolate	36	52
r (der Regressionslinie)	0,9994	0,9963
χ^2 für Heterogenität	0,0306	0,3077
S (Steigung der Regression)	2,0200	2,4354
EC-50 (nmol/l Blut)	856,9500	1003,6700
EC-90 (nmol/l Blut)	2120,6100	3160,5300
EC-99 (nmol/l Blut)	4438,4000	8050,8900
GMEP** (nmol/l Blut)	2771,5300	4271,1000
* SRH = Hemmung der Schizontenreifung		
** GMEP = Geometrisches Mittel der Endpunkte der Schizontenreifung		

den kann. Für die Berechnung von Regressionsparametern und effektiven Konzentrationen (EC) individueller und gruppierter Isolate wurden EDV-Adaptationen des Verfahrens von LITCHFIELD und WILCOXON benutzt (1, 8).

Ergebnisse

In Mae Hong Son wurden 36, in Mae Sot 52 Isolate von *P. falciparum* erfolgreich auf deren Mefloquinsensibilität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

In Mae Hong Son wurde der absolute Endpunkt der Schizontenreifung bei einer Mefloquinkonzentration von 13440 nmol/l Blut erreicht. Nur zwei von 36 Isolaten zeigten bei 6720 nmol/l Blut noch Schizontenreifung und waren daher als resistent anzusehen. Die Log-Probit-Regression zeigt einen außerordentlich hohen Korrelationskoeffizienten ($r = 0,9994$) und daher auch eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Datenpunkten und Regressionsgeraden, welche auch in einem geringen χ^2 -Wert für Heterogenität zum Ausdruck kommt (0,0306 bei maximal erlaubtem Wert von 7,815). Die Regressionsgerade zeigt einen relativ steilen Verlauf und enge Vertrauensgrenzen (Abb. 1). Die EC-99, d. h. die für eine 99%ige Hemmung der Schizontenreifung erforderliche Arzneimittelkonzentration, liegt mit einem Mittelwert von 4438 nmo/l Blut noch im oberen therapeutisch erreichbaren Bereich.

In Mae Sot lag der absolute Endpunkt der Schizontenreifung bei 53760 nmol/l Blut. Bei 8 von 52 Isolaten zeigte sich Schizontenreifung noch bei einer Mefloquinkonzentration von 6720 nmol/l Blut.

Die Log-Probit-Regression zeigte eine gute Übereinstimmung von Datenpunkten und Regressionslinie und überraschend wenig Heterogenität ($\chi^2 = 0,3077$ bei maximal erlaubtem Wert von 11,0700). Die Regressionsgerade verläuft relativ steil und hat enge Vertrauensgrenzen (Abb. 2). Der Mittelwert für die EC-99 liegt mit 8051 nmol/l Blut deutlich im resistenten Bereich.

Der Vergleich der Regressionsgeraden (Abb. 3) zeigt deutlich den steileren Verlauf für die Isolate von Mae Hong Son. Im oberen Verlauf der Regressionsgeraden wird auch die geringere Mefloquinsensibilität der Isolate aus Mae Sot deutlich. Die für die EC-84 (d. h. Probit 1) errechneten Mittelwerte zeigen einen signifikanten Unterschied ($PR_{EC-84} = 1,41206$ bei $f_{EC-84} = 1,39566$; $p < 0,05$) im Sinne geringerer Mefloquinsensibilität der Isolate in Mae Sot. Dies wurde durch einen Vergleich der für die individuellen Isolate berechneten EC-50, EC-90 und EC-99 Werte erhärtet. Da diese Werte eine log-normale Verteilung zeigten, wurde der Vergleich an Hand der geometrischen Mittelwerte im t-Test vorgenommen. Die ermittelten p-Werte für EC-50 ($p < 0,029$), EC-90 ($p < 0,012$) und EC-99 ($p < 0,021$) liegen alle im Signifikanzbereich ($< 0,05$).

Auch die geometrischen Mittelwerte für die Endpunkte der Schizontenreifung (GMEP), 2711,53 nM für Mae Hong Son und 4271,10 nM wurden im t-Test verglichen. Hier ergab sich mit $p < 0,0056$ ein hoch signifikanter Unterschied der Mefloquinsensibilität.

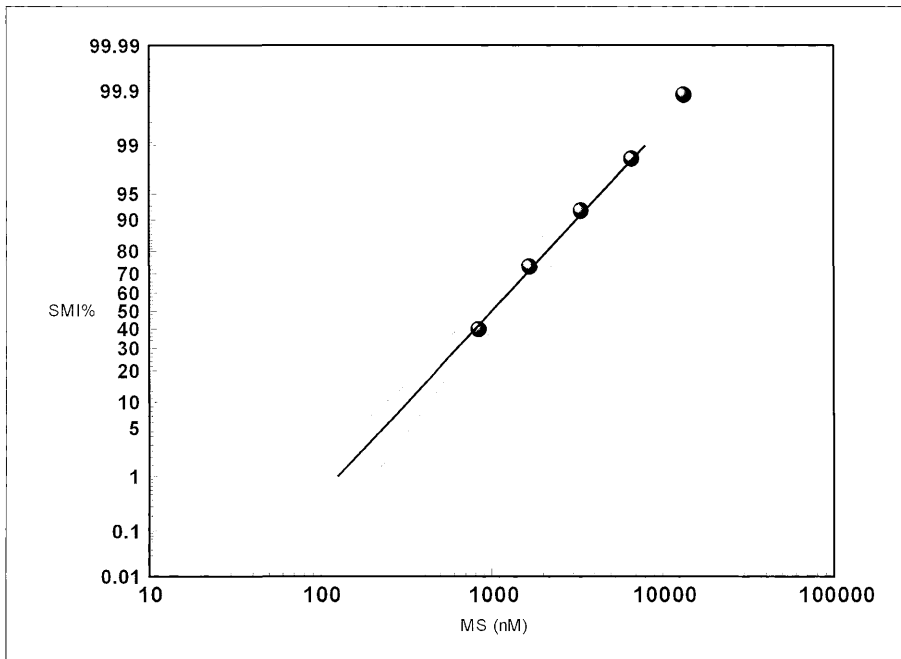


Abbildung 1:

Mefloquinempfindlichkeit von frischen Isolaten (n = 36) von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Nordwest-Thailand, 1999, mit Datenpunkten und 95% Vertrauensgrenzen.

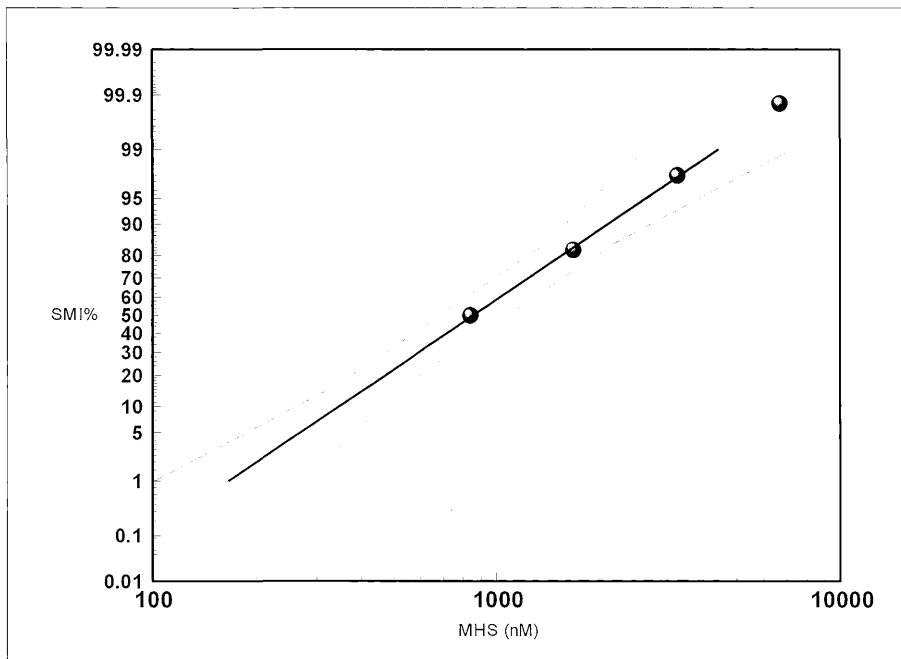


Abbildung 2:

Mefloquinempfindlichkeit von frischen Isolaten (n = 52) von *Plasmodium falciparum* in Mae Sot, Nordwest-Thailand, 1999, mit Datenpunkten und 95% Vertrauensgrenzen.

Diskussion

Die Zahl der in Mae Hong Son und Mae Sot untersuchten Isolate liegt mit 36 und 52 über dem gewöhnlich im Rahmen der longitudinalen Überwachungsstudien geforderten Mindestumfang (6). Die Parasitenisolate wurden in beiden Orten nach gleichen Kriterien und Methoden erhalten und untersucht. Es dürfte daher außer Zweifel stehen, dass die Mefloquinsensibilität der *P. falciparum* Populationen in Mae Sot erheblich geringer ist als in Mae Hong Son. Die unterschiedliche Mefloquinsensibilität ist besonders ausgeprägt bei den klinisch wichtigen Parametern von EC-90, EC-99 und GMEP. Dies drückt sich auch in den therapeutischen Ergebnissen aus. Die Monotherapie mit einer Einzeldosis von Mefloquin (12,5 mg/kg Körpergewicht) zeigt in Mae Hong Son mit einer Rückfallquote unter 10% noch immer zufriedenstellende Ergebnisse, während die Rückfallquote mit hochdosierter Monotherapie (20,8 mg/kg Körpergewicht, geteilte Dosen) in Mae Sot im Jahre 1996 nur mehr bei 40 - 50% der Patienten zur Heilung führte. Daher wird in Mae Sot seit 1997 die Kombinationstherapie mit Mefloquin und Artesunat durchgeführt. Sie hat derzeit eine Heilungsquote von nahezu 100% (5).

Da Mae Sot und Mae Hong Son nur etwa 350 km voneinander entfernt an der Grenze zu Myanmar liegen erhebt sich die Frage nach den Ursachen der unterschiedlichen Mefloquinsensibilität. Die Gründe sind sicherlich humanökologischer Natur. Dies bezieht sich bereits auf die Frühentstehung der Mefloquinresistenz in Mae Sot. Vor etwa einem Jahrzehnt wurde die Mefloquinresistenz zu einem Problem im Grenzgebiet von Thailand und Kambodscha. Damals arbeiteten vorwiegend aus Thailand und Myanmar stammende Edelsteinsucher in dem vom Roten Khmer beherrschten hyperendemischen Gebiet nahe der thailändischen Grenze. Zur Behandlung der auf kambodschanischem Gebiet zugezogenen Malariainfektionen begaben sie sich ins grenznahe Thailand, um nach der Therapie wieder nach Kambodscha zurückzukehren. Auf Grund der langen Halbwertszeit von Mefloquin wurden neue Infektionen erheblichem Selektionsdruck ausgesetzt und die Folge waren rasches Auftreten und schnelle

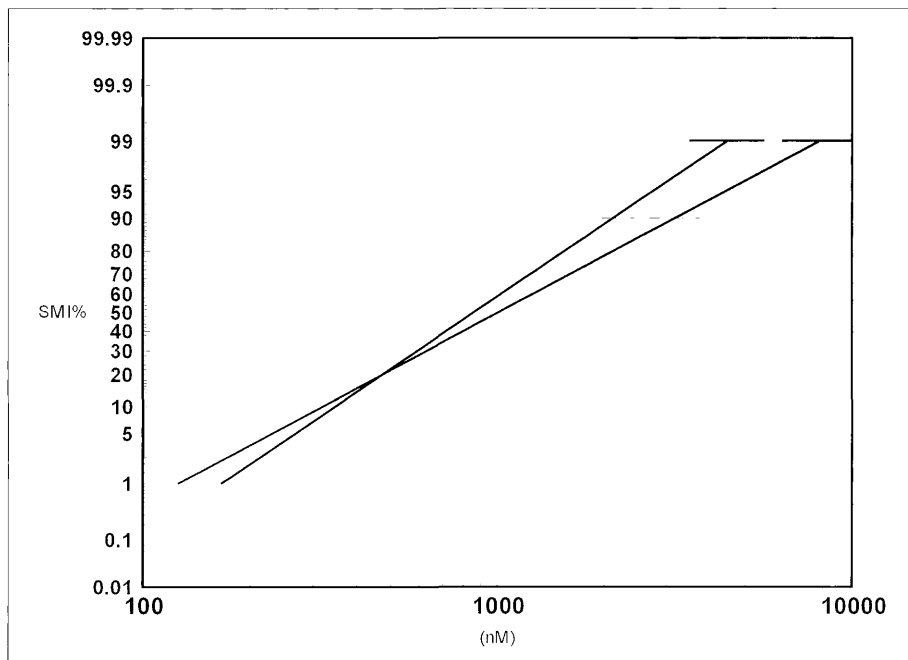


Abbildung 3:

Mefloquinempfindlichkeit von frischen Isolaten von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son (n = 36) und Mae Sot (n = 52), Nordwest-Thailand, 1999. Querlinien bei EC-90 und EC-99 beziehen sich auf Mittelwerte \pm 1 Standardfehler.

noch weitgehend wirksam ist, weisen die in vitro-Daten auf die Möglichkeit baldigen Resistenzeintritts hin. Ferner ist die Lebensdauer der Kombination von Artesunat und Mefloquin in Mae Sot nicht abzusehen. Es ist daher angebracht, die Situation in beiden Regionen weiterhin intensiv zu überwachen und schon heute therapeutische Alternativen zu identifizieren.

Zusammenfassung

Im Rahmen der Überwachung der Arzneimittelempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* wurden 1999 insgesamt 88 frische Parasitenisolate im Nordwesten Thailands auf ihre in vitro-Mefloquin-sensibilität geprüft. Die Studien wurden nahe der Grenze zu Myanmar in Mae Hong Son und Mae Sot, etwa 350 km voneinander entfernt gelegenen Orten durchgeführt. In Mae Hong Son war die Mefloquinempfindlichkeit signifikant höher als in Mae Sot, wo bereits eine ausgeprägte Resistenz besteht. Dies war bei den klinisch wichtigen Parametern EC-90 (2121 vs 3161 nmol/l Blut), EC-99 (4438 vs 8051 nmol/l Blut) und der geometrischen Mittelkonzentration für die absolute Hemmung des Schizontenwachstums (2772 vs 4271 nmol/l Blut) besonders deutlich. Die geringere Mefloquinsensibilität in Mae Sot erklärt sich durch Migration aus Gebieten mit etablierter Mefloquinresistenz sowie weiteren Selektionsdruck in der grenznahen Umgebung.

Schlüsselwörter

Plasmodium falciparum, Mefloquin, Sensibilität, Resistenz.

Summary

In vitro sensitivity to mefloquine of *Plasmodium falciparum* in northwestern Thailand, 1999

As part of the monitoring programme for drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Thailand a total of 88 fresh parasite isolates were tested in 1999 for their in vitro response to mefloquine. The studies were performed at Mae Hong Son and Mae Sot, a town situated 350 km to the south of Mae Hong Son. Both study areas are near the border to Myanmar in the northwestern part of the country. The isolates from Mae Hong Son were significantly more sensitive to mefloquine as compared to those from Mae Sot where resistance is marked. This is particularly striking with the clinically

Verbreitung von Mefloquinresistenz (8). Da Mae Sot auf der Rückwanderoute der Arbeiter aus Myanmar lag und der Aufenthalt im Grenzgebiet sich wegen interner Konflikte in Myanmar häufig verzögerte, entstand dort ein Sekundärherd, welcher heute die Bedeutung des mittlerweile beruhigten Primärherds an der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha übertrifft (2). Hinzu kommt ein weiterer Selektionsdruck durch die Mefloquinbehandlung von Grenzmigranten aus und nach Myanmar, ähnlich dem früher an der kambodschanischen Grenze beobachteten Zustand. Im Gegensatz zu Mae Sot war Mae Hong Son bisher keiner derart intensiven Migration ausgesetzt. Die Grenze war während der vergangenen Jahre häufig auch gesperrt. Zudem liegt Mae Hong Son nicht auf einer Wanderoute, welche Gebiete mit Mefloquinresistenz berührt.

Ogleich Mefloquin derzeit in Mae Hong Son therapeutisch bei der Falciparum-Malaria

important parameters of EC-90 (2121 vs 3161 nmol/l blood), EC-99 (4438 vs 8051 nmol/l blood) and the geometric mean cut-off point of schizont maturation (2772 vs 4271 nmol/l blood). The lower sensitivity to mefloquine at Mae Sot may be explained by migration from areas with established resistance to the drug, and by further drug pressure in the border area near Mae Sot District.

Key words *Plasmodium falciparum*, mefloquine, drug sensitivity, drug resistance.

Literatur

1. GRAB, B., WERNSDORFER, W. H. (1983):
Evaluation of in vitro tests for drug sensitivity in *Plasmodium falciparum*: Probit analysis of logdose/response test from 3-8 points assay.
WHO document WHO/MAL/83.990.
2. KIDSON, C., SINGHASIVANON, P., SUPAVEJ, S. (1999):
Mekong malaria.
Southeast Asian J. Trop. Med. and Publ. Hlth. 30, Suppl. 4.
3. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
4. ter KUILE, F. O., et al (1995):
Predictors of mefloquine treatment failure: a prospective study in 1590 patients with uncomplicated *falciparum* malaria.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89, 660-664.
5. van VUGT, M., et al (1998):
Randomized comparison of artemether-benflumetol and artesunate-mefloquine in treatment of multidrug-resistant *falciparum* malaria.
Antimicrob. Agents Chemoth. 42, 135-139.
6. WERNSDORFER, W. H., PAYNE, D. (1988):
Drug sensitivity tests in malaria parasites.
In: Wernsdorfer, W. H., McGregor, I. A. (eds.): Malaria, principles and practice of malariology.
Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 1765-1800.
7. 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. Trop. Med. Parasitol. 17, 221-228.
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 (1984):
Advances in malaria chemotherapy.
WHO Techn. Rep. Ser. No. 711. WHO, Genf.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):
In vitro micro-test (Mark II) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, quinine, sulfadoxine / pyrimethamine and amodiaquine.
WHO Document MAP/87.2 Rev. 1.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1991):
Basic malaria microscopy. Part I.
WHO, Genf.

Korrespondenzadresse Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer
Abteilung für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin
Institut für Pathophysiologie der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

e-mail <walter.h.wernsdorfer@univie.ac.at>

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: 2000

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Soleman Nadia, Prajakwong Somsak, Sirichaisinthop J., Wiedermann Gerhard, Wernsdorfer Gunther, Wernsdorfer Walther H.

Artikel/Article: [In vitro-Mefloquinempfindlichkeit von Plasmodiumfalciparum in Nordwest-Thailand. ? 81-86](#)