

In vitro Untersuchungen über die Artemisinin-empfindlichkeit von Plasmodium falciparum in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1999

Birgit Woitsch¹, S. Prajakwong², G. Wernsdorfer³

G. Wiedermann¹, Claudia Zatloukal¹, W. H. Wernsdorfer^{1,3}

Einleitung

Artemisinin, ein aus dem einjährigen Korbblütler *Artemisia annua* L. durch Extraktion gewonnenes Sesquiterpen-Lakton, wurde erstmals 1972 in China isoliert (9). Schon kurz nach seiner Entdeckung kam es in praktischen Gebrauch zur Behandlung von Malaria, insbesondere Infektionen mit *Plasmodium falciparum*. Allerdings beschränkte sich dies für nahezu zwei Jahrzehnte auf China und das benachbarte Myanmar, wo Artemisinin und seine Derivate Artemether und Na-Artesunat im Unterschied zu China in vielen Ladengeschäften ohne jegliche Formalität gekauft werden können. Die Öffentlichkeit Myanmars macht von dieser Gelegenheit ausgedehnten Gebrauch, da die wenigen im staatlichen Gesundheitsdienst verfügbaren Medikamente wegen der verbreiteten Resistenz von *P. falciparum* nicht ausreichend wirksam sind.

Seit wenig mehr als einem Jahrzehnt werden Artemisinin und seine Derivate auch in Viet Nam routinemäßig zur Behandlung der Falciparum-Malaria eingesetzt, jedoch sind diese Präparate nur im Rahmen des staatlichen Gesundheitsdienstes zugänglich. Das Fehlen grundlegender präklinischer, unter Beachtung der Maßgaben von GLP („good laboratory practice“) erarbeiteter Daten stand für lange Zeit der Registrierung von Artemisinin und seinen Derivaten in Ländern mit strikt geregelten Zulassungsbestimmungen im Wege. Dazu kam, dass auch die Produktion der Präparate in den Ursprungsländern nicht den Regeln der GMP („good manufacturing practice“) entsprach. In jüngerer Zeit wurden Mängel in der präklinischen Dokumentation behoben. Auch die Produktion entsprechend GMP ist in Gang gekommen und in der Folge wurden einige Artemisinin-derivate durch Zulassungsbehörden in Europa registriert.

Artemisinin und seine Derivate haben blutschizontozide Wirkung. Sie werden als Alternativmedikamente in der Behandlung von multiresistenter Falciparum-Malaria eingesetzt. Allerdings sollten sie wegen der mit Monotherapie verbundenen hohen Rückfallrate (1) nur in Verbindung mit einem anderen Blutschizontozid verwendet werden. In Thailand wurde die kombinierte Behand-

lung mit Artesunat und hochdosiertem Mefloquin 1995 in zwei Gebieten eingeführt, wo die Heilungsrate mit hochdosierter Monotherapie mit Mefloquin auf weniger als 50% abgesunken war. Hier beträgt die Heilungsrate der kombinierten Therapie nahezu 100% (5). Dies ist durch den Synergismus zwischen Mefloquin und Artemisinin bzw. seinen Derivaten zu erklären. In Thailand beschränkt sich die Verwendung von Mefloquin und Artemisinderivat auf autorisierte Stellen des Gesundheitsdienstes.

Die beiden von Mefloquinresistenz betroffenen Gebiete Thailands liegen im Südteil der Grenze mit Kambodscha (Trat-Provinz) sowie im Mittelteil der Grenze zu Myanmar (Mae Sot District). In anderen Gebieten Thailands ist Mefloquin noch als Monotherapie ausreichend wirksam. Dies gilt auch für die ebenfalls an der Grenze zu Myanmar, etwa 350 km nördlich von Mae Sot gelegene Provinz Mae Hong Son. Hier unterliegt der Grenzverkehr erheblichen, von der politischen Lage abhängigen Schwankungen. Dies bestimmt auch die Herkunft der in den Malariakliniken behandelten Patienten. Da bei Eintritt von Mefloquinresistenz in dieser Gegend voraussichtlich Artemisininderivate als Alternativtherapeutika eingesetzt würden schien es angebracht, die Artemisininresistenz von *P. falciparum* über einen längeren Zeitraum zu verfolgen. Dies war umso wichtiger als die Staatsgrenze auch eine Grenze für den verschiedenen hohen Selektionsdruck durch Artemisinin darstellt, nämlich hoch in Myanmar (freier Zugang zu Artemisinin in Myanmar), bzw. niedrig auf der thailändischen Seite (kein Zugang).

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden zwischen 1994 und 1999 an der Malariaklinik von Mae Hong Son, jeweils zwischen Mai und Juli durchgeführt. Mae Hong Son, Hauptstadt der gleichnamigen Provinz, ist im Nordwesten Thailands an der Grenze zu Myanmar (Shan State) gelegen. Die Stadt selbst ist malariefrei. Die Patienten der Malariaklinik kommen aus der ländlichen Umgebung von Mae Hong Son oder, bei passierbarer Grenze, auch aus Myanmar. Diagnostik und Behandlung in der Malariaklinik sind unentgeltlich. Von sämtlichen Patienten werden Blutproben (dicke Tropfen) abgenommen, nach GIEMSA gefärbt und mikroskopisch untersucht. Die Routinebehandlung der mikroskopisch gesicherten Falciparum-Malaria besteht aus einer Einzeldosis Mefloquin (etwa 12,5 mg/kg), dazu eine Einzeldosis von Primaquin (etwa 0,75 mg/kg) als Gametozytozid (nicht bei Schwangeren und Kindern <4 J.).

Die Studien waren Teil des thailändischen Programms zur Überwachung der Arzneimittelempfindlichkeit von *P. falciparum*. Sie wurden in Zusammenarbeit zwischen dem Ministerium für Öffentliche Gesundheit Thailands und dem Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien durchgeführt.

Plasmodium falciparum-Isolate

Die Parasitenisolate stammten von symptomatischen Patienten, welche die Malariaklinik oder die Poliklinik des Provinzkrankenhauses von Mae Hong Son konsultierten und bei welchen eine Monoinfektion mit *P. falciparum* und eine asexuelle Parasitendichte von 1000 - 80000/ml Blut mikroskopisch gesichert wurden. Behandlung mit Malariamitteln während der vorangegangenen zwei Monate galt als Ausschlusskriterium.

In vitro Test

Die Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum* wurde mittels WHO-Standard-Mikrotest für die Bestimmung der Schizontenreifungshemmung geprüft (6). Die Testplatten wurden an der Abteilung für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien mit Artemisinin vordosiert. Hierzu diente der Artemisinin-Referenzstandard der Academy of Military Medical Science, Beijing. Die Testplatten (FALCON 3070, Becton Dickinson) enthielten in den Vertiefungen B-H aufsteigende Mengen von 0,15; 0,50; 1,50; 5,00; 15,00; 50,00 und 150 nmol Artemisinin, entsprechend Konzentrationen von 3; 10; 30; 100; 300; 1000 und 3000 nM in der Blut-Medium-Mischung (BMM). Vertiefung A diente als medikamentfreie Kontrolle.

Mittels steriler heparinisierter Mikropipette wurden 100 µl Blut aus der Fingerbeere entnommen und mit 900 µl RPMI-1640 Medium (komplett mit Natriumbikarbonat und HEPES-Puffer) verdünnt um die Blut-Medium-Mischung (BMM) zu erhalten. Zugleich wurde ein dicker Tropfen zur genauen

Bestimmung der Parasitendichte angefertigt. Je 50 μl der BMM wurden nun in die acht vorgesehenen Vertiefungen der Testplatte gegeben. Die Testplatte wurde mit einem Sterildeckel (FALCON 3071) geschlossen, in einen vorgewärmten Kerzentopf verbracht und für 24 Stunden bei 37,5°C im Inkubator belassen. Nach der Bebrütung wurden die Platten dem Kerzentopf entnommen. Nach Entfernung der überstehenden Blutplasma-Medium-Mischung wurden aus den Sedimenten der Vertiefungen dicke Tropfen angefertigt, wobei die acht Proben der jeweiligen Testserie (in feststehender Anordnung) auf einem einzigen Objektträger plaziert wurden. Nach gründlicher Trocknung wurden die Testpräparate bei pH 6,8 - 6,9 nach GIEMSA gefärbt.

Die Bestimmung der aktuellen, zur Zeit der Probeentnahme für den Sensibilitätstest bestehenden Parasitendichte erfolgte nach der WHO Standardmethode (11). Hierzu werden asexuelle Parasiten und Leukozyten parallel gezählt. Bei Parasitendichten bis zu 8000/ μl erfolgt die Parallelzählung gegen 200 Leukozyten, bei Parasitendichten > 8000/ μl gegen 500 Parasiten.

In den Präparaten für die Sensibilitätsprüfung wurde die Schizontendichte in den dicken Tropfen auf der Basis von jeweils 200 asexuellen Parasiten (alle Formen) bestimmt. Der Wert aus Vertiefung A (medikamentfreie Kontrolle) diente zur Berechnung der relativen Hemmung der Schizontenreifung in Vertiefungen B - H. Als Schizonten gelten asexuelle Parasiten mit mindestens 3 Chromatinkörpern. Schizontenreifung von $\geq 10\%$ in der medikamentfreien Kontrolle gilt als Gültigkeitskriterium für den Test (10).

Mathematische und
Statistische Auswertung

Die konzentrationsabhängige Hemmung der Schizontenreifung durch Artemisinin zeigt bei *P. falciparum* eine log-normale Verteilung (7). Darum eignet sich das Verfahren von LITCHFIELD und WILCOXON (3) zur Auswertung individueller und gruppierter Testserien. Bei dieser Methode werden die Arzneimittelkonzentrationen zu Logarithmen und die Hemmwerte (%) in Probits transformiert. Die transformierten Werte können nun zur Berechnung einer linearen Regression der kleinsten Quadrate verwendet werden. Die Methode von LITCHFIELD und WILCOXON schließt die Berechnung wichtiger Regressionsparameter und Vertrauensgrenzen ein. Da es auch unter Verwendung üblicher elektronischer Taschenrechner äußerst zeitaufwendig ist, wurden im Rahmen dieser Studie EDV-Versionen des Verfahrens benutzt (2, 7).

Ergebnisse

Zwischen 1994 und 1999 wurden insgesamt 275 *P. falciparum* Isolate erfolgreich auf deren Artemininsensibilität geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Sämtliche Log-Probit Regressionen zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden und den Datenpunkten. Dies kommt durch einen mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,9838 zum Ausdruck. Ferner liegen die χ^2 Werte für Heterogenität weit unter der Signifikanzgrenze. Die als Beispiele gezeigten Regressionen für 1994 (Abb. 1) und 1999 (Abb. 2) illustrieren das log-normale Verhalten der Wirkung von Artemisinin und relativ enge 95% Vertrauensgrenzen für die Regressionsgeraden.

Die in Tabelle 1 angeführten EC-50 und EC-90 Werte und die in Abb. 3 gezeigten Regressionsgeraden zeigen zwischen 1994 und 1999 einen Anstieg der Artemininsensibilität. Lediglich im Jahre 1998 war diese Entwicklung temporär unterbrochen. Insgesamt erfolgte zwischen 1994 und 1999 eine Reduktion der EC-50 von 35,85 nM auf 9,98 nM, die EC-90 fiel von 436,41 auf 32,46 nM. Dies war eine hochsignifikante Erhöhung der Sensibilität, welche sich auch in einer signifikanten Verminderung der mittleren Vollhemmung der Schizontenreifung ausdrückt. Die geometrischen Mittel der absoluten Hemmkonzentrationen fielen von 407,40 nM im Jahre 1994 auf 74,81 nM im Jahre 1999 ($t = 7,94$; $p < 10^{-6}$). Während des gleichen Zeitraums verringerten sich die Steigungswerte (S) der Regressionsgeraden von 6,954 auf 2,497, d.h. der anfangs sehr flache Regressionsverlauf wurde zunehmend steiler. Die Änderung der Steigung ist signifikant da das Steigungsverhältnis ($SR = 2,785$) größer ist als sein Faktor ($f_{SR} = 1,641$).

Tabelle 1:

Hauptparameter der Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1999.

PARAMETER	1994	1995	1996	1997	1998	1999
% SRH* bei						
3 nM	11,60	13,71	21,10	10,15	3,20	11,13
10 nM	27,98	27,91	51,32	42,93	19,51	45,46
30 nM	42,74	48,21	68,69	80,25	43,65	90,05
100 nM	66,60	80,77	98,16	95,67	69,62	99,45
300 nM	84,35	95,88	99,81	99,79	84,70	100,00
1000 nM	99,82	97,97	100,00	99,99	99,90	100,00
3000 nM	100,00	99,17	100,00	100,00	100,00	100,00
Anzahl Isolate	51	40	41	59	49	35
r (der Regression)	0,9709	0,9902	0,9706	0,9986	0,9762	0,9961
χ^2 f. Heterogenität	3,3601	2,2034	3,4613	0,3917	2,6492	0,4967
S (Steigung)	6,9540	5,8826	3,9619	3,1158	4,8399	2,4973
EC-50 nM	35,8500	24,9300	10,2400	12,2600	43,2500	9,9800
EC-90 nM	436,4100	244,5900	60,3700	53,0100	330,0200	32,4600
GMEP** nM	407,4000	257,7900	97,9600	86,4500	331,3900	74,8100
* SRH = Hemmung der Schizontenreifung						
** GMEP = Geometrisches Mittel der Endpunktkonzentrationen der Schizontenreifung						

kante, interkurrente Reduktion der Artemisininempfindlichkeit zu beobachten (GMEP 86,45 nM und 331,39; $t = 6,2489$; $p < 10^{-5}$). Auch die Regressionsgerade verflachte sich signifikant ($SR = 1,553$ $> f_{SR} = 1,382$) Die 1998 verzeichneten Hauptparameter unterschieden sich nur wenig von jenen des

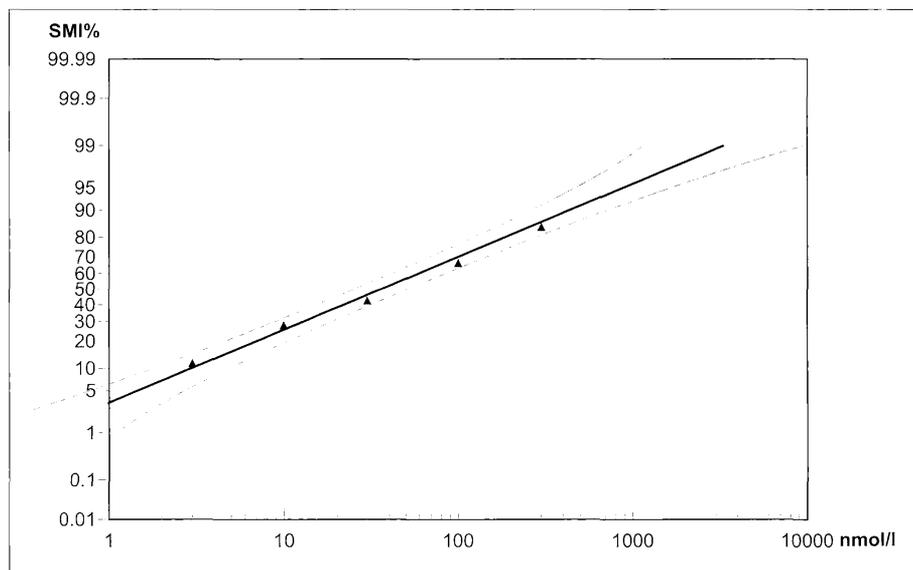


Abbildung 1:

Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994, mit Datenpunkten und 95% Vertrauensbereich der Regressionslinie.

SMI = Hemmung der Schizontenreifung.

Mit Ausnahme des Jahres 1998 vollzogen sich die Änderungen der Hauptparameter EC-50, EC-90, Regressionssteigerung und Endpunkt der Schizontenreifung graduell im Sinne einer gleichmäßigen Erhöhung der Sensibilität und einer steileren Regression. So blieben die meisten Veränderungen von Jahr zu Jahr unter der Signifikanzgrenze, mit Ausnahme der mittleren absoluten Hemmkonzentrationen (geometrische Mittel, GMEP) 1995 und 1996, welche von 257,79 nM auf 97,96 nM fielen ($t = 3,5164$; $p < 0,001$).

Zwischen 1997 und 1998 war eine signifikante, interkurrente Reduktion der Artemisininempfindlichkeit zu beobachten (GMEP 86,45 nM und 331,39; $t = 6,2489$; $p < 10^{-5}$). Auch die Regressionsgerade verflachte sich signifikant ($SR = 1,553$ $> f_{SR} = 1,382$) Die 1998 verzeichneten Hauptparameter unterschieden sich nur wenig von jenen des Jahres 1994. Zwischen 1998 und 1999 erfolgte eine Trendumkehr und es wurde eine weitere Steigerung der Artemisininempfindlichkeit beobachtet (GMEP Reduktion von 331,39 nM auf 74,81 nM; $t = 6,857$; $p < 10^{-5}$). Die Steigung wurde wieder steiler ($SR = 1,938$ $> f_{SR} = 1,476$; $p < 0,05$) und erreichte den geringsten Wert seit 1994.

Diskussion

Die individuellen, jahresspezifischen Regressionen der Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum* in Mae Hong Son weisen eine gute Übereinstimmung der Datenpunkte und der Regressionslinien auf; die 95% Vertrauensbereiche der Hauptparameter sind relativ eng. Daher steht dem Vergleich der jahresspezifischen Werte nichts im Wege.

Das auffälligste und zunächst paradox erscheinende Phänomen ist die stetige, nur 1998 temporär unterbrochene Steigerung der Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum*

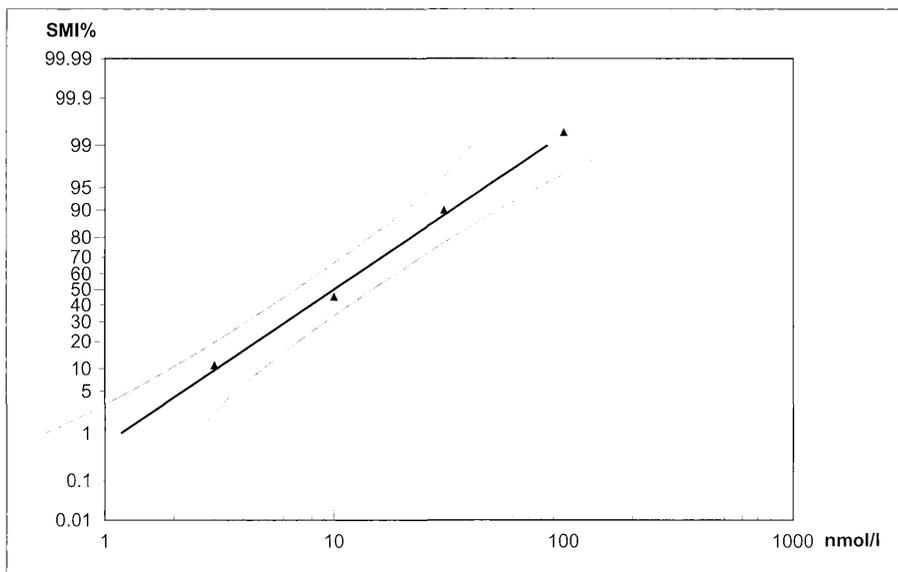


Abbildung 2:

Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1999, mit Datenpunkten und 95% Vertrauensbereich der Regressionslinie.
SMI = Hemmung der Schizontenreifung.

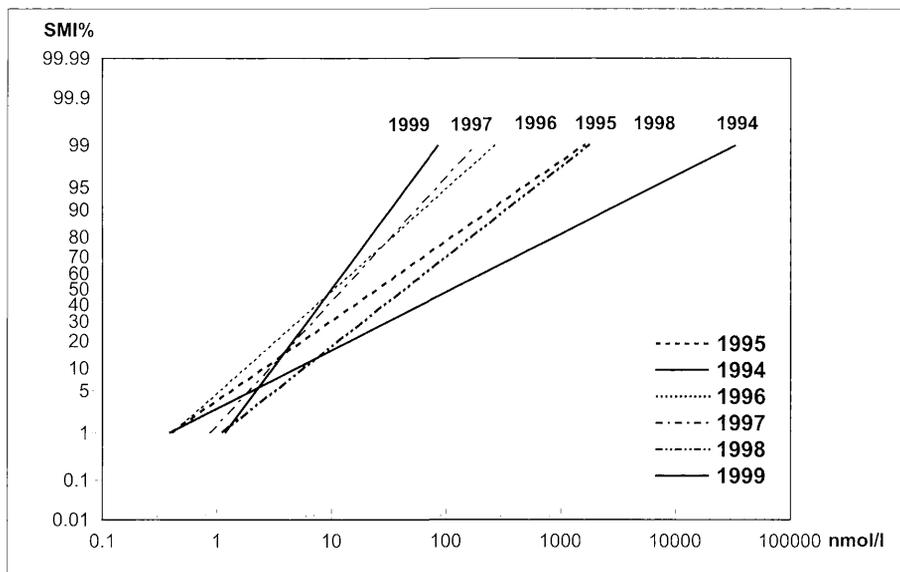


Abbildung 3:

Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1999.
SMI = Hemmung der Schizontenreifung.

zwischen den Jahren 1994 und 1999. Sie wird aus der Herkunft der Patienten verständlich. Wird der Anteil der Patienten aus Myanmar am Malaria-positiven Krankengut der Malariaklinik Mae Hong Son mit der Entwicklung der EC-50 für Artemisinin in den Jahren 1994-1997 und 1999 verglichen, so ergibt sich eine umgekehrte Korrelation mit dem Koeffizienten $r = 0,9726$ und $p < 0,01$. Die steigende Artemisininempfindlichkeit dürfte sich daher mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Rückgang des Patientenanteils aus Myanmar erklären. Wie bereits erwähnt, werden Artemisinin und Artemisinin-derivate in Myanmar häufig zur Selbstbehandlung der Malaria verwendet. Wegen des hohen Preises der Präparate richtet sich die Selbstbehandlung selten nach den üblichen Richtlinien, sondern ist zu kurz und/oder unterdosiert. Sie bringt zwar klinische Besserung, kaum aber Ausheilung der Infektion. Wie der Vergleich von Isolaten vor und nach Rekrudescenz ergeben hat, fällt die Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum* nach nichtkurativem in vivo-Kontakt mit Artemisininanalogon (4). Dieser Mechanismus dürfte die Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum* maßgebend beeinflussen.

Leider gibt es keine Berichte über die gegenwärtige in vitro-Sensibilitätslage in Myanmar selbst.

Der vorübergehende Rückgang der Artemisininempfindlichkeit im Jahre 1998 lässt sich nicht durch eine überdurchschnittliche Quote von Patienten aus Myanmar erklären. Er dürfte auf eine signifikante Abnahme der Malariaübertragung auf thailändischem Gebiet (für die Inzidenz $t = 18/1000$; $p < 10^{-8}$) und einen relativ hohen Anteil von residuellen Infektionen nach Mefloquinversagen zurückzuführen sein. Mefloquinresistenz ist mit verminderter Artemisininempfindlichkeit verbunden (8). Von 1997 bis 1998 hat die Anzahl von *P. falciparum* Infektionen an der Malariaklinik um 58% abgenommen. Auch die Inzidenz von *P. vivax* war rückläufig. Der relative Anteil von *P. falciparum* Infektionen nahm zwischen 1997 und 1998 signifikant ab ($\chi^2 = 9,6862$; $p < 0,005$). Trotz etwa gleicher Malariainzidenz im Jahre 1999

hat sich der *P. falciparum* Anteil wieder auf die frühere Proportion eingependelt. Dazu erreichte der Anteil von Patienten aus Myanmar mit 30,4% den tiefsten Stand während des Zeitraums von 1994-1999.

Die 1999 beobachtete Artemisininempfindlichkeit von *P. falciparum* in Mae Hong Son entspricht etwa den Basiswerten von Tanzania (12) und ist als ausgesprochen hoch anzusehen. Im etwa 350 km südlicher gelegenen Gebiet von Mae Sot, wo Artesunat seit 1995 therapeutisch eingesetzt wird, war die Artemisininempfindlichkeit 1999 signifikant geringer.

Zusammenfassung Longitudinale in vitro Untersuchungen der Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* wurden zwischen 1994 und 1999 in Mae Hong Son, Nordwest-Thailand, mit insgesamt 275 Parasitenisolate durchgeführt. Während dieses Zeitraums ging die mittlere EC-50 für Artemisinin von 35,85 nM auf 9,98 nM zurück, die mittlere EC-90 von 436,41 nM auf 32,46 nM. Auch die Mittelwerte für absolute Schizontenreifungshemmung fielen von 407,40 nM auf 74,81 nM. Diese Sensibilität steht signifikant in umgekehrtem Verhältnis zum Anteil von Malariapatienten aus Myanmar. Der Trend zu höherer Artemisininempfindlichkeit war 1998 vorübergehend unterbrochen, wofür ein signifikanter Rückgang der Malariaübertragung, insbesondere jener der Falciparum-Malaria, und der Anteil residuellen Reservoirs nach Mefloquinversagen verantwortlich gewesen sein dürften.

Schlüsselwörter *Plasmodium falciparum*, Artemisinin, Sensibilität, in vitro, Thailand.

Summary *In vitro studies on the sensitivity to artemisinin in Plasmodium falciparum at Mae Hong Son, Thailand, 1994-1999*

Longitudinal in vitro investigations of the sensitivity of *Plasmodium falciparum* to artemisinin were conducted between 1994 and 1999 at Mae Hong Son, northwestern Thailand, examining a total of 275 parasite isolates. During this period the mean EC-50 for artemisinin dropped from 35.85 nM to 9.98 nM, the mean EC-90 from 436.41 nM to 32.46 nM. Also the geometric mean of cut-off concentrations dropped from 407.40 nM to 74.81 nM. The sensitivity shows a significant inverse correlation with the proportion of malaria patients from Myanmar. The trend towards higher sensitivity to artemisinin was temporarily interrupted in 1998. This was apparently due to a significant reduction of malaria transmission, especially that of falciparum malaria, and an important proportion of residual reservoir after mefloquine failure.

Key words *Plasmodium falciparum*, Artemisinin, Drug Sensitivity, in vitro, Thailand.

Danksagung Besonderer Dank für harmonische und effiziente Zusammenarbeit gebührt dem Personal des Office of Vector-borne Disease Control, Chiang Mai, der Malariaklinik und der Poliklinik des Provinzkrankenhauses von Mae Hong Son.

Dem Österreichischen Ministerium für Wissenschaft und Verkehr sei für die Mittel gedankt, welche B. W. und C. Z. gestatteten zwischen 1994 und 1997 an der Studie teilzunehmen.

Literatur

1. CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS ANTIMALARIALS (1982):
Clinical studies on the treatment of malaria with qinghaosu and its derivatives.
J. Trad. Chin. Med. 2, 45-50.
2. 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.
3. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
4. TANARIYA, P., et al (2000):
In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum and clinical response to lumefantrine (benflumetol) and artemether.
Br. J. Clin. Pharmacol. 49, 437-444.
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. WONGSRICHANALAI, C., et al (1999):
In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum to artesunate in Thailand.
Bulletin WHO 77, 392-398.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1984):
Advances in malaria chemotherapy.
WHO Tech. Rep. Ser. No.711. WHO, Genf, pp. 126-127.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):
In vitro micro-test 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.
12. ZATLOUKAL, C., et al (1998):
Longitudinale Beobachtungen über die Artemisininempfindlichkeit von Plasmodium falciparum in Thailand.
Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Parasitol. 20, 165-170.

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

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): Woitsch Birgit, Prajakwong Somsak, Wernsdorfer Gunther, Wiedermann Gerhard, Zatloukal Claudia, Wernsdorfer Walther H.

Artikel/Article: [In vitro Untersuchungen über die Artemisininempfindlichkeit von Plasmodiumfalciparum in Mae Hong Son, Thailand, 1994-1999. 95-102](#)