



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Sensibilität von *Plasmodium vivax* gegenüber
Klasse-2- Blutschizontoziden und Artemisinin“

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften an der Universität Wien

| | |
|---|--|
| Verfasserin: | Silvia Gloser |
| Matrikel-Nummer: | 0203169 |
| Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): | A 442 |
| Betreuerin / Betreuer: | Univ.-Prof. Dr. Christa Frank, Prof. Dr. Walther H. Wernsdorfer |
| Wien, im | März 2010 |

Danksagung

Besonders danken möchte ich meinen beiden Betreuern, Herrn Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer und Frau Univ. -Prof. Dr. C. Frank.

Beide halfen mir mit enormer fachlicher Kompetenz und viel Geduld.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, welche mir mit ihrer finanziellen Unterstützung das Studium erleichtert haben.

Abstract

This in vitro response study of *Plasmodium vivax* to artemisinin, atovaquone and desbutyl-benflumentol was performed in Vienna with material from the malaria clinic in Mae Sot (Thailand).

In total, 46 isolates were successfully tested.

The sensitivity pattern shows a log-concentration normal distribution for all three drugs.

The study indicates a significant activity correlation between artemisinin and the two other drugs at the IC-90 and IC-99 of the log-transformed results.

The significant correlation suggests similarities in the mechanism of action between these drugs, and the possibility of multi-drug resistance in the future.

Comparison between the results for artemisinin from the year 2004 and 2007 shows a reduction in drug sensitivity. This also may also indicate the development of manifest resistance against artemisinin in the not too distant future.

The correlation of between the activities of atovaquone and desbutyl-benflumentol was highly significant even for the non-transformed results.

The higher-level ICs for artemisinin are lower than the ICs of the two other drugs which show that *P. vivax* is, on a mol/mol basis, more sensitive to artemisinin than to the two other compounds.

Key Words: *Plasmodium vivax*, Atovaquone, Artemisinin, Desbutyl-Bnflumetol, Drug Sensitivity

*„So oder so - wir haben keine Zeit.
Auch das wirksamste Mittel kann nicht verhindern,
dass der Parasit eine Resistenz entwickelt.
Wir können die Evolution nicht schlagen,
wir können nur versuchen, ihr um eine Nasenlänge voraus zu sein.“*

Dr. Nicholas J. White, Mahidol- Universität, Bangkok

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 10 |
| 1.1 | Allgemeines zur Malaria und Plasmodium vivax..... | 10 |
| 1.1.1 | Historisches..... | 10 |
| 1.1.2 | Fakten zur Malaria..... | 14 |
| 1.1.3 | Übertragung und Krankheitsbild von <i>Plasmodium vivax</i> und Malariainfektionen im allgemeinen..... | 17 |
| 1.1.3.1 | Kreislauf der Übertragung | 17 |
| 1.1.3.2 | Klinischer Verlauf einer <i>Plasmodium vivax</i> Infektion | 19 |
| 1.1.4 | Wird <i>Plasmodium vivax</i> womöglich unterschätzt?..... | 22 |
| 1.1.4.1 | Verbreitungsgebiet von P. vivax | 22 |
| 1.1.4.2 | Temperatortoleranz | 23 |
| 1.1.4.3 | Auftreten gravierender Symptome bei P. vivax | 23 |
| 1.1.4.4 | P. vivax in der Schwangerschaft..... | 23 |
| 1.1.4.5 | Finanzielle Kosten einer P. vivax- Infektion | 24 |
| 1.1.4.6 | Verschleppung von P. vivax | 25 |
| 1.2 | Die Therapie von Malariainfektionen | 26 |
| 1.2.1 | Eine kurzer historischer Rückblick..... | 26 |
| 1.2.2 | Medikamente gegen eine Plasmodien- Infektion..... | 27 |
| 1.2.2.1 | 4- Aminochinoline | 27 |
| 1.2.2.3 | 8- Aminochinoline | 31 |
| 1.2.2.4 | Artemisinin..... | 32 |
| 1.2.2.5 | Atovaquon- Proquanil | 33 |
| 1.2.2.6 | Antibiotika..... | 33 |
| 1.2.2.7 | Kombinationspräparate | 34 |
| 1.2.3 | Rekrudescenz, Rückfall/ Relapse und Reinfektion..... | 35 |
| 1.2.4 | Resistenzen..... | 37 |
| 1.2.5 | Wie entstehen Resistenzen?..... | 40 |
| 1.2.6 | Einige bis jetzt beobachtete Resistenzen bei Malariaparasiten ... | 44 |
| 1.2.6.1 | Chloroquin | 45 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.2.6.2 | Artemisinin/ Artesunat | 46 |
| 1.2.6.3 | Mefloquin..... | 47 |
| 2 | Fragestellung | 48 |
| 3 | Material und Methoden | 49 |
| 3.1 | Study Site: Thailand/Mae Sot | 49 |
| 3.2 | Patienten und die Kriterien zur Aufnahme in die Studie | 53 |
| 3.3 | Die getesteten Präparate..... | 53 |
| 3.3.1 | Artemisinin/ ART..... | 53 |
| 3.3.2 | Desbutyl- Benflumentol/ DBB | 55 |
| 3.3.3 | Atovaquon/ ATO..... | 55 |
| 3.4 | Das in vitro Testverfahren..... | 56 |
| 3.4.1 | Die Entwicklung eines in vitro Verfahrens für Plasmodien..... | 56 |
| 3.4.2 | Ablauf des in vitro Testverfahrens | 57 |
| 3.4.2.1 | Blutentnahme | 57 |
| 3.4.2.2 | Herstellung des BMM und Aufimpfung auf die Mikrotiterplatten .. | 57 |
| 3.4.2.3 | Inkubation..... | 58 |
| 3.4.2.4 | Aufbringen auf Objektträger | 58 |
| 3.4.2.5 | Giemsa- Färbung..... | 59 |
| 3.4.2.6 | Herstellung eines Präinkubations- Slides | 60 |
| 3.5 | Warum in vitro und nicht in vivo? | 60 |
| 3.6 | Differentialdiagnostik/ Unterscheidung der parasitären Stadien | 61 |
| 3.7 | Die Auswertung der Testpräparate | 63 |
| 3.7.1 | Aufarbeitung der Differentialzählungen | 63 |
| 3.7.2 | Ablauf der Probit Datenanalyse | 65 |
| 3.8 | Die statistische Auswertung..... | 67 |
| 3.8.1 | Vergleichsparameter | 67 |
| 3.8.2 | Vergleich der Regressionen | 69 |
| 3.8.3 | Vergleich der Korrelation der einzelnen Medikamente | 70 |
| 4 | Ergebnisse..... | 71 |
| 4.1 | Vergleich und Korrelation | 71 |
| 4.1.1 | Artemisinin/ART..... | 71 |
| 4.1.2 | ART (2007)- ART (2004) | 74 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.3 | Desbutyl- Benflumentol/ DBB | 76 |
| 4.1.4 | Atovaquon/ ATO | 78 |
| 4.1.5 | Korrelation zwischen Artemisinin und Desbutyl- Benflumentol | 80 |
| 4.1.6 | Korrelation zwischen Artemisinin und Atovaquon..... | 81 |
| 4.1.7 | Korrelation zwischen Atovaquon und Desbutyl- Benflumentol | 82 |
| 4.1.8 | Vergleich der geometrischen Mittelwerte der EC Werte aller drei Medikamente (Werte in nM)..... | 82 |
| 5 | Diskussion | 84 |
| 6 | Zusammenfassung | 86 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 88 |
| 8 | Anhang | 99 |
| 9 | Curriculum vitae..... | 109 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Rekrudescenz, Rückfall und Reinfektion (Baird 2004) | 35 |
| Abbildung 2: Resistenzen nach White (45) | 39 |
| Abbildung 3: Landkarte Thailand, der gelbe Stern zeigt die Lage von Mae Sot (62) | 49 |
| Abbildung 4: Aufteilung der Blutstropfen am Slide | 59 |
| Abbildung 5: Zyklus von <i>Plasmodium vivax</i> im Menschen (76) | 61 |
| Abbildung 6: Sensibilität von <i>Plasmodium vivax</i> gegenüber Artemisinin 2007 .. | 73 |
| Abbildung 7: Sensibilität von <i>Plasmodium vivax</i> gegenüber Artemisinin 2004 und 2007 | 75 |
| Abbildung 8: Sensibilität von <i>Plasmodium vivax</i> gegenüber DBB 2007 | 77 |
| Abbildung 9: Sensibilität von <i>Plasmodium vivax</i> gegenüber Atovaquon 2007 .. | 79 |
| Abbildung 10: MCOC aller drei Medikamente | 83 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Schlüsselparameter für Artemisinin aus dem Computerausdruck | 71 |
| Tabelle 2: Schlüsselparameter für Desbutyl- Benflumentol aus dem Computerausdruck..... | 76 |
| Tabelle 3: Schlüsselparameter für Atovaquon aus dem Computerausdruck | 78 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|--|
| A. | <i>Anopheles</i> |
| ACT | auf Artemisinin beruhende Kombinationstherapie |
| ATO | Atovaquon |
| ART | Artemisinin |
| ARMD | accelerated resistance to multiple drugs |
| BMM | Blut-Medium-Mischung |
| CQ | Chloroquin |
| CRPV | Chloroquin- resistente <i>Plasmodium vivax</i> |
| DBB | Desbutyl- Benflumentol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| IC | Inhibitory Concentration (Hemmkonzentration) |
| LTE | Linolsäure, Tween-80, Ethanol (Lösungsmittel) |
| MDR | multi drug resistance |
| msp1 | merozoite-surface-protein-1 |
| ng | Nanogramm |
| P. | <i>Plasmodium</i> |
| PCV | packed cell volume/ Hämatokrit |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| TLR | Toll- like Rezeptor |
| USD | US-Dollar |
| 5FOA | 5- Fluorooroate |

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zur Malaria und Plasmodium vivax

1.1.1 Historisches

Die Menschheit und die Erreger der Malaria durchlebten gemeinsam die Evolution.

Heute geht man davon aus, dass einige, wenn nicht sogar alle Malaria-Erreger ihren Ursprung in West- (*Plasmodium falciparum*) bzw. West- und Zentral-Afrika (*P. vivax*) haben, wobei für *P. vivax* auch ein Ursprung in Südostasien in Frage kommt (1).

Die ältesten Fossilien des Malariavektors (*Anopheles*) wurden auf ein Alter von 30 Millionen Jahre datiert (2).

Untersuchungen zeigten, dass ein in Rhesusaffen (*Macaca nemestrina*) vorkommender Erreger (*P. cynomolgi*) der mit *P. vivax* am nächsten verwandte ist. Man geht davon aus, dass *P. vivax* ursprünglich in nicht- menschlichen Primaten vorkam und durch einen Wirtswechsel in einen Hominiden gelangte. Genetische Analysen zeigten, dass die in Asien vorkommenden *P. vivax* Stämme die bisher ältesten sind, welche gefunden wurden (3).

Laut Nancy Tayles gab es Malariainfektionen in Thailand schon vor 4.000 Jahren, zu diesem Ergebnis kam sie anhand der Analyse von humanen Knochen aus jener Zeit. Diese zeigten Spuren von Anämie, welche eine Auswirkung von chronischer Malaria sein könnten.

In der chinesischen Medizin war die Malaria schon lange vor der christlichen Zeitrechnung bekannt, so wurden bereits in dem medizinischen Werk Nei Ching (datiert auf eine Zeit 2.700 v.Chr.) verschiedene Arten von Fieber erwähnt, welche mit einer Vergrößerung der Milz einhergingen. In diesem Werk werden die drei Dämonen der Malaria beschrieben welche mit

unterschiedlichen Gegenständen (kaltem Wasser, einem Hammer und einem Stein) bewaffnet sind. Man nimmt an dass diese als Symbole stellvertretend für Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Fieber stehen.

Auch in der ägyptischen Kultur spielte die Malaria eine Rolle. Man fand in etwa 3.000 Jahre alten ägyptischen Mumien mit vergrößerten Milzen, welche ein Hinweis auf eine Malariainfektion sein können. Auch im Ebers Papyrus (1.570 v.Chr.) wird Splenomegalie im Zusammenhang mit Fieber erwähnt, dies ist ein weiteres Indiz für eine Malariainfektion (4).

Auch genetische Untersuchungen der Mumien führten zu dem Ergebnis dass Malaria im alten Ägypten weit verbreitet war. Die berühmte Mumie Tutanchamuns zeigte bei der genetischen Analyse DNA des Erregers der Malaria tropica. Diese wurde auch bei anderen Mumien gefunden(5).

Ebenfalls zahlreiche Hinweise auf Malariainfektionen findet man in alten indischen Schriften, vor allem in den Werken Charaka Samhita und Sushruta Samhita, welche zusammen die älteste, noch erhaltene medizinische Literatur Indiens bilden.

In einem späteren medizinischen Werk, der Atharveda (500 v.Chr.), eine der vier Veden, werden die malaria-typischen Fieberschübe sehr genau beschrieben.

Auch das römische Reich wurde regelmäßig von Malaria-Epidemien heimgesucht. Historiker gehen davon aus, dass Malaria einen wesentlichen Einfluss auf den Untergang des Römischen Reiches hatte.

Neuere Funde in Massengräbern nahe Rom aus der Zeit um 50 n.C. konnten DNA-Spuren von *P. falciparum* an Knochenresten nachweisen.

In italienischen Werken wird die sogenannte „mala aria“ oder auch „mal´aria“, ein Einfluss von „schlechter Luft/Wind“ auf den Menschen, erwähnt. Zur damaligen Zeit ging man noch davon aus, dass schlechte Gerüche oder Gase Krankheiten verursachen können (4).

Die durch die Sümpfe entstehenden Ausdünstungen, sogenannte *Miasmen*, galten lange als Ursache der Erkrankung.

Schriften aus einer Zeit rund um 500 n.Chr. zeigen, dass man auf einen Zusammenhang zwischen den Sümpfen und der Fiebererkrankung schloss, jedoch ging man davon aus, dass man durch das Trinken des Wassers erkrankt.

Im ersten Hippokratischen Buch werden epidemische Fieber, darunter vermutlich auch die Malaria, in 8 Klassen eingeteilt. Die hippokratischen Autoren des vierten Jahrhunderts n.Chr. beschreiben genau die Symptome, sowie den Ablauf der Fieberschübe, auch die saisonale Abhängigkeit beim Auftreten des Fiebers war ihnen bekannt.

Teile der Bevölkerung, welche es sich leisten konnten, zogen aus den Regionen mit stehenden Oberflächengewässern weg, die ärmere Bevölkerung hatte diese Möglichkeit jedoch nicht und musste weiterhin jene Gebiete bewohnen.

Der wahre Verursacher der Fiebererkrankungen war zwar noch nicht bekannt, dennoch wurde schon auf einen Zusammenhang mit stehenden Gewässern geschlossen.

Dass es so lange dauerte bis man den wahren Zusammenhang zwischen stehenden Gewässern und der Malaria herausfand beruhte darauf, dass der Erreger im Blut noch nicht nachgewiesen werden konnte und man davon ausging, dass es sich daher um eine Infektion des Darmtrakts handeln müsse (4).

Auch in unseren Breiten war Malaria in früheren Zeiten vertreten, so gelang es im Rahmen einer Dissertation im Knochenmaterial aus dem 15. - 19. Jahrhundert Plasmodien-DNA in einer Probe erfolgreich nachzuweisen. Es war jedoch nicht möglich sie einer bestimmten Art zuzuordnen, was vielleicht am Zerfall des Materials, oder an einer womöglich vorhandenen Mischinfektion lag(7).

Der Historiker Jaime Jaramillo- Arango (1897-1962) beschrieb den Zusammenhang zwischen der blühenden Landwirtschaft, welche von den stehenden Gewässern der Region profitiert und dem Aufkommen von

Fiebererkrankungen, welche ihre Ursache in der von den stehenden Gewässern verursachten, schlechten Luft haben (4).

Erst Charles Alphonse Laveran (1845-1922), ein Militärarzt mit großem Interesse an Mikroben, fand heraus, dass diese Fiebererkrankungen zwar mit den Sümpfen zusammenhängen, aber nicht primär durch sie verursacht sind. Er stellte die Theorie auf, dass ein Keim aus den Feuchtgebieten dafür verantwortlich sei. Durch seine Arbeit beim Militär kam er 1878 nach Algerien und erkannte, dass je nach Grad der Erkrankung eine unterschiedliche Dichte von granulären, dunklen Körperchen im Blut vorhanden ist.

Im Spital in Bône entdeckte er später auch noch andere Stadien im Blut, darunter auch transparente, mit amöboiden Bewegungen und dunklen Einschlüssen.

Die Zusammenhänge erkannte er aber erst am 6. November 1880 im Militärspital in Constantine. Dort entdeckte er im Blut eines Patienten, einen höchst aktiven fadenförmigen Körper, den Gameten, welcher durch die Exflagellation eines männlichen Gametozyten entstanden war, ein Entwicklungsstadium welches normalerweise im Darmtrakt der Anopheles vorkommt.

Er erkannte, dass er den Erreger der Malaria vor sich hatte, welcher zu den Protozoen gehört und nicht, wie früher angenommen, ein Bakterium oder Pilz ist.

Bei späteren Untersuchungen von Sümpfen, in der Hoffnung das Protozoon zu finden, entstand die Idee, dass es sich vielleicht in den Stechmücken befinden könnte, da alle untersuchten Umweltproben negativ waren.

Trotz aller Untersuchungen Laverans blieb die Vorstellung, dass der Verursacher ein Bakterium sei, noch lange weit verbreitet.

Seine Entdeckung blieb jedoch umstritten, da in späteren Untersuchungen fixiertes Blut verwendet wurde, und keine beweglichen Stadien entdeckt werden konnten.

Erst als er Pasteur 1884 zu sich einlud um ihm die beweglichen, mit Flagellen ausgestatteten Protozoen zu zeigen, gelang es ihm auch noch die restlichen Zweifler von seiner Theorie zu überzeugen.

Im Jahre 1886 stellte Camillo Golgi (1843-1926) fest, dass sich dieser Parasit durch Teilung asexuell vermehrt und mit der Lyse der Erythrozyten frei wird (8, 9).

Durch die Entwicklung der Azur-Methylenblau-Eosin Färbung durch Romanowsky im Zuge der Erforschung der Vogelplasmodien wurde es im späten 19. Jahrhundert möglich, die einzelnen Spezies des Parasiten *voneinander* zu unterscheiden.

Im Jahre 1907 wurde Laveran der Nobelpreis für die Entdeckung des Malariaparasiten und die Arbeit an durch Protozoen verursachten Erkrankungen verliehen (8).

In einigen Teilen Europas blieb die Malaria noch lange verbreitet, so zum Beispiel in Italien.

Im Jahr 1945 wurden in Italien noch 411 600 Malariafälle gemeldet, seit 1954 gilt sie in dieser Region allerdings als ausgerottet (6).

Nur durch Trockenlegung von Sumpfgebieten und die konsequente Anwendung von Insektiziden sowie die Behandlung der Malariapatienten konnte die Malaria in Europa im Laufe der Zeit ausgerottet werden.

1.1.2 Fakten zur Malaria

Die Erreger der Malaria gehören zu Klasse der Haematozoa. Darunter versteht man Parasiten mit einem obligaten Wirtswechsel zwischen blutsaugenden Arthropoden und Säugetieren. Ihr sexueller Zyklus, mit Bildung einer diploiden Form, erfolgt im Darmlumen der Arthropoden. Die Endwirte sind die blutsaugenden Arthropoden, die Wirbeltiere fungieren als Zwischenwirte (10).

Es sind über hundert Plasmodienarten bekannt, von ihnen gelten vier als humanpathogen, diese sind:

- *P. malariae* (Verursacher der Malaria quartana),
- *P. ovale* und *P. vivax* (verursachen die Malaria tertiana und
- *P. falciparum* (Erreger der Malaria tropica).

Diese vier Plasmodienarten sind über weite Gebiete des tropischen Afrikas, Südostasien, Indien der pazifischen Inseln sowie Süd- und Mittelamerika verbreitet. *P. malariae* kommt auch in anderen Primaten vor. Zudem können *P. knowlesi* und *P. cynomolgi* gelegentlich auch auf natürliche Weise auf den Menschen übertragen werden (11).

Der Mensch und verschiedene Arten des Genus *Anopheles* sind Bestandteil des Entwicklungszyklus der humanpathogenen Plasmodien (12).

Laut WHO war im Jahr 2008 die Malaria in 109 Ländern endemisch, 45 davon liegen in Afrika (13).

Etwa 40% der Weltbevölkerung leben in malariagefährdeten Regionen (11).

Im Jahr 2006 gab es 881 000 (die echte Zahl liegt zwischen 610 000 und 1 212 000) Tote in Folge von Malariainfektionen. Der Großteil (91%) dieser Todesfälle ereignete sich in Afrika, vor allem Kinder zählen zu den Opfern der Malaria. Die Altersgruppe der unter fünfjährigen Kindern machte 85% der Toten aus (13).

Im Jahr 2008 kam es aufgrund von Malariainfektionen zu rund 863 000 Todesfällen, 89% davon auf dem afrikanischen Kontinent (14).

Laut WHO stirbt alle 30 Sekunden ein Kind an Malaria (15).

Man geht davon aus, dass der *P. vivax* Malaria jährlich 70- 80 Millionen Fälle zugeschrieben werden können. Ein verschwindender Teil der *Vivax*- Fälle kommt in Afrika, südlich der Sahara vor. Der Großteil, 80-90% der Fälle, treten im Mittleren Osten, Asien und im westlichen Pazifik auf (16).

Das Vorkommen der Anopheles Mücke ist an bestimmte geographische Bedingungen geknüpft, somit auch das Auftreten der Malaria. Dazu kommen auch klimatische Anforderungen für die Sporogonie des Parasiten in der Überträgermücke. So ist die Malariaübertragung auf eine Meereshöhe unter 2.500 m für Tropengebiete, bzw. innerhalb der 16°C Sommerisothermen in den restlichen Gebieten beschränkt (17).

Malariainfektionen sind die häufigsten tropischen Parasitosen, in Mitteleuropa ist sie als Reisekrankheit von praktischem Interesse. Auch in Österreich zählt sie zu den wichtigsten importierten Tropenkrankheiten.

Allein im Jahr 2004 wurden 54 Malariafälle gemeldet, davon endete eine Infektion tödlich (Bundesministerium für Gesundheit). In Deutschland wurden 2006 beim Robert Koch Institut sogar 566 Fälle gemeldet (11).

Malaria steht in engem Zusammenhang mit Armut. Im Gegensatz zu anderen Krankheiten, welche als eine Folgeerscheinung von Armut betrachtet werden können, liegen der Malaria andere Zusammenhänge zugrunde. Wenn andere Krankheiten durch bestimmte Maßnahmen verhindert werden können, ist dies bei Malaria schwieriger, da sie auf klimatischen und ökologischen Faktoren beruht. Die Menschen in den betroffenen Regionen können zwar mit Insektennetzen oder anderen Maßnahmen, wie dem Vermeiden von kleineren stehenden Gewässern, Einfluss auf den Vektor nehmen, jedoch nicht in solchem Ausmaß wie dies bei anderen Erkrankungen möglich ist.

Auch in manchen Ländern mit einem höheren pro Kopf Einkommen, wie zum Beispiel Saudi-Arabien, war es bis heute nicht möglich die Malaria auszulöschen. Die Kontrolle der Überträgermücken bedarf einer perfekt

funktionierenden Organisation (z.B. beim Monitoring aller stehenden Gewässer) und der dafür benötigten finanziellen Mittel.

Bei Ländern in denen die Malaria ausgerottet wurde, konnte man ein deutlich schnelleres wirtschaftliches Wachstum beobachten als bei ihren Nachbarländern, wo eine effektive Vektorbekämpfung noch nicht gelungen ist. Der vermutete Einfluss von Malariainfektionen auf das wirtschaftliche Wachstum ist groß, die einzelnen beteiligten Abläufe sind jedoch noch unklar (18).

1.1.3 Übertragung und Krankheitsbild von *Plasmodium vivax* und Malariainfektionen im allgemeinen

1.1.3.1 Kreislauf der Übertragung

Bei den Plasmodien unterscheidet man zwischen einer ungeschlechtlichen und einer geschlechtlichen Entwicklung und Vermehrung.

Im Menschen findet die Schizogonie, die ungeschlechtliche Vermehrung und in der Anopheles die geschlechtliche Entwicklung, die Sporogonie, statt. Somit dient der Mensch als Zwischenwirt und die Anopheles als Endwirt.

Die Verbindung zwischen diesen beiden Zyklen stellt die Blutmahlzeit der weiblichen Anopheles dar. Sie benötigt das Blut für die Eireifung und nimmt während des Saugens entweder die im Menschen herangewachsenen Gametozyten auf, oder gibt die Sporozoiten ab, welche sich in der Anopheles entwickelt haben (12).

Zum Orten ihrer Wirte nutzen Stechmücken vor allem den im menschlichen Schweiß enthaltenen Duftstoff „4-Methylphenol“, sie können ihn noch auf eine Entfernung von bis zu zwei Kilometern orten.

Der Mensch wird mit den für ihn infektiösen Stadien (Sporozoiten) der Plasmodien durch den Stich infiziert.

In den Stechmücken siedeln sich die Sporozoiten in den Speicheldrüsen an und gelangen beim Saugakt in die humane Blutbahn, wo sie innerhalb von 30 Minuten in die Leberzellen des Wirts eindringen. Durch diese Strategie können sie dem Immunsystem entkommen (11).

In den Speicheldrüsen der Anophelen können Sporozoiten von *P. vivax* bei geeigneten klimatischen Verhältnissen bis zu 50 Tage überleben, was einen breiten Zeitraum für die Infektion eines Zwischenwirts darstellt (6).

Die Sporozoiten reifen zu Gewebeschizonten, welche nach ein bis zwei Wochen Reifephase je bis zu 10 000 Merozoiten (bei *P. falciparum* 30 000 Merozoiten) freisetzen, welche nun Erythrozyten befallen (11).

Die mit *P. vivax* befallenen Erythrozyten zeigen eine rosa Tüpfelung, welche als *Schüffnersche Tüpfelung* bekannt ist (6).

Die Merozoiten ernähren sich vom Hämoglobin der roten Blutkörperchen und teilen sich in ihnen. Dieser Vorgang wird als erythrozytäre Schizogonie bezeichnet. Nach einer für *P. vivax* (und *P. ovale*) typische Zeitspanne von 48 Stunden lysieren die befallenen Erythrozyten und durch die frei gewordenen Merozoiten werden weitere Erythrozyten befallen.

Ein Teil der Merozoiten entwickeln sich zu Gametozyten welche schließlich Anophelen infizieren können. Sie werden beim nächsten Saugakt von der Anopheles aufgenommen und reifen im Darm der Mücke zu Gameten, der männliche Mikrogamet penetriert den weiblichen Makrogameten und eine Zygote entsteht.

Diese verändert ihre Form, wird länglich und motil und wird in diesem Stadium als Ookinet bezeichnet, dieser durchwandert das Darmepithel und bleibt unter der peritrophen Membran liegen und reift dort zur Oozyste. In der Oozyste reifen Sporozoiten, welche wiederum in die Speicheldrüse der Anopheles-

Mücke wandern und dort zur Infektion eines menschlichen Wirtes bereit sind, wodurch sich der Kreislauf der Entwicklung schließt (11).

1.1.3.2 Klinischer Verlauf einer *Plasmodium vivax* Infektion

Im Blut befällt *P. vivax* ausschließlich Retikulozyten. Dies sind die sehr jungen Erythrozyten, welche ein bis zwei Prozent der roten Blutkörperchen ausmachen (10).

Das Auftreten erster Symptome kann bei einer *P. vivax* Infektion einen Zeitraum von neun bis zwanzig Tagen, aber auch mehrere Wochen, bis hin zu Monaten betragen.

Die Parasitämie ist im Allgemeinen niedrig und liegt gewöhnlich unter ein bis zwei Prozent (19).

Die Inkubationszeit kann sogar bis zu fünf Jahre dauern. Dies kann vorkommen, wenn die Infektion mit geringen Zahlen von Sporozoiten erfolgt und diese ausschließlich Hypnozoiten bilden, d.h. Formen welche nicht unmittelbare Leberschizogonie auslösen. Sie bleiben latent in Hepatozyten liegen und bilden erst nach längerer Verweilzeit Leberschizonten aus. Die Inkubationszeit erscheint dadurch verlängert und der erste Fieberanfall ist daher *de facto* bereits der erste Rückfall (Relaps) (12).

Die für die Infektion typischen Fieberschübe sind von Kopf- und Gliederschmerzen begleitet. Vor allem bei Kindern können sie zu Koma und Tod führen.

Die Fieberschübe entstehen durch den zyklischen Zerfall von parasitierten Erythrozyten, dabei werden nicht nur Parasiten frei, sondern auch ihre Stoffwechselprodukte, welche für die Fieberschübe verantwortlich gemacht werden. Ein weiterer Grund für das bei der Malaria typische Fieber könnte eine Rektion auf die DNA der Plasmodien sein.

An der Erkennung der Malariaparasiten ist, wie auch bei anderen Parasiten, die Familie der Toll- like Rezeptoren(TLR) beteiligt.

Sobald diese durch Pathogene aktiviert werden führen sie zu einer verstärkten Synthese von Prostaglandinen, welche die Thermoregulation umstellen und somit Fieber auslösen, sowie zu einer Freisetzung von Zytokinen, welche Entzündungsmediatoren sind.

Einige dieser TLR liegen an der Zelloberfläche und erkennen die Zellwandkomponenten von Mikroorganismen, andere sitzen in der intrazellulären Membran und binden DNA. Zu den letzteren zählt auch TLR 9, welches an der Auslösung des Fiebers bei Malaria beteiligt zu sein scheint. TLR 9 wird durch Plasmodien-DNA, welche an Hämozoin gebunden ist, aktiviert.

Hämozoin, auch als Malariapigment bezeichnet, ist das Abfallprodukt der Hämoglobinspaltung. Es ist eine kristalline, polymerisierte und nicht toxische Form des Häm-Teils welcher durch die Spaltung von Hämoglobin entsteht. Der bei der Hämoglobinspaltung ebenfalls frei werdende nicht toxische Proteinanteil dient den Parasiten als Energielieferant. Hämozoin schleust, als eine Art Trägersubstanz, die Plasmodien- DNA in die Endosomen ein. Nur so kann die Parasiten DNA mit dem intrazellulär gelegenen TLR 9 in Kontakt kommen.

Auch Medikamente können die Fieberreaktion auf die Infektion beeinflussen. So behindert Chloroquin einerseits die Bildung von Hämozoin, andererseits wirkt es aber auch in den Endosomen und kann dort mit aktivierten Prozessen interferieren (20).

Während der ersten Fieberschübe kann es sein, dass noch der typische Rhythmus fehlt, da die Schizontenreifung noch nicht ausreichend synchronisiert ist. Der Rhythmus stellt sich meist nach einer Woche ein. Der Primäranfall (das erste Fiebergeschehen) kann schleichend kommen, aber auch plötzlich hochakut auftreten (12).

Der rasche Anstieg der Körpertemperatur führt zu heftigem Schüttelfrost. Hinzu kommen noch Initialsymptome wie Kopf- und Gliederschmerzen sowie allgemeines Unwohlsein, Frösteln und häufig Übelkeit.

Differentialdiagnostisch können insbesondere falsch interpretierbare Symptome vorhanden sein, unter anderem Hautausschlag, Schwellung der Lymphknoten oder auch respiratorische Symptome. Daher kann es leicht zu einer Verwechslung mit einem grippalen Infekt oder Pneumonie kommen (19).

In manchen Fällen entsteht auch ein Herpes labialis. Schon beim ersten Fieberschub kommt es zum Anschwellen der Milz, sie ist aber erst frühestens eine Woche nach Krankheitsbeginn unter dem Rippenbogen deutlich tastbar und druckempfindlich (12).

Bei *P. vivax* und *P. ovale* treten die späteren Fieberschübe mit Abständen von 48 Stunden auf, d.h. am ersten Tag und am dritten, etc., daher auch der Name Malaria tertiana. Sie sind mit der Synchronisierung des Schizogoniezyklus, welcher bei *P. vivax* innerhalb 48 Stunden abläuft, verbunden.

Die Fieberstadien haben eine Dauer von drei bis vier Stunden. In einigen Fällen kann es aber auch zu täglichen Fieberschüben kommen, dies kann durch eine Überlagerung zweier Parasitenpopulationen, einer Doppelinfektion, zustande kommen, dies kommt aber eher selten vor (19).

Während der Fieberschübe kommt es zu einer Erhöhung des Blutdrucks und heftigem Schüttelfrost. Der Patient ist blass und seine Körpertemperatur steigt rasch an. Innerhalb einer Stunde kann die Temperatur auf 40 bis 41°C ansteigen.

Die Fieberphase kann bei der Malaria tertiana bis zu 18 Stunden anhalten. Gewöhnlich beginnt die Temperatur ein bis zwei Stunden nach Auftreten des Anfalls wieder zu sinken und erreicht innerhalb von 4-6 Stunden wieder Normalwerte. Während dieser Phase kommt es anstatt des Kältegefühls zu einem Hitzempfinden. Dabei beginnt sich die Haut zu röten und schmerzt. Weitere Symptome in dieser Phase sind Übelkeit und starke Kopf- und Gliederschmerzen. Nach mehreren Fieberschüben kann man einen Milztumor ertasten. Auch den Leberrand kann man schon recht früh in einem Abstand von ein bis zwei Fingern unter dem Rippenbogen fühlen.

Auch im Blutbild sind Veränderungen bemerkbar. Zu Beginn der Infektion zeigt sich eine mäßige Leukozytose (Vermehrung von Leukozyten) und eine

Linksverschiebung. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Leukopenie (einem Mangel an Leukozyten) mit relativer Lympho- und Monozytose (Anstieg der Lymphozyten und Monozyten) (12).

Wenn die Infektion nicht behandelt wird kann sie drei bis acht Wochen, aber auch länger, mit positivem Blutbefund anhalten (19).

Gegen Ende werden die Fieberattacken zunehmend schwächer und hören gewöhnlich nach 10 bis 20 Anfällen ganz auf (12).

Generell verläuft die Malaria tertiana weitaus weniger gefährlich als eine Malaria tropica, welche durch *P. falciparum* verursacht ist wird und auch als "böartige" (maligne) Malaria bezeichnet wird.. Bei dieser Infektion kann es zu schwerwiegenden Komplikationen wie zerebrale Malaria, Niereninsuffizienz, Hämorrhagien und Kreislaufschocks kommen (19).

1.1.4 Wird *Plasmodium vivax* womöglich unterschätzt?

Lange wurde die Vivax-Malaria vernachlässigt, da sie als „harmlose“/ benigne Form der Malaria angesehen wird (21).

Im Anschluss sind einige Punkte genannt, die zeigen sollen, dass auch eine *Plasmodium vivax* Infektion nicht zu unterschätzen ist.

1.1.4.1 Verbreitungsgebiet von *P. vivax*

P. vivax kommt im gesamten Verbreitungsraum der Malaria vor, vermehrt aber in Indien, Südostasien und Südamerika (11).

Von allem Malaria verursachenden Plasmodien ist *P. vivax* das geographisch am weitesten verbreitete, da es auch in Regionen mit gemäßigttem Klima vorkommen kann (22).

1.1.4.2 Temperaturtoleranz

P. vivax kann unter ungünstigeren Bedingungen bestehen als *P. falciparum*, da es temperaturtoleranter ist (Regionen innerhalb der 16°C Sommerisothermen) (16).

Die in der Mücke ablaufende Zeitspanne der Sporogonie hängt von der Außentemperatur ab. Wenn tropische Bedingungen (um die 28°C) gegeben sind benötigen *P. falciparum* und *P. vivax* mindestens acht Tage, liegen die Temperaturen jedoch bei 20°C benötigt *P. vivax* für die Sporogonie bis zu zwei Wochen, und *P. falciparum* bis zu fünf Wochen. Ein temperaturbedingtes Limit der Sporogonie erreicht *P. vivax* bei unter 16°C und *P. falciparum* schon bei unter 20°C (6).

1.1.4.3 Auftreten gravierender Symptome bei *P. vivax*

Es zeigte sich, dass *P. vivax* in manchen Fällen, genauso wie *P. falciparum* zu gefährlichen klinischen Symptomen wie einer Beeinträchtigung der Lunge, spontanen Milzruptur und in Einzelfällen auch zu zerebraler Malaria, welche sonst eigentlich *P. falciparum* zugeschrieben wird, führen kann.

Dies kann im schlimmsten Fall mit dem Tod enden.

Warum und unter welchen Umständen diese Symptome bei einer *P. vivax*-Infektion auftreten ist nicht geklärt (16).

1.1.4.4 *P. vivax* in der Schwangerschaft

Während einer Schwangerschaft scheint *P. vivax* nicht so extreme Auswirkungen zu haben wie *P. falciparum*. Im Gegensatz zu *P. falciparum* setzen sich die mit *P. vivax* infizierten Erythrozyten nicht im Gefäßbereich der inneren Organe und des Gehirns fest. Somit ist die Plazenta auch nicht so stark betroffen wie bei *P. falciparum*. Der negative Einfluss einer *P. vivax* Infektion auf

eine bestehende Schwangerschaft liegt möglicherweise in der Anämie, einer bekannten Folge chronischer Infektion mit *P.vivax* (16).

1.1.4.5 Finanzielle Kosten einer *P. vivax*- Infektion

Nicht zu vernachlässigen sind die Kosten die für einen Erkrankten durch eine *P. vivax*- Infektion entstehen.

Vor allem in der Agrarwirtschaft, wo die Aussaat mit der Regenzeit, in welcher auch die *P. vivax* Infektionen auftreten, verbunden ist, führt eine Malariainfektion zu finanziellen Einbußen. Aber auch Schulkinder sind von immer wiederkehrenden Beeinträchtigungen betroffen, wie sie durch die Malariainfektionen verursacht werden.

Malaria kann zu einer Benachteiligung in der Ausbildung, einem damit verbundenen geringeren Einkommen, einer Einschränkung der Lebensqualität und einer im Allgemeinen kürzeren Lebenserwartung führen (16).

Morel *et al.* (23) zeigten anhand von Studien im Nordwesten der Provinz Ninh Thuan (Vietnam), dass während einer Malaria-Saison auf den Haushalt eines Patienten durchschnittliche Kosten von 11,79 USD zukommen. Diese entstehen vor allem durch den Ausfall am Arbeitsplatz und einem damit verbundenen Ausfall des Einkommens, während die Therapie und die Anreise zum Behandlungsort nur 6% der Gesamtkosten betragen. Dies kann in einem Haushalt zu einem finanziellen Problem werden, wenn mehrere Mitglieder der Familie innerhalb eines Jahres erkranken. Gezeigt wurde dies anhand der Raglays Gemeinschaft, einer traditionell nomadisch lebenden Minderheit, welche sich wegen ihrer Lebensweise (sie leben von Agrarwirtschaft) häufig im Wald aufhält und daher auch häufig Kontakt mit den silvatischen Moskitos hat. Der Großteil der Bevölkerung lebt vom Verkauf von Agrarprodukten oder von Nutztieren. Die Malaria fällt in die Regenzeit, welche auch die Hauptzeit für die Agrarwirtschaft ist.

1.1.4.6 Verschleppung von *P. vivax*

Malaria tritt in letzter Zeit auch wieder in Ländern auf, in denen sie eigentlich seit Jahrzehnten als ausgerottet gilt, was sich durch die Einschleppung aus anderen Ländern erklären lässt.

Ein Beispiel dafür ist Usbekistan. In der Region Surkhandarya, galt die durch *P. vivax* verursachte Malaria seit 1961 als ausgerottet. Durch ein Wiederaufflammen der Infektion in den Nachbarstaaten und eine vermehrte Migration kam es zur Verschleppung der Malaria von Tajikistan nach Usbekistan und führte dort zu einem erneuten Auftreten von Malariafällen. Mittels einer molekularbiologischen Untersuchung wurde im Sommer 2002 das Oberflächenprotein der Merozoiten (*m*sp-1) von 24 *P. vivax* Isolaten verglichen. Von den Proben stammten 12 von autochtonen und 12 von eingeführten Malaria Fällen. Es zeigten sich erhebliche genetische Unterschiede zwischen den autochtonen und den eingeführten Stämmen. Man geht davon aus, dass drei in der Region vorkommende Anophelesarten (*A. superpictus*, *A. pulcherrimus*, *A. hyrcanus*) als regionale Vektoren für die endemische *P. vivax* Übertragung fungieren können (24).

Ähnliches geschah auch in der Republik Korea, welche 1979 malariafrei erklärt wurde. Bis zu dem Jahre 1993 trat *P. vivax* in der ROK (Republic of Korea) nicht mehr auf. In der entmilitarisierten Zone, welche Südkorea (ROK) von der demokratischen Volksrepublik Korea (DPRK) trennt, zeigten sich die ersten *P. vivax* Fälle seit langer Zeit. Auch das Risiko der lokalen Übertragung ist gestiegen. Auch die ersten Fälle von Chloroquin-resistentem *P. vivax* aus dem klimatisch gemäßigten Asiens, wurden aus der ROK Region gemeldet (25).

1.2 Die Therapie von Malariainfektionen

1.2.1 Eine kurzer historischer Rückblick

Auch in früheren Zeiten versuchte man schon Malariainfektionen zu behandeln. Im antiken China bemühte man sich sie mittels Akupunktur, Exorzismus und Moxibustion (Erwärmung von speziellen Punkten) zu kurieren, aber auch Pflanzen wurden zur Behandlung eingesetzt, unter anderem auch Chang-Shan (*Dichroa febrifuga*).

Diese Pflanze ist in China seit 2000 Jahren dafür bekannt dass sie gegen Fiebererkrankungen hilft. Laut Zhao erzielt man bei in vitro und in vivo Versuchen, anhand experimentellen Malariainfektionen, eine mit Chloroquin vergleichbare Wirkung. Aber auch eine andere Pflanze (*Pasta ulmi*) aus der traditionellen chinesischen Medizin, zeigte in vitro eine gute Wirksamkeit gegen *P.falciparum* (26, 27).

Vor mehr als 350 Jahren wurde in Südamerika das Pulver der Rinde des Cinchonabaumes (*Cinchona peruviana*) gegen Fiebererkrankungen verwendet (11).

Der Cinchona Baum wächst an den Hängen der südamerikanischen Anden in einem feuchten Klima. Jesuiten erhielten damals Information über die Heilkraft der Rinde. Bis dahin wussten nur die Inkas der Region über die heilende Wirkung Bescheid. Im Jahre 1640 gelangte Chinin nach Europa und das Pulver der Rinde bekam den Namen Jesuitenpulver (6).

Das Alkaloid Chinin wurde aus der Borke 1820 isoliert und seither in reiner Form als wirksames Medikament gegen die Malaria verwendet.

Die ersten synthetischen Malariatherapeutika entstanden durch die Abwandlung von Farbstoffen. Den Ursprung dafür bildete Methylenblau, von welchem Ehrlich (1891) vermutete, dass es wegen seiner guten Färbung von Malariaerregern wohl eine Toxizität gegen diese haben könnte. Durch die

Veränderung der Farbstoffe entstanden Substanzen wie Plasmochin und Atebrin, welches allerdings zu einer gelblichen Verfärbung der Haut führt. Weitere Forschungen führten zu Resochin(1934) und dem mit ihm verwandten Sontochin (1936).

Resochin (ein 4-Aminochinolin) wurde anfangs als zu toxisch eingeschätzt, seine Erforschung wurde aber später wieder aufgenommen und es wurde unter dem Namen Chloroquin bekannt.

Chloroquin wurde nach 1950 wegen seiner einfachen Anwendung und der guten Wirksamkeit und Verträglichkeit, sowie dem niedrigen Preis zum bedeutendsten Malariamedikament. Es war auch einer der Gründe, weshalb die Malaria in einigen Gebieten ausgerottet werden konnte. Im Laufe der Zeit kam es aber zu resistenten *P. falciparum* Stämmen, welche die Bedeutung von Chloroquin einschränkten (11).

1.2.2 Medikamente gegen eine Plasmodien- Infektion

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Medikamentenklassen erwähnt und einige, bedeutende Vertreter genauer beschrieben.

1.2.2.1 4- Aminochinoline

Sie zeichnen sich durch eine basische Seitenkette in der 4er- Position des Chinolinrings, sowie einen Chlorsubstituenten in der 7er- Position des Chinolinrings aus. Obwohl diese Medikamentengruppe seit über 60 Jahren für die Malariatherapie verwendet wird ist ihr Wirkmechanismus noch nicht ganz klar. Vertreter dieser Medikamentenklasse sind unter anderem Chloroquin und Amodiaquin (11).

- Chloroquin

Für lange Zeit war Chloroquin das Therapeutikum der Wahl zur Behandlung einer *P. vivax* Infektion und ist es noch in den meisten endemischen Gebieten

Chloroquin wirkt auf die den Hämoglobinabbau der Parasiten. Durch die Hämpolymerase wird, wie bereits erwähnt, das toxische Häm zu Hämozoin umgebaut. Durch die Verhinderung dieses Schrittes kommt es zur Ansammlung der für die Parasiten toxischen Stoffe (28).

In den letzten Jahrzehnten kam es zunehmend Resistenzfällen gegenüber Chloroquin im subäquatorialen Raum zwischen Indik und Pazifik.

Rieckmann *et al.* zeigten 1989 am Beispiel zweier Soldaten aus Australien, welche trotz einer auf Chloroquin basierenden Chemoprophylaxe mit Symptomen und Parasiten im Blut von Papua Neuguinea nach Australien zurückkehrten - eines der ersten Beispiele, dass Chloroquin nicht mehr effektiv auf *P.vivax* wirkt. Bei einem der beiden Soldaten ging die Parasitämie auch nach einer Therapie mit Chloroquin nicht vollständig zurück (29).

CRPV (Chloroquin-resistentes *P. vivax*) ist im Begriff ein Problem der Wissenschaft und des Gesundheitswesens zu werden (30).

Von der WHO wird empfohlen Chloroquin in den Regionen zu verwenden, welche noch keine Chloroquin Resistenz aufweisen, in jenen mit Resistenz soll auf eine geeignete, auf Artemisinin basierende Kombinationstherapie(ACT), zurückgegriffen werden (14).

So wie dies in folgendem Beispiel der Fall war:

Im westlichen Indien (Anand), einer Region in welcher *P.vivax* häufiger vorkommt als *P.falciparum*, zeigte sich dass es Hinweise für chloroquinresistente *P. falciparum* und *P. vivax* Erreger gibt. Diese Ergebnisse führten zu einer Änderung der Therapie, so wird jetzt statt Chloroquin ein Artemisinin- Kombinationstherapie im Falle einer *P. falciparum*- Infektion verordnet. Bei *P.vivax* Fällen blieb die Therapie gleich, da es weniger häufig Resistenz zeigte, aber auch diese Fälle werden als Warnung für eine Überwachung der Medikamentensensibilität verstanden (31).

- Amodiaquin

Amodiaquin ist eine Mannich-Base und hat im Gegensatz zu Chloroquin eine deutlich lipophilere Seitenkette aufgrund einer Phenylsubstitution an der 4er Position des Chinolinkerns. Die aromatische Seitenkette dürfte auch der Grund für die reduzierte Affinität von Amodiaquin zum Chloroquin-Resistenz-Transporter (Pvcrt) sein. Daher ist es noch in vielen von Chloroquinresistenz betroffenen Gebieten wirksam (11).

- Piperaquin

Bei diesem Medikament sind zwei 4-Aminochinoline über eine Verbindungskette miteinander verknüpft. Es wurde in China entwickelt und vor allem in Südostasien verwendet, wo sich mittlerweile auch Resistenzen gezeigt haben. Gegen Stämme afrikanischer Herkunft ist es aber noch einsatzfähig. Allerdings gibt es Hinweise auf Kreuzreaktionen zwischen Chloroquin und Piperaquin (11).

1.2.2.2 Arylaminoalkohole

Sie alle weisen als gemeinsames Element ein mehr oder weniger lipophiles, aromatisches System, eine sekundäre oder tertiäre Aminogruppe und einen Alkohol auf.

- Chinin

Chinin gilt als das erste Präparat in dieser Gruppe. Es wurde, wie bereits erwähnt, schon 1820 zur Therapie der Malaria verwendet und ist auch heute noch ein wichtiges Therapeutikum. Die anderen Medikamente dieser Gruppe können als strukturell vereinfachte Analoga zu Chinin aufgefasst werden. Vor allem in Afrika erweist sich Chinin noch als sehr wirksam. Die Wirkung von

Chinin kann durch eine Kombination mit Clindamycin noch gesteigert werden (11).

- Mefloquin

Mefloquin wurde bereits 1985 zur Behandlung chloroquinresistenter *P. falciparum* Stämme entwickelt, da Stämme welche eine durch Genmutation bedingte Resistenz (K76T Mutation im *pfcr*-Gen) gegenüber Chloroquin zeigen, besonders auf Mefloquin ansprechen (11).

Mefloquin zeigt aber auch eine schizontozide Wirkung bei *P. vivax*. Durch seine hohe Proteinbindung hat es eine lange Verweildauer im Körper (28).

Studien von Maguire und seinen Kollegen zeigten, dass für die Behandlung einer akuten Vivax-Malaria Mefloquin als Blutschizontozid und eine anschließende Medikation mit Primaquin zur Eliminierung der Hypnozoiten besonders geeignet sind. Mefloquin führt zur Heilung bei 99,6%igen der Patienten. Primaquin verringert das Risiko eines Rückfalls sowie eine weitere Übertragung über Anophelen.

Es ist eine Alternative für jene Regionen in welchen Chloroquin immer noch als Therapeutikum der Wahl gilt, da sich im Gegensatz zum Chloroquin bisher bei *P. vivax* noch keine Resistenzen gegen Mefloquin zeigten (32).

Es ist vor allem auch für die Chemoprophylaxe ein sehr beliebtes Medikament, da es aufgrund seiner lange Halbwertszeit nur einmal wöchentlich eingenommen werden muss, es kann jedoch zu schweren neuropsychiatrischen Nebenwirkungen kommen (11).

- Halofantrin

Ist ein weiteres Blutschizontozid und wirkt nur auf die erythrozytären Stadien, die Leberformen können damit nicht beeinflusst werden. Seine Wirkungsweise beruht auf einer Verbindung mit Ferriprotoporphyrin IX, welches während des Abbaus des Hämoglobins von den Parasiten gebildet wird. Der durch die Verbindung entstehende Komplex beschädigt die Zellmembran und führt so zur Lyse des Erregers (33).

Da es bei der Behandlung jedoch zu Komplikationen in Form von tödlichen Herzrhythmusstörungen kommen kann, ist Halofantrin in westlichen Ländern nicht mehr erhältlich (11).

- Lumefantrin

Ist Halofantrin strukturell ähnlich, jedoch sehr viel besser verträglich. Da es eine sehr lipophile Substanz ist, kann es in seiner Bioverfügbarkeit stark schwanken. Die Resorption hängt sehr stark von der Nahrungsaufnahme ab, in Kombination mit fettreicher Nahrung kann die Resorption um den Faktor 16 zunehmen.

1.2.2.3 8- Aminochinoline

Sie leiten sich von den Methylenblauderivaten ab. Ihr Kennzeichen ist die Aminoalkylkette in der 8er- Position des Chinolinrings und eine Methoxygruppe in der 6er- Position.

In dieser Gruppe wäre vor allem Primaquin zu erwähnen.

- Primaquin

Das besondere an diesem Präparat ist, dass es als einziges gegen die latenten Leberstadien (Hypnozoiten) des Parasiten wirkt. Es ist das einzige Medikament

welches man gegen die hepatischen Dauerformen bei *P. vivax* und *P. ovale* einsetzen kann.

Allerdings zeigt es nur eine geringe Wirkung auf die erythrozytären Formen (11).

Jedoch wurde auch ein Fall dokumentiert, der auf eine mögliche Resistenz gegenüber Primaquin schließen lässt. Ein 77jähriger Mann welcher nach seiner Rückkehr aus Brasilien Malaria- Symptome und *P. vivax* in Bluttests zeigte wurde mit Chinin, Doxycyclin und einer anschließenden Primaquin-Therapie behandelt. Nach dieser Behandlung zeigte er keine Symptome mehr, in den kommenden fünf Monaten hatte er, trotz keines weiteren Auslandsaufenthaltes, wieder Symptome. Anhand von Blutbefunden zeigte sich ein Rückfall von *P. vivax*. Er bekam wieder eine Therapie, diesmal mit Chloroquin und anschließend wieder Primaquin, doch zeigte er nach vier Monaten wieder Symptome. In Blutausstrichen fand man wieder *P. vivax*. Da nicht nur Chloroquin gegeben wurde kann man eine Chloroquinresistenz als Ursache für diesen Fall ausschließen. Die Primaquindosis war doppelt so hoch(10,8mg/kg) wie normal. Man muss somit von einem Primaquin-Versager oder sogar von einer Resistenz ausgehen (34).

1.2.2.4 Artemisinine

Auf Artemisinin wird weiter unten im Text genauer eingegangen, da es zu den von mir im Zuge dieser Arbeit getesteten Medikamenten zählt.

- Artemether

Artemether eignet sich nicht für die Behandlung von komplizierter Malaria, da der maximale Blutspiegel dafür zu gering ist und die intramuskuläre Gabe nur zu einer langsamen und unzuverlässigen Adsorption führt.

Es ist als Präparat in fixer Kombination mit Lumefantrin erhältlich.

- Artesunat

Artesunat kann sowohl intramuskulär, oral oder auch rektal verabreicht werden. Der intravenösen Applikation steht sein rascher Zerfall in der Injektionsflüssigkeit entgegen. Es ist der am häufigsten verabreichte Kombinationspartner bei einer oralen ACT (Artemisinin combined therapy).

1.2.2.5 Atovaquon- Proguanil

Atovaquon-Proguanil Präparate sind sehr effektiv gegen eine akute *P. vivax*-Infektion. Jedoch sind diese sehr teuer und eher Touristen vorbehalten (35).

Der Wirkmechanismus von Atovaquon beruht auf einem Eingreifen in die Nucleinsäuresynthese, genauer in die *de novo* Pyrimidinsynthese (Herstellung von Pyrimidinnucleotiden aus einfacheren Molekülen). Dieser Vorgang kommt im Menschen nicht vor und ist bei Protozoen sehr sensibel, da sie vorgefertigte Pyrimidine nicht absorbieren können.

Proguanil dient gewöhnlich als Prodrug. Darunter versteht man Substanzen, welche selbst nur eine geringe Wirkung haben, durch Metabolisierung aber wirksam werden. In der Kombination mit Atovaquon beruht die Wirkungssteigerung jedoch auf Proguanil selbst und nicht jener des Metaboliten (28).

1.2.2.6 Antibiotika

Sie eignen sich vor allem als Kombinationspartner mit schnell wirkenden Malariamedikamenten (11).

Antibiotika greifen in den Proteinbiosyntheseapparat der Apikoplasten ein. Unter Apikoplasten versteht man die stark reduzierten Plastiden der parasitischen Apicomplexa (36). Als Beispiel wäre hier Doxycyclin zu erwähnen.

- Doxycyclin

Verhindert durch Bindung an die 16s RNS, der kleinen Untereinheit der Ribosomen, die Rotation in die korrekte Position. Dies führt wiederum zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese (11).

1.2.2.7 Kombinationspräparate

Sie dienen zum Vermeiden von Resistenzen. Die Theorie dahinter ist nicht neu und wurde auch in anderen Bereichen der Medizin schon erfolgreich eingesetzt, wie z. B. bei der Behandlung von Tuberkulose und HIV.

Wenn zwei Medikamente eine unterschiedliche Wirkweise haben, dann dürften auch unterschiedliche Mechanismen der Resistenzentwicklung vorliegen. Es ist durchaus möglich dass der Parasit Resistenz gegen eines der Medikamente entwickelt, aber gegen beide ist es eher unwahrscheinlich.

Die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung gegen beide Medikamente ist das Produkt der Wahrscheinlichkeit gegen jeden Partner.

Wenn zum Beispiel einer von 10^{12} Parasiten eine Resistenz gegen Medikament A entwickeln kann und einer von 10^{12} eine gegen Medikament B, dann ist die Wahrscheinlichkeit der Resistenz gegen A und B einer unter 10^{24} .

Die Problematik bei der Kombinationstherapie liegt darin, die Patienten von der Notwendigkeit der korrekten Einnahme der Medikamente zu überzeugen. Bei Tuberkulosemedikamenten kam es nicht selten vor, dass nur eine Komponente der Kombinationstherapie eingenommen wurde. Oft liegt dies an der Furcht vor Nebenwirkungen eines der beteiligten Präparate (37).

Eine wichtige Rolle bei Medikamenten spielt die Halbwertszeit, d.h. jenem Zeitraum in dem es im Körper als bioaktive Substanz verweilt. Es hat sich gezeigt, dass es bei Kombinationspräparaten sinnvoll ist solche mit verschiedenen langen Halbwertszeiten zu kombinieren (38). Rückfall und Resistenzen

1.2.3 Rekrudescenz, Rückfall/ Relapse und Reinfektion

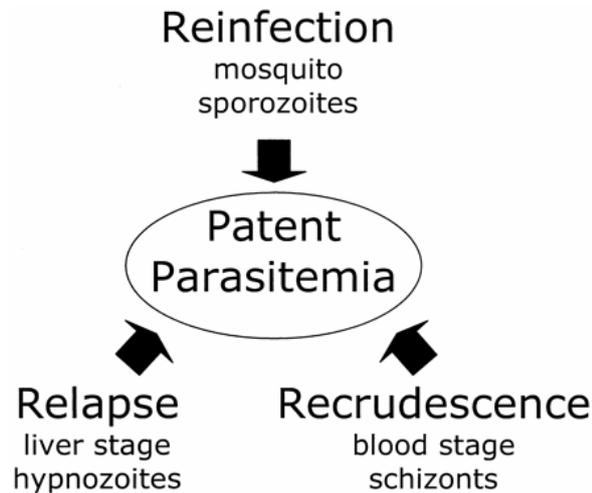


Abbildung 1: Rekrudescenz, Rückfall und Reinfektion (Baird 2004)

Wenn die Parasitämie trotz Behandlung nicht zurückgegangen ist kann dies verschiedene Ursachen haben: ein Rückfall aufgrund von Leberschizonten, eine erneute Infektion durch einen Mosquito (Reinfektion) oder eine erneute Intensivierung der Krankheitssymptome (Rekrudescenz) durch asexuelle Blutstadien welche die Therapie überlebten (30).

Ein Rückfall wird auch als Relaps bezeichnet (39).

Der Rückfall ist ein wichtiger Aspekt der Malaria tertiana (*P. vivax* und *P. ovale* Infektionen). Die in der Leber, über Monate oder auch Jahre verbleibenden, Hypnozoiten reifen durch einen bestimmten Stimulus heran und führen zu einem Rückfall.

Primaquin hemmt das Risiko einen Rückfalls, das ohne dieses Medikament zwischen 5 % und 80% liegen kann. Bei Stämmen aus tropischen Regionen kommt es häufiger und rascher zu Rückfällen als bei denen aus gemäßigten Klimazonen.

So kommt es zu 50%iger Wahrscheinlichkeit bei einer tropischen *P.vivax*-Infektion zu einem Rückfall, meistens sind es sogar mehrere Relapse.

Bei Infektionen mit Stämmen aus gemäßigten Regionen liegt das Rückfallrisiko bei 5 % - 25 % und es kommt nur selten zu wiederholten Rückfällen (30).

Auch der Zeitraum innerhalb dessen es zu einem Rückfall kommen kann unterscheidet sich bei *P.vivax* je nach Region.

Bei jenen aus tropischen Gebieten kann es nach einer kurzen latenten Periode von drei bis fünf Wochen zu einem Rückfall kommen. Bei Infektionen mit Parasiten gemäßigter Regionen ist die latente Phase weitaus länger und kann fünf bis zehn Monate betragen (40).

Man ging davon aus, dass die Parasiten, welche den Rückfall verursachen, quasi Überbleibsel der vorhergehenden Infektion waren.

Untersuchungen von Imwong *et al.* (40) zeigten aber, dass bei Patienten aus Thailand und Burma in 61% der Fälle und bei den Fällen aus Indien bei 55%, die den Rückfall verursachenden Erreger vom Genotyp nicht mit denen der ursprünglichen Infektion übereinstimmten.

Es unterscheiden sich also die Parasiten, welche sich aus den Hypnozoiten entwickeln, von jenen welche die akute Infektion auslösten. Obwohl man nur in Thailand eine Reinfektion ausschließen konnte, gehen Imwong und seine Kollegen davon aus, dass der Großteil der wiederkehrenden *P. vivax*-Infektionen auf die Hypnozoiten, welche nach der Behandlung der akuten Infektion reaktiviert wurden, zurückzuführen sind.

Für die Ergebnisse gibt es folgende Erklärungen: es könnte sein, dass ein Moskito Parasiten verschiedener Genotypen injizierte oder dass es zu einem Kontakt mit einem zweiten Moskito innerhalb von ein bis zwei Tagen kam. Ferner könnte es im Laufe der Zeit immer wieder zu Infektionen mit *P. vivax* gekommen sein und die jetzt reaktivierten Hypnozoiten stammen noch von einer früheren Infektion. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt, man konnte anhand der Genotyp-Analyse jedoch zeigen, dass selbst an Orten

mit einem niedrigen Übertragungsrisiko, eine hohe Rate an gemischten Genotypen zu verzeichnen ist (40).

Bis heute kann man morphologisch nicht sicher feststellen ob eine *P. vivax* Parasitämie die Folge einer Rekrudeszenz, eines Rückfalls oder einer frischen Reinfektion ist (30).

Eine Möglichkeit um zu unterscheiden ob es sich um eine neue oder eine alte Infektion handelt ist aber der Wert der Immunglobuline.

Bei hohem IgM kann man auf eine neue Infektion schließen, da die IgMs die Funktion der Antikörper der primären Immunreaktion haben.

Ist jedoch der IgG hoch, dann kann es sich um einen Relapse handeln, da sie die Antikörper der sekundären Immunreaktion sind (41).

1.2.4 Resistenzen

Unter Resistenz versteht man die Fähigkeit einer Parasitenpopulation, trotz Einnahme und Absorption einer adäquaten Wirkstoffmenge zu überleben und sich zu vermehren (42).

Man unterscheidet zwischen biologischer und klinischer Resistenz:

- Von biologischer Resistenz spricht man, wenn eine Einzeldosis von z.B. mehr als 0,3 g Chloroquin oder mehr als 10ng CQ/ml Blut die Blutstadien einer CQ-sensiblen *P.vivax* Infektion aus dem Blut nicht entfernen kann. Diese Menge von 0,3g CQ liegt deutlich unter der Dosis welche im Alltag Anwendung findet. Bei Standardtherapien werden Dosen verwendet welche fünfmal höher sind als diese.

- Ein Nichtwirken therapeutischer Dosen wird als klinische Resistenz betrachtet, also ein Ausbleiben des Therapieerfolges, trotz korrekter Therapie mit der richtigen Dosierung (30).

Medikamentresistenzen sind ein erstzunehmendes Problem. Sie scheinen auch die Ursache für die Verdoppelung der Todesfälle aufgrund von Malaria bei Kindern in Afrika zu sein.

Korenromp und seine Kollegen zeigten, dass im Osten und Süden Afrikas zwischen den Jahren 1982 und 1989 die Sterblichkeit bei Kindern aufgrund von Malaria 6,5 pro 1000 Kinderjahren betrug und zwischen 1990 und 1998 auf 11,9 pro 1000 Kinderjahren anstieg. Im Gegensatz dazu sank die nicht malariabedingte Kindersterblichkeit (43).

- Es kommt auch vor, dass Malariaparasiten Resistenz gegenüber mehreren Medikamenten entwickeln. In diesem Fall wird von Multi-drug resistance (MDR) gesprochen. Dabei handelt es sich um eine Resistenz gegen mehr als zwei verschiedene Malariamedikamentklassen. In den meisten Fällen sind dies die ersten beiden Wirkstoffklassen 4-Aminochinoline (wie z.B. Chloroquin) und die Antifolate (wie z.B. Sulfadoxin/ Pyrimethamin) (44).

Dies ist vor allem dann möglich, wenn die Mechanismen der Resistenz bei beiden Medikamenten gleich sind. Solche Resistenzen werden auch als Kreuzresistenzen bezeichnet und kommen vor allem bei Medikamenten vor, welche sich sehr ähnlich sind, d.h. der gleichen chemischen Klasse angehören.

Grafisch dargestellt beschreibt White (2004) Resistenzen als eine Rechts-Verschiebung im Konzentrations-Effekt Zusammenhang.

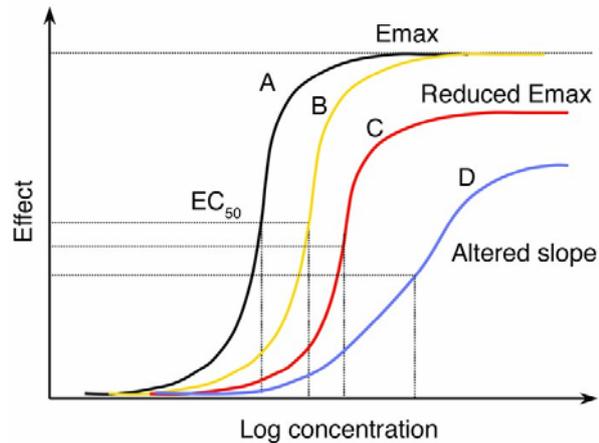


Abbildung 2: Resistenzen nach White (45)

In dieser Grafik steht A für den konzentrationsabhängigen Effekt bei einer medikamentsensiblen Population, B zeigt eine parallele Verschiebung, C und D stehen für verschiedene Grade von Resistenz. Der Emax Wert ist der maximale Effekt den das Medikament haben kann und EC₅₀ ist jene Konzentration, die bei 50% des Emax vorliegt.

Wenn der Grad der Resistenz nur gering ist kommt es nur zu einer geringen Verschiebung (46).

Resistenzbestimmung kann auf verschiedene Weise erfolgen:

- In vitro Methode: diese Methode wird schon seit den 1970er Jahren verwendet.
- Molekulare Proben: diese Methode ermöglicht es nach Mutationen als Ursache für Resistenzen zu suchen, allerdings fand man bei *P. vivax* bislang noch keine genetischen Marker für Chloroquin- Resistenz.
- Prophylaxe und Querschnittsstudien: Studien geben einen Überblick über die vorherrschenden Resistenzen (30).

Das Verstehen der genetische Struktur der Parasiten spielt eine große Rolle beim Verständnis und Vorhersagen von Resistenzen, deren Entstehen und ihrer Verbreitung (30).

1.2.5 Wie entstehen Resistenzen?

Punkte welche laut WHO das Entstehen und Verbreiten von Resistenzen begünstigen bzw. verursachen:

- In Pailin kam es durch das Beimischen von Chloroquin und später auch noch Pyrimethamin ins Kochsalz, wegen des ständigen Vorhandenseins des Therapeutikums zu einem enormen Selektionsdruck auf die Malariaparasiten. Solch ein Selektionsdruck kann zu der beobachteten verminderten Sensibilität geführt haben (47).
- Migration: durch die Mobilität der Bevölkerung kommt es zur Verschleppung und Ausbreitung von Resistenzen.
- Mono-Therapien: in Kambodscha wurde lange Zeit nur Artemisinin gegen Malariainfektionen verabreicht, da es klinisch effektiv ist, keine Nebenwirkungen aufweist und relativ preiswert zu erwerben ist. Der Versuch kostenlos Kombinationspräparate anzubieten schlug fehl, da die Patienten die Präparate mit Mefloquin aufgrund der Nebenwirkungen ablehnten.
- Die Einnahme von Medikamentmischungen welche unter anderem auch unterdosierte Antimalaria-Therapeutika enthalten.
- Die Einnahme von subtherapeutischen Mengen eines Präparates: so verursacht eine zu geringe Menge von Artemisinin, z.B. durch einen zu frühen Abbruch der Therapie, oder eine zu geringe Dosis, einen

Selektionsdruck bei den Parasiten und begünstigt eine weiterhin bestehende Infektion.

- Der Handel mit minderwertigen Medikamenten: diese Präparate enthalten oft zu geringe Wirkstoffdosen (48).

Auf der anderen Seite wird davon ausgegangen, dass genetische Veränderungen, welche zu Resistenzen gegen Anti-Malaria-Medikamente führen, spontan erfolgen, selten und wahrscheinlich nicht einmal von der Verwendung abhängig sind.

Die Unabhängigkeit von Punktmutationen vom Medikamentenkonsum lässt sich dadurch erklären, dass Malariatherapeutika nicht mutagen wirken. Von solchen Mutationen sind eher einzelne Parasiten in der Gesamtpopulation betroffen. Zeigt sich durch eine derartige Punktmutation aber ein Selektionsvorteil, so können diese mutierten Parasiten sich gegenüber den anderen durchsetzen (44).

Es kann sich auch eine Resistenz gegenüber einem Stoff einstellen, obwohl dieser nie eingenommen wurde, aber ein mit ihm verwandter.

Dies zeigte sich bei einer Studie kanadischer Wissenschaftler bei Bewohnern südamerikanischer Dörfer. Sie wiesen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin nach, obwohl jene nie einen Kontakt damit hatten. sehr wohl nahmen sie aber Chloroquin ein, welches chemisch mit Ciprofloxacin verwandt ist. Es gelang, diese Resistenz auch im Labor nachzuweisen (49).

Dies kann jedoch auch bei komplett unterschiedlichen Medikamenten vorkommen, wie folgendes Beispiel zeigen soll:

Rathod *et al.* zeigte anhand von *in vitro* Versuchen mit verschiedenen *P. falciparum* Klonen, dass sie alle resistent gegen bestimmte Medikamente waren, aber sensibel gegenüber anderen. Bei einer Population (W2 aus Indochina, einer der resistentesten *P. falciparum* Stämme) entstanden innerhalb

kurzer Zeit - drei Wochen - mutierte Parasiten, welche eine Resistenz gegen 5-Fluorooroat aufwiesen. Dieses Medikament wurde nie im Feld angewendet und konnte somit noch keine resistenten Erreger selektionieren. Andere Populationen hingegen wiesen auch nach zweimonatigem Kontakt mit der Substanz keine Resistenz auf. Auch gegenüber Atovaquon, welches mit 5-Fluorooroat keinerlei strukturelle Ähnlichkeit aufweist, bildeten sich Resistenzen. Die W2 Population hat scheinbar die Fähigkeit, gegen strukturell komplett unterschiedliche Therapeutika Resistenzen zu bilden. Diese Fähigkeit wird ARMD (accelerated resistance to multiple drugs) genannt.

Die Ursache für diese Fähigkeit kann in der Erwerbung eines generellen Mutatorphänotyps liegen (ein Phänotyp, bei welchem eine Erhöhung der Mutationsfrequenz im gesamten Genom beobachtet werden kann).

Eine Alternative zu dieser Theorie wäre eine auf Rekombination beruhende Strategie. Die genaue Ursache ist noch nicht geklärt, es könnte auch sein, dass weder ein Anstieg der Mutationsrate, noch einer der Rekombinationsrate zutrifft (50).

Auch die Chemoprophylaxe von Reisenden wurde als Quelle der Resistenzbildung verdächtigt.

Dies ist aber aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich, nämlich

- wenn eine ausreichende, suppressive Konzentration der Therapeutika vorhanden ist, dann ist die Anzahl zirkulierender Parasiten weitaus geringer als ohne Chemoprophylaxe der Fall wäre. Laut White und Pontavornpinyo müsste eine Person in einem Gebiet mit hoher Übertragungsrate zehn Jahre lang Therapeutika als Prophylaxe einnehmen um denselben Selektionsdruck zu erzeugen als eine einzelne akute Infektion.
- selbst wenn Schizonten trotz Chemoprophylaxe freigesetzt werden, erreicht die Infektion nicht die Dichte welche für eine Gametozytogenese

nötig wäre und somit ist die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung sehr gering.

- die Reisenden verlassen die Region meist bevor sie Krankheitssymptome zeigen und falls nicht, so werden sie in einer Umgebung behandelt, in welcher ein Übertragungsrisiko sehr gering ist (37).

Resistenzen können aber auch mit einer Einbuße der Fitness des Parasiten verbunden sein. Jene, welche resistent gegenüber bestimmten Medikamenten sind, sind in der Abwesenheit des Medikaments weniger fit und vermehren sich in geringerem Ausmaß als die nicht resistenten. Auch die Immunität des Wirtes spielt bei Resistenzen eine große Rolle, sie kann eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse von in vitro und in vivo Tests sein. Bei in vivo Tests kommt es viel seltener zu spontanen Mutationen. Denn selbst ein nicht immuner Infizierter zeigt eine spezifische Immunantwort. Diese Immunantwort richtet sich auch gegen die einzelnen mutierten Parasiten und verhindert so ihre Weiterentwicklung. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit dass eine einzelne Mutation, welche eine zur Übertragung notwendige Dichte erreicht, nur 2- 3 % (46).

Vor allem Medikamente welche eine besonders lang Halbwertszeit haben, können die Entwicklung der Resistenz begünstigen. Idealerweise sollten daher Präparate verwendet werden, bei welchen notwendige Behandlungsdauer und Halbwertszeit aufeinander abgestimmt sind (38).

Chloroquin und Piperaquin gehören zu jenen Medikamenten welche nur sehr langsam abgebaut werden, sie bieten den Parasiten eine längere Zeit die Möglichkeit Resistenzen zu entwickeln (46).

1.2.6 Einige bis jetzt beobachtete Resistenzen bei Malariaparasiten

Seit der Entwicklung von Malariamedikamenten in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts stehen die humanen Malaria Parasiten unter ständigem Selektionsdruck.

Die am häufigsten verwendeten Präparate sind billig, weit verbreitet und werden nur langsam vom Körper ausgeschieden.

Zusammen mit Antipyretika (fiebersenkenden Präparaten) sind Antimalariamedikamente die in den Tropen am häufigsten verabreichten Medikamente und daher ist ihr Missbrauch weit verbreitet.

Bis zum Jahr 2003 ging man noch davon aus, dass bis jetzt bei allen Anti-Malaria-Medikament-Klassen Resistenzen beobachtet wurden, außer bei den Artemisininen (37).

Allerdings trifft dies für die Artemisinine nach neueren Beobachtungen in Indochina nicht mehr zu.

Das Austesten und Monitoring der Arzneimittlempfindlichkeit bei *P. vivax* war erst möglich, als die geeigneten Tests dafür geschaffen wurden, was ab dem Jahr 2002 der Fall war (51).

Vorherige Meldungen gehen auf Fehlschläge von Behandlungen (in vivo Beobachtungen) zurück.

In den folgenden Beispielen zu einigen Medikamenten soll gezeigt werden, wie unterschiedlich die Lage bezüglich Resistenz und Sensibilität in den einzelnen Ländern ist.

1.2.6.1 Chloroquin

Die ersten Resistenzen von *P. vivax* gegenüber Chloroquin wurden 1989 aus Papua, Neuguinea, gemeldet (29).

Auch in Indien zeigte sich ein Fall von Chloroquin Resistenz. Ein 13jähriges Mädchen wurde seinem Gewicht entsprechend mit Chloroquin behandelt. Dies geschah Ende Oktober 1995, Anfang November im selben Jahr zeigte sie wieder Symptome mit hohem Fieber. Ein Blutausschrieb zeigte auch Trophozoiten und Gametozyten. Die Dichte der Erreger war zwar geringer als bei der Erstaufnahme in die Klinik, jedoch zeigte sich keine Verbesserung des Befindens. Dem Mädchen wurden hierauf Chinin und Primaquin verabreicht, woraufhin keine Erreger mehr erfasst werden konnten (52).

Studien von Phan *et al.* zeigten, dass in Vietnam im Jahr 2002 sowohl Chloroquin als auch Artemisinin bei *P. vivax*- Infektionen noch wirksam waren und sich 2002 noch keine Resistenz gegen eines der beiden Präparate zeigte (53).

Eine spätere Studie aus dem Jahr 2004 aus dem Nordwesten von Thailand wies darauf hin, dass sich bei *P. vivax* ein deutlicher Rückgang in der Sensibilität gegenüber Chloroquin entwickelt hat. In seiner klinischen Wirksamkeit blieb es jedoch weiterhin effektiv. Bei Artemisinin wurde im Vergleich zu früheren Studien sogar eine geringe, aber unter der Signifikanzgrenze liegende Steigerung der Sensibilität bemerkt (54).

Eine Studie von den Jahren 2002- 2004 aus Mae Sot, an der Grenze von Thailand zu Myanmar gelegen, zeigte in vivo und in vitro Sensibilität gegenüber Chloroquin und Chinin. Die 62 Patienten wurden in zwei Gruppen geteilt, die eine Patientengruppe erhielt drei Tage lang Chloroquin, die andere drei Tage lang Chinin. Beide Patientengruppen erhielten zusätzlich Primaquin gegen die Hypnozoiten, welche zu einem Rückfall führen können (55).

Eine spätere Studie aus dem Jahr 2007 zeigt, dass es auch in Mae Sot bei in vitro Tests ein deutliches Nachlassen in der Sensibilität von *P. vivax* gegenüber Chloroquin festzustellen war (56).

Eine Studie aus dem Jahr 2008 in Süd-Myanmar (Bezirk Dawei) ergab, dass 8% von 235 Patienten eine Resistenz von *P. vivax* gegenüber Chloroquin zeigten (57).

1.2.6.2 Artemisinin/ Artesunat

Seit 2003 besteht der Verdacht, dass es entlang der Thai-Kambodschanischen Grenze zu artemisininresistenten *P. falciparum* Stämmen gekommen ist.

Normalerweise kommt es bei der Anwendung dieser Medikamente nach zwei bis drei Tagen zur Entfieberung der Patienten und einem Verschwinden der Erreger aus dem peripheren Blut. Mittlerweile ist jedoch zu beobachten, dass es bis zum Eintreten eines Therapieerfolges immer länger dauert. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Erreger zunehmend resistenter werden. Was in den 1970er Jahren entlang dieser Ländergrenze schon mit Chloroquin geschah, könnte nun auch mit Artemisinin eintreten.

Dem Resistenzeintritt gegen Chloroquin folgte das Versagen von Sulfadoxin-Pyrimethamin und Mefloquin.

Das aktuelle Problem ergibt sich daraus, dass Artemisinderivate heute universell in der ACT verwendet werden. Sollte die Resistenz gegen Artemisinine um sich greifen, würde dies das Ende der ACT bedeuten.

Bis jetzt war dieses Phänomen auf China, Vietnam und Kambodscha begrenzt und diese Länder weisen eine lange Geschichte in der Verwendung von Artemisinderivaten auf, jedoch muss wegen der massiven Ausbreitung der ACT mit einer weiteren Ausbreitung der Artemisininresistenz gerechnet werden (48).

Im Jahr 2009 wurde von Dondorp *et al.* in Pailin (West-Kambodscha) und Wang Pha, Nord- West-Thailand, eine deutlich geringere Sensibilität von *P. falciparum*

in Pailin gegenüber Artesunat im Vergleich zu den *P. falciparum* Stämmen aus Wang Pha nachgewiesen (58).

Vor allem Kambodscha ist in letzter Zeit aufgrund neu auftretender Medikamentenresistenzen ins Licht der Medien gerückt. An der Thai-Kambodschanischen Grenze wurde das Auftreten von Resistenz gegen Artemisinin beobachtet.

Kambodscha wird zur Brutstätte für Resistenzen, da sowohl das Gesundheitssystem als auch die Versorgung mit Medikamenten sehr schlecht organisiert ist und gefälschte Präparate, mit geringem Wirkstoffanteil im Umlauf sind (59).

1.2.6.3 Mefloquin

Der Fall eines 12jährigen Mädchens aus dem Jahr 1998 aus der Amazonas Region zeigt das erste Auftreten von Resistenzen gegenüber Chloroquin und Mefloquin in dieser Region. Zuerst wurde die Patientin mit Chloroquin behandelt, was zu keiner Besserung führte, anschließend mit Mefloquin. Auch dies führte zu keiner Heilung. Erst eine Behandlung mit Artesunat und anschließend Primaquin führte zu parasitenfreien Blutproben (60).

Eine Studie von Maquire *et al.* aus dem Jahre 2005 zeigte, dass sich Mefloquin ideal zur Behandlung von chloroquinresistenter *P. vivax* und *P. falciparum* Malaria in Papua, Indonesien eignet, wo Chloroquin zum damaligen Zeitpunkt noch immer als das Therapeutikum der Wahl galt (61).

2 Fragestellung

Ziel dieser Studie ist die Ermittlung des Sensibilitätsstatus von *Plasmodium vivax* gegenüber Artemisinin, Atovaquon und Desbutyl-Benflumentol im Gebiet von Mae Sot, Thailand.

3 Material und Methoden

3.1 Study Site: Thailand/Mae Sot



Abbildung 3: Landkarte Thailand, der gelbe Stern zeigt die Lage von Mae Sot (62)

Mae Sot liegt im Nordwesten von Thailand und die Hauptstadt des gleichnamigen Distrikts. Die Stadt hat circa 100.000 Einwohner und liegt direkt an der Grenze zu Burma / Myanmar; nur ein Fluss trennt die beiden Länder

voneinander. Während der Regenzeit, welche von Mitte Mai bis Mitte September in dieser Region herrscht, ist die „Hochsaison“ für Malaria.

Der thailändischen Regierung ist es in den vergangenen Jahren gelungen die Malaria weitgehend unter Kontrolle zu bringen und es kommt während der Regenzeit nur mehr in den Grenzregionen zu vereinzelt Fällen von Infektionen.

In Myanmar hingegen, dem westlichen Nachbar von Thailand, ist die Situation eine andere. Das Land ist durch die jahrzehntelange Militärdiktatur heruntergewirtschaftet und es gibt kein wirksames Sozial- und Gesundheitssystem. Dadurch kommt es zu einer unkontrollierten Verwendung von Malariamedikamenten, vor allem in Form der Selbstbehandlung, was wiederum zur Entwicklung von Resistenzen führt. Während der Regenzeit kommt es in Burma zu einer enormen Häufung von Malariaerkrankungen. Verursacht werden diese in erster Linie durch *P. falciparum* und *P. vivax*. Da in Thailand jeder Malariapatient auf Regierungskosten behandelt wird, reisen aus diesem Grund viele Burmesen über die Grenze. Aber auch in die andere Richtung kommt es zu Kurzbesuchen, bei welchen sich die Besucher mit resistenten Plasmodienstämmen infizieren können (63).

Mae Sot ist innerhalb Thailands die Region mit der höchsten Malariainzidenz. Die Hälfte aller in Thailand verzeichneten Malariainfektionen kam 2006 im Distrikt Mae Sot vor (54).

Im Jahre 1998 wurden 65 304 Fälle dokumentiert. Davon wurden 45 % der Infektionen von *P. vivax* verursacht (51).

In früheren Zeiten, bis etwa in die späten 1990er Jahre, war *P. falciparum* in Thailand für die meisten Malariainfektionen verantwortlich.

Durch *P. vivax* bedingte Infektionen belegten den zweiten Platz und *P. malariae* kam nur sehr selten vor.

In den Jahren zwischen 1965 und 2006 kam es zu einem Wechsel in der Häufigkeit des Auftretens bei *P. falciparum* und *P. vivax*, wobei *P. vivax* an die erste Stelle trat. in Thailand (54).

Ein Beispiel hierfür sei eine Studie von Congpuong *et al.*:

in Sa Kaeo, eine Provinz in Thailand, kam es zwischen den Jahren 1995 und 1997 zu einem Rückgang der *P. falciparum* Infektionen aufgrund der erfolgreichen Behandlung mit Artesunat und Mefloquin. Allerdings konnte man ein vermehrtes Auftreten von *P. vivax* Infektionen beobachten. Vermutungen, dass dies auf eine Veränderung der Vektorfauna zurückzuführen sei, konnten nicht bewiesen werden. Als weitere mögliche Ursache kam Medikamentenresistenz in Frage. In dieser Region gibt es zahlreiche Kliniken in welche sich die Patienten begeben sobald sie Symptome bemerken und dort eine vorbildliche Behandlung bekommen. Die Patienten wurden mit Chloroquin und Primaquin behandelt. Sowohl vor der Behandlung, als auch alle sechs Stunden nach der Behandlung wurden Blutproben genommen, bis zwei aufeinander folgende Blutproben negativ waren, danach nur mehr täglich bis zum siebten Tag. Die Ergebnisse zeigten, dass Chloroquin im Jahr 2000 in der Provinz Sa Kaeo noch sehr effektiv ist und es daher andere Gründe für das Ansteigen von *vivax*- Infektionen geben muss.

Da die Patienten zum Großteil aus der Umgebung kamen, musste man davon ausgehen, dass die Infektionen in den Dörfern der Umgebung erfolgten, dort wurden aber die für Thailand typischen Vektoren (*A. minimus* und *A. dirus*) nicht gefunden und in den Speicheldrüsen der gefangenen Moskitos konnten keinen Sporozoiten nachgewiesen werden.

Das Verhalten der Bevölkerung dürfte der Grund für das gehäufte Auftreten von *P. vivax* gewesen sein, denn es kommt entlang der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha zu intensiver Migration. Die plötzliche *P. vivax* Welle lässt sich mit der vermehrten Einwanderung von Kambodscha nach Thailand erklären. Vor allem in den Gebieten (Aranya Prathat und Ta Phraya) entlang der Grenze machte sich dies während der Erntezeit für Zuckerrohr bemerkbar.

Obwohl gezeigt wurde, dass Chloroquin bei der Patientenbehandlung in den Provinzen Sa Kaeo und Tak noch effektiv ist, zeigten die in vitro Tests aber, dass es erhebliche Unterschiede bezüglich der Sensibilität zwischen Sa Kaeo und Tak gibt. Proben aus der Provinz Tak waren weniger sensibel als jene aus Sa Kaeo (64).

Vor allem in den letzten 30 Jahren nahm die Migration entlang der Grenze zwischen Myanmar und Thailand enorm zu. Es lebt rund eine Million burmesischer Migranten/ Flüchtlinge in Thailand, viele davon leben in Lagern, Zelten oder anderen unbefestigten Unterkünften was zum gehäuften Kontakt mit Anophelen führt. Sie haben gewöhnlich medizinische Versorgung durch NGOs und es kommt zu einer Vielzahl von tropischen Infektionen darunter auch Malaria (65).

Thailand hat ein hoch entwickeltes System zur Malariabekämpfung. Sowohl den Thais, als auch anderen Nationalitäten wird kostenlose Diagnose und Therapie der Malaria angeboten (48).

Rund 60% der pro Jahr gemeldeten Malariafälle werden in den Malariakliniken Thailands behandelt. Ettliger und seine Kollegen verglichen drei Kliniken aus dem Distrikt Mae Sot. Die Kosten sind je nach Klinik unterschiedlich, am höchsten sind sie in der großen zentralen Klinik und am niedrigsten in den in den Dörfern liegenden, mobilen Kliniken. Es zeigte sich, dass ein erheblicher Teil der Dorfbewohner ihre Malariainfektionen nicht in einer Klinik behandeln lassen. Diese Patienten leiden sehr viel länger unter der Krankheit als jene welche das Gesundheitssystem in Anspruch nehmen (66).

3.2 Patienten und die Kriterien zur Aufnahme in die Studie

Die Blutproben wurden von Patienten der Malariaklinik in Mae Sot genommen. Einschlusskriterium war gesicherte *P. vivax* Monoinfektion mit einer Dichte von 1000 bis 100 000 asexuelle Stadien pro μ l Blut.

Schwangere Frauen und Kinder unter einem Alter von neun Jahren wurden ausgeschlossen. Ebenso Patienten, welche in jüngerer Zeit Malariamedikamente oder Antibiotika genommen hatten (< 9 Wochen für Mefloquin, < 4 Wochen für andere Medikamente).

In dieser Arbeit wurden die *P. vivax* Isolate von 46 Patienten untersucht.

Das Alter der der Patienten lag zwischen 9 und 60 Jahren und betrug im Durchschnitt 30,98 Jahre (Modus). Es handelte sich um 9 weibliche und 37 männliche Patienten, Mit 25 Personen überwogen die Patienten mit thailändischer Nationalität, 21 stammten aus Myanmar, jedoch hatten sich nur 17 Patienten die Infektion in Thailand zugezogen, während sich 29 Patienten in Myanmar infiziert hatten.

3.3 Die getesteten Präparate

3.3.1 Artemisinin/ ART

Artemisinin wird aus der Pflanze *Artemisia annua* gewonnen. Im deutschen Raum ist sie auch unter dem Namen einjähriger Beifuss, oder Wermut bekannt. Sie ist in China und Nord-Vietnam weit verbreitet (67).

Die Struktur von artemisinin wurde 1979 geklärt. Die Pflanze wurde als Tee in der chinesischen Volksmedizin bei Fiebererkrankungen schon vor 2000 Jahren verwendet.

Heutzutage werden vor allem Derivate des Artemisinins verwendet, wie zum Beispiel Dihydroartemisinin oder Artemether, da sie wirksamer als die

Ausgangsverbindung sind. Die vom Hämoglobin freigesetzten Häm oder Fe^{2+} reagieren mit der Endoperoxidgruppe am Artemisinin- Molekül.

Dadurch bilden sich Radikale welche die Proteine und Nukleinsäuren der Erreger irreversibel verändern (28).

Artemisinin-derivate sollten bei unkomplizierten Fällen nicht als Monotherapie verwendet werden, da es sonst auch noch bei dieser, im Kampf gegen die Malaria sehr bedeutenden Arzneimittelklasse, zu Resistenzen kommen könnte. Momentan gibt es fünf ACTs welche zur Therapie empfohlen werden, diese sind Artemether- Lumefantrin, Artesunat- Amodiaquin, Artesunat- Mefloquin, Artesunat + Sulfadoxin/Pyrimethamin und Dihydroartemisinin-Piperaquin (14).

Artemisinine wirken vor allem auf die späten, aber auch auf die frühen Ringstadien.

Ein weiterer Grund für die Verwendung von semisynthetischen Derivaten ist die schlechte Wasser- und Fettlöslichkeit des ursprünglichen Artemisins. Zu den Derivaten zählen Artemether, Dihydroartemisinin und Artesunat. Artemether ist weitaus besser fettlöslich als Dihydroartemisinin, Artesunat hydrophiler als Dihydroartemisinin (11).

Die Artemisinin Derivate können aber nicht nur gegen Malaria eingesetzt werden. Es gibt Studien welche darauf hinweisen, dass Artemisinin auch auf Tumorzellen eine hemmende Wirkung ausübt. So zeigte sich bei einer Studie von Chen, dass Dihydroartemisinin Ovarialkrebs im Wachstum hemmt (68).

Eine andere Studie zeigt auch eine Hemmung von Pankreastumoren, welche besonders schlecht auf bisherige Chemotherapeutika ansprechen, durch Artesunat (69).

3.3.2 Desbutyl- Benflumentol/ DBB

DBB ist eine relativ neue Verbindung mit erheblicher Wirkung gegen Plasmodien. Es handelt sich dabei um ein Benzindenderivat, welches nahe mit Benflumentol, auch als Lumefantrin bekannt, verwandt ist.

Bei in vitro Tests zeigte es eine viel versprechende Wirkung, sogar bei multiresistenten *P. falciparum* Stämmen (70).

Eine in vitro Studie mit DBB und Retinol zeigte bei *P. falciparum* eine unerwartet starke Hemmung der Schizontenreifung. Die Wirkung in der Kombination war 10mal höher als erwartet, was auf einen starken Synergismus der beiden Substanzen schließen lässt.

Auch allein angewandt, zeigte sich bei DBB eine hohe blutschizontozide Wirkung (71).

3.3.3 Atovaquon/ ATO

Atovaquon hat als einziger Vertreter der Gruppe der Naphthochinone, welche für ihre antiparasitäre Wirkung schon lange bekannt sind, in der Humanmedizin als Breitbandspektrum-Antiprotozoikum Bedeutung erlangt.

Atovaquon ist eine fettlösliche Substanz und sollte daher mit fettreicher Nahrung eingenommen werden, da es so besser aufgenommen werden kann.

Es wird mit Proquanil kombiniert. Dieses hemmt den alternativen Weg, der gewählt wird wenn ATO den Elektronentransport hemmt und führt so zu einem schnellen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials.

Die Kombination von Proquanil und ATO (bekannt als Malarone ®) vermindert die Entstehung von Resistenzen bei der Therapie (11).

3.4 Das in vitro Testverfahren

3.4.1 Die Entwicklung eines in vitro Verfahrens für Plasmodien

Das Entstehen von Resistenzen machte die Entwicklung von Verfahren zur Messung der Arzneimittelempfindlichkeit von Malariaparasiten notwendig.

Der erste Versuch der kurzzeitigen in vitro Kultur von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* gelang bereits **1911** (Bass & Johns). Dafür defibrierten sie das parasitenhaltige Blut, entnommen durch Venupunktur, versetzten es mit Glukose und bebrüteten es bei Körpertemperatur. Dieses Verfahren führte zur Reifung von jungen Trophozoiten zu Schizonten. Dies gelang jedoch meist nur für die Dauer eines Zyklus, im besten Fall für die Dauer von drei Zyklen (72).

Dieses Verfahren wurde erst viele Jahre später wieder aufgegriffen.

Es gelang für *P. falciparum* einen Makrotest zu entwickeln, dabei handelt es sich um einen Schizontenreifungstest mit defibriertem Blut und Glukosezusatz. Dieser wurde **1968** eingeführt.

Trager und Jensen (**1976**) adaptierten dieses Verfahren später unter Verwendung des Mediums RPMI-1640 zur Dauerkultur von *P. falciparum*. Die Methode wurde von Rieckmann et al 1978 als Mikromethode für die Sensibilitätsprüfung verwendet, welche schließlich die Routineanwendung für die Schizontenreifungstests bei Frischisolaten ermöglichte (73).

Für *P. vivax* gab es lange Zeit noch kein solches Verfahren. Das Auftreten von Resistenz gegenüber Chloroquin zeigte aber die Notwendigkeit, auch für *P. vivax* einen solchen in vitro Test zu entwickeln.

Tasanor *et al.* entwickelten im Jahr **2000** ein in vitro Verfahren für die Messung der Arzneimittelsensibilität bei *P. vivax*. Die hier beschriebenen Untersuchungen bedienten sich dieses Verfahrens (51).

3.4.2 Ablauf des in vitro Testverfahrens

Die in den in vitro Test verwendeten Blutproben kamen von Patienten welche die Malariaklinik in Mae Sot wegen Diagnose und Behandlung aufsuchten.

3.4.2.1 Blutentnahme

Ziel ist es, die medikamentenbedingte Wachstumshemmung zu ermitteln.

Dafür werden Patienten mit einer eindeutigen *P. vivax* Monoinfektion 0.2ml Blut von der Fingerbeere entnommen. Die Entnahme erfolgte mittels einer Einmal-Lanzette in eine heparinisierte, sterile, phenolfreie Kapillare.

Phenol könnte zu einer Hemmung des Parasitenwachstums in der Kultur führen. Als Medium wird eine Mischung aus RPMI-1640 (ein Zellkulturmedium) und Waymouth-Medium verwendet.

3.4.2.2 Herstellung des BMM und Aufimpfung auf die Mikrotiterplatten

Anschließend wird die Blutprobe in ein steriles Plastikröhrchen mit 3,8 ml RPMI 1640 und Waymouth Medium (Verhältnis 1: 1) gegeben. Diese Blut- Medium-Mischung (BMM) wird innerhalb von 3 Stunden weiter verarbeitet und bis dahin im Inkubator bei ca. 37.5°C aufbewahrt.

Zur Verarbeitung wird die BMM vorsichtig homogenisiert. Anschließend werden die Testplatten mit der BMM beimpft, wobei jeweils 50 µl der BMM in jede Vertiefung der vorgesehenen Testreihe verbracht werden. Die Testplatten reichen für 12 Testreihen je 8 acht Vertiefungen (A-H) aus. Die Testplatte enthält nur jeweils einen Wirkstoff bzw. eine Wirkstoffmischung. Die erste Vertiefung (A) ist die Kontrolle und enthält kein Medikament. In den folgenden Vertiefungen befindet sich der zu testende Wirkstoff in steigender Konzentration (B – H) (56).

Die in dieser Studie verwendeten Mikrotiterplatten waren mit Artemisinin, Desbutyl- Benflumentol und Atovaquon vordosiert.

3.4.2.3 Inkubation

Nach der Beinpfung werden die Mikrotiterplatten verschlossen und in einen Kerzenbehälter gegeben.

Der Kerzentopf, ein Plastikbehälter, dient zum optimalen Wachstum der Malariaparasiten, indem eine dem Kapillarblut entsprechende Umgebung geschaffen wird. Hierzu wird in dem fest schließenden Behälter durch eine brennende Kerze ein Teil des Sauerstoffs verbraucht und CO₂ freigesetzt. Die am Boden stehende Kerze erlischt sobald der Sauerstoffgehalt auf etwa 16 % herabgesetzt ist und der Kohlendioxydgehalt etwa 5 % erreicht hat. Diese Gasmischung entspricht dem mikro-aerophilen Verhalten der Plasmodien (74).

Sobald die Kerze im Topf erlischt wird das Behältnis mit den Mikrotiterplatten luftdicht verschlossen und in den auf 37.5°C eingestellten Inkubator gegeben.

Die Inkubationszeit beträgt bei *P. vivax* 30-42 Stunden bei 37,5°C. In dieser Studie lag die Inkubation einheitlich bei 42 Stunden.

3.4.2.4 Aufbringen auf Objektträger

Danach folgende werden die bebrüteten Platten „abgeerntet“, wobei die überstehende Flüssigkeit (Medium+Plasma) bei Well A beginnend, abgenommen und verworfen wird. Das verbleibende Sediment wird als dicker Tropfen auf Objektträger aufgebracht, wobei die selbe Reihenfolge wie bei der Entfernung des Medium-Plasma Überstands eingehalten wird. Dabei wird eine einheitliche Folge der dicken Tropfen eingehalten. So erhält man auf jedem Objektträger acht dicke Tropfen der Testreihe.

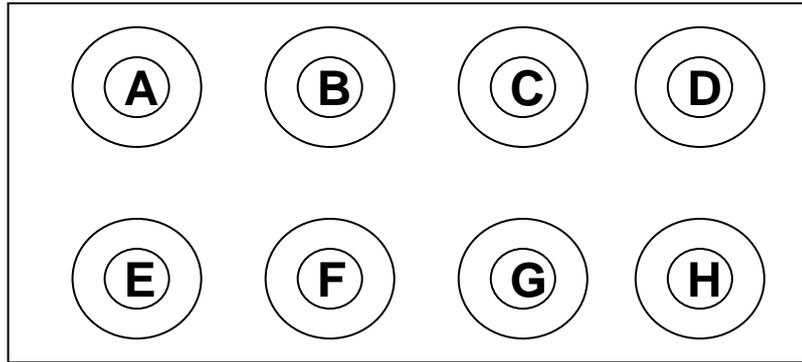


Abbildung 4: Aufteilung der Blutstropfen am Slide

Die fertigen Objektträger werden zuerst luftgetrocknet und anschließend im Inkubator aufbewahrt, dadurch erreicht man eine bessere Anhaftung der dicken Tropfen. Die Präparate sollten auf jeden Fall trocken sein, um das Anwachsen von Luftkeimen zu verhindern (51).

3.4.2.5 Giemsa- Färbung

Die Giemsa Färbung (Giemsa stain) entwickelt von Gustav Giemsa (1867-1948), ist eine modifizierte Romanowsky-Färbung, welche sich besonders zur Differentialfärbung von Plasmodien und zellulären Blutbestandteilen eignet. Methanol-fixierte Ausstriche (Blut, oder auch Knochenmark) werden mit einem Farbstoffgemisch bestehend aus Giemsa- Azur- Eosin- Methylenblau gefärbt. Dabei kommt es zur unterschiedlichen Anfärbung der einzelnen Bestandteile im Blut, so erscheinen Zellkerne rotviolett, Zytoplasma und Lymphozyten blau, Erythrozyten blassrot und die Kerne/Chromatin von Parasiten leuchtend rot. Dicke Tropfen werden ohne vorherige Fixierung mit der verdünnten Giemsa-Lösung überschichtet (oder in Färbekammern verbracht). Im Laufe des Färbeprozesses werden die Erythrozyten lysiert und im gefärbten Präparat sind nur mehr die soliden zellulären Elemente und die von ihrer Erythrozytenhülle befreiten Parasiten zu sehen (75).

Sauberes Leitungswasser wird mit verdünnter Essigsäure auf einen pH von 6,85 eingestellt.

Dabei werden die Präparate in einen Behälter geschichtet und komplett mit Giemsa- Lösung begossen. Der Behälter wird vorsichtig bewegt und kurz auf den Tisch geklopft um das Anhaften von Luftblasen zu vermeiden. Anschließend wird die verdünnte (3%ige) Giemsa- Lösung mit Spülflüssigkeit ausgespült und die Präparate werden schließlich mit dem vorher auf pH 6.85 eingestellten Wasser nachgespült. Danach müssen die Präparate trocknen und können anschließend ausgezählt werden.

Durch die Färbung wird auch eine Hämolyse erreicht welche die Zuordnung und das Zählen der Parasiten erleichtert.

3.4.2.6 Herstellung eines Präinkubations- Slides

Für jedes Parasitenisolat muss auch ein Präinkubationspräparat hergestellt werden. Dieses dient zur Ermittlung der Parasitendichte und zur Differentialzählung der asexuellen Parasitenstadien.

Dafür wird die restliche BMM 1,5 h in den Kühlschrank gegeben. Anschließend wird 0,2 ml des Bodensatzes als Dicker Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht. Auch dieser muss trocknen und wird darauf folgend wie die Kulturpräparate gefärbt, jedoch mit 6%iger Giemsa- Lösung.

Die Parasitendichte wird durch das Auszählen der Leukozyten gegen die Malariaparasiten ermittelt. Das Ergebnis wird mit 8.000 multipliziert. Dieser Wert ist eine standardisierte Größe und spielt im weiteren Verlauf eine wichtige Rolle.

3.5 Warum in vitro und nicht in vivo?

Die in vivo Untersuchung der Arzneimittlempfindlichkeit hat bei Malaria zu keinen genauen quantitativen Ergebnissen geführt, da man weder den Einfluss individuell verschiedener pharmakokinetischer Faktoren noch die Auswirkung individueller Immunität ausschließen kann.

In vitro Verfahren liefern weitaus bessere Daten wenn es um die objektive Erfassung der Hemmung der Parasitenreifung geht.

3.6 Differentialdiagnostik/ Unterscheidung der parasitären Stadien

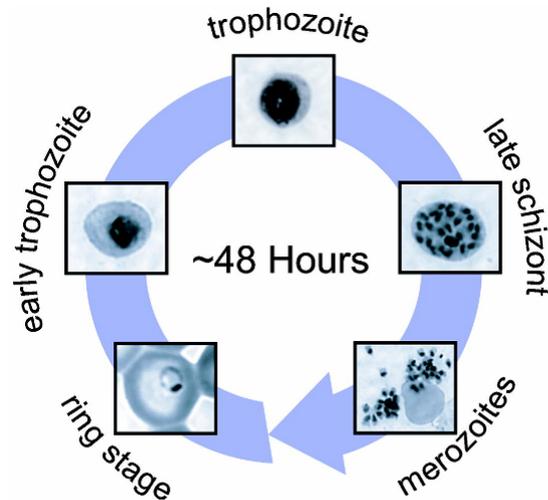


Abbildung 5: Zyklus von *Plasmodium vivax* im Menschen (76)

Die Differentialzählung bei *P. vivax* erfolgt gemäß vier verschiedener asexueller Stadien (junge Trophozoiten, mittlere und fortgeschrittene Trophozoiten, Präschizonten und Schizonten). Es werden insgesamt 200 asexuelle Parasitenstadien gezählt und den Kategorien zugeordnet.

Die 200 asexuellen Parasitenstadien werden anhand ihrer strukturellen Elemente wie Cytoplasma, Pigment und nukleares Chromatin unterschieden.

Die ringförmigen Strukturen, welche in Erythrozyten vorkommen, werden Trophozoiten genannt, sie werden anhand ihrer Größe in junge, mittlere und fortgeschrittene Ringstadien unterteilt.

Die Trophozoiten reifen zu Schizonten heran welche wiederum in Präschizonten (<8 Chromatinkörper) und Schizonten (8+ Chromatinkörper) unterteilt werden können.

Bei gefärbten Präparaten ist die bei *P. falciparum* fehlende Schüffner'sche Tüpfelung für *P. vivax* (und auch *P. ovale*) charakteristisch. Diese Tüpfelung erscheint lila.

1. Junge Trophozoiten haben einen Durchmesser von bis zu 4 µm und eine ringartige Struktur. Im dicken Tropfen können sie aber auch als ein Kügelchen erscheinen, welches aus Chromatin besteht, welches von Zytoplasma umgeben ist. Junge Trophozoiten sind bei *P. vivax* meist vorherrschend. Bei ihnen ist noch kein Pigment (Hämозoin) im Zytoplasma sichtbar.

2. Mittlere Trophozoiten haben einen Durchmesser von 4-8 µm und treten nicht mehr gleichmäßig ringförmig auf, das Zytoplasma liegt separat oder hat pseudopodienähnliche Ausbuchtungen.
Reife Trophozoiten haben einen Durchmesser von mehr als 8 µm, in diesem Stadium kommt das Chromatin als einzelne Kugel vor welche von irregulären Zytoplasma Ringen und oft auch einer großen Vakuole umgeben ist. Das Chromatin kann aber auch in Form von 2 Kernen auftreten. Das Pigment ist in diesem Stadium schon gut erkennbar.

3. Frühe Präschizonten zeichnen sich durch weniger als 8 Chromatinkörper und ein noch nicht getrenntes Zytoplasma aus. Die nukleären Segmente treten als dunkel gefärbte kugelige Körperchen hervor. Das Pigment zeigt eine Tendenz zur Aggregation.
Späte Präschizonten besitzen bereits mehr als 7 Chromatine, auch diese sind scharf begrenzt, wie bei den frühen Präschizonten. Bei ihnen erscheint das Zytoplasma lose und beginnt sich um die Chromatinkörper zu verdichten. Beim Pigment kann man schon gut die Aggregation erkennen.

4. Reife Schizonten erkennt man anhand ihrer getrennt angelegten Chromatinkörper, sie haben mindestens acht davon. Das Zytoplasma zeigt bereits klare Zuordnung zu den individuellen Chromatinkörpern. Die Pigmentkörperchen sind zu einer zentralen oder randständigen Masse verschmolzen.

Durch die Färbung werden auch die Gametozyten sichtbar, diese werden aber in die Differentialzählung nicht miteinbezogen und daher hier nicht genauer beschrieben.

3.7 Die Auswertung der Testpräparate

Ab diesem Schritt habe ich das Material erhalten und damit gearbeitet.

Die Auszählung erfolgte mikroskopisch bei tausendfacher Vergrößerung (10 x 100) unter Ölimmersion.

Bei dieser Form der Differentialzählung werden innerhalb eines Dicken Tropfen insgesamt 200 asexuelle Parasiten gezählt und in die jeweilige Kategorie eingeteilt.

Es wird auch die sogenannte „cut-off Konzentration“, d.h. jene Medikamentkonzentration ermittelt, bei welcher die Parasitenpopulation jegliches Wachstum eingestellt hat (77).

Anschließend folgte die Auswertung bzw. Analyse mittels:

- Aufarbeitung und
- Probit- Analyse der erhaltenen Daten.

3.7.1 Aufarbeitung der Differentialzählungen

Als erster Schritt werden die erhaltenen Daten auf Validität (Gültigkeit) geprüft. Dabei werden die Prä- und Postinkubationspräparate bezüglich ihrer stadienspezifischen Zusammensetzung verglichen. Um die stadienspezifische Parasitenpopulation zu unterteilen wird der 48 Stunden Zyklus in sechs gleich große Abschnitte mit je acht Stunden gegliedert.

Diesen werden die Werte von eins bis sechs zugeordnet:

| | | |
|---------|---------|---------|
| 8h = 1 | 16h = 2 | 24h = 3 |
| 32h = 4 | 40h = 5 | 48h = 6 |

Der stadienspezifische Multiplikator ist das Produkt des stadienspezifischen Mittelwertes (in Stunden) multipliziert mit $1/8$, wodurch man für die einzelnen Stadien folgende Ergebnisse erzielt:

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| junge Trophozoiten: | 0,75 (6 x 1/8) |
| mittlere und ältere Trophozoiten: | 2,75 (22 x 1/8) |
| Präschizonten: | 4,5 (36 x 1/8) |
| Schizonten: | 5,5 (44 x 1/8) |

Die Werte 6, 22, 36 und 44 stehen für die Stunden nach erfolgter Merozoiteninvasion.

Der Populationsindikator, welcher sich aus der Summe der vier Kategorien zusammensetzt, entscheidet ob es sich um einen gültigen (valid) oder ungültigen (invalid) Test handelt.

Ausschlaggebende Kriterien für die Validität eines Tests :

- Der Populationsindikator im Präinkubations-Well darf nicht mehr als 400 Punkte ausmachen
- Der Populationsindikator im Postinkubations-Well A soll um mindestens 100 Punkte über dem Indikator des Präinkubations-Wells liegen.
- Der Populationsindikator in Well B soll unter dem Wert des in Well A liegen.
- In den Wells C - H soll ein eventueller Anstieg des Populationsindikators nicht mehr als 20% des Feldes davor, mit der geringeren Medikamenten-Konzentration überschreiten.

- In dem letzten Well vor der vollständigen Hemmung darf der Populationsindikator nicht höher als 80% des Populationsindikators in Well A sein (51).

3.7.2 Ablauf der Probit Datenanalyse

Die Auswertung der unterschiedlich starken Hemmung des Parasitenwachstums bei den einzelnen Medikamenten beruht auf dem Vergleich von Populationsindikatoren zwischen der Kontrollfeld (Well A) und den folgenden Medikamenten-Wellen.

Zur Auswertung und Verarbeitung der Rohdaten wurden zwei Computerprogramme entwickelt:

- Testevaluierungsprogramm
- log- Probit Calculus

Gestartet wird im Testevaluierungsprogramm für *P. vivax* mit der Eingabe der Rohdaten. Diese wären die im jeweiligen Well erhaltenen Daten für junge Trophozoiten, mittlere und reife Trophozoiten, Präschizonten und Schizonten, deren Summe 200 nicht überschreiten darf (und nötigenfalls Anteilentsprechend auf 200 reduziert wird). Durch das Programm wird geprüft ob die vorher erwähnten Kriterien für Validität eingehalten wurden.

Das, auf der Methode von Litchfield und Wilcoxon basierende Probit- Modell, ist ein Programm welches die statistische Auswertung und das Erstellen einer Regressionslinie ermöglicht.

Die hierfür verwendeten Daten sind die Ergebnisse aus der Differentialzählung. Dieses Verfahren wird für dosisabhängige Experimente mit log-normaler Verteilung der Resultate verwendet (70).

Die dadurch erhaltenen Ergebnisse können dann im zweiten Programm dem log-Probit Calculus weiter verarbeitet werden. Dieses Programm beruht, wie

bereits erwähnt auf dem Modell von Litchfield und Wilcoxon und wurde von 1995 von Wernsdorfer und Wernsdorfer für den Gebrauch am PC adaptiert. Die Logprobit-Methode dient dem Erfassen der IC-50, IC-90 und IC-99 Werte der Einzelisolate. Nach Eingabe der Daten führt das Programm eine Gewichtung durch. Es werden die Konzentrationsangaben in Logarithmen transformiert und die Inhibitionsangaben in Probits, anschließend berechnet das Programm die lineare Regression und deren Schlüsselparameter (51).

Wie bereits erwähnt, beruht die Analyse auf dem Vergleich zwischen den Populationsindikatoren zwischen dem Kontrollbereich (Well A) und den folgenden Feldern, welche unterschiedliche Konzentrationen der zu untersuchenden Medikamente aufweisen. Die konzentrationsabhängige Verteilung von *P. vivax* zeigt eine log-normale Verteilung und ermöglicht so das Anwenden der Litchfield & Wilcoxon Methode für die einzelnen Isolate und Isolatgruppen. Zur Anwendung am PC wurde die von Grab und Wernsdorfer im Jahre 1983, Wernsdorfer und Wernsdorfer 1995 adaptierte mathematische Methode angewandt (78, 79).

Die Ergebnisse der Zählungen der Wells B bis H werden relativ zur Kontrolle Well A (welches 100% ist) in Prozent ausgedrückt.

Die erhaltenen effektiven Konzentrationen (EC) ergeben sich durch das ausdrücken in einer linearen Regression der log- transformierten Konzentrations- und Probit- transformierten Inhibitionsdaten.

Die Werte (50, 90 und 99) hinter IC stehen für die Menge des Medikaments welche zur 50, 90 und 99 %iger Hemmung des Parasitenwachstums im Vergleich zu Well A führt (51).

In der Mikrobiologie sind die IC₅₀ Werte führende Parameter, bei der Testung der Arzneimittelempfindlichkeit sind aber die IC₉₀ und IC₉₉ Werte von größerer Bedeutung, denn sie erlauben Aussagen über die zu erwartende klinisch-parasitologische Wirkung. Die IC₉₉ entspricht bei Nicht- Immunen der für den Behandlungserfolg maßgebenden Mindestkonzentration (77).

3.8 Die statistische Auswertung

3.8.1 Vergleichsparameter

Das ursprüngliche Programm ermöglichte nicht den Vergleich von Regressionen, da es nur die wichtigsten Parameter für die Regression (a , b und χ^2) sowie die Schlüssel- IC-Werte (IC_{50} , IC_{90} und IC_{99}) lieferte. Durch die Adaption 1995 wurden neue, für den Vergleich wichtige, Parameter eingefügt. Die neuen Parameter sind (79):

f_{EC} = Multiplikations- bzw. Teilungsfaktor für die Errechnung der 95% Vertrauensgrenzen der einschlägigen IC-Werte

f_{EC-50}

f_{EC-90}

f_{EC-95}

f_{EC-99}

Die für die lineare Regression benötigten Schlüsselparameter wären folgende:

| |
|---|
| <p>n = Anzahl der getesteten Isolate a = Interzept der Regression b = Steigungswert der Regression/Grad der Hemmung r = Korrelationskoeffizient der Hemmung χ^2 = Chi- Quadrat, Wert für Heterogenität S = Slope Funktion, Steigungsindex A = intermediärer Term für die Kalkulation von f_s K = Anzahl der getesteten Medikamentenkonzentrationen N' = Anzahl der Datenpunkte zwischen EC_{16} und EC_{84} R = höchste bzw. niedrigste getestete Konzentration</p> |
|---|

Mit diesen Parametern ist es möglich die jeweilige Regression mit dem 95%-igen Zuverlässigkeitsbereich in Form einer Grafik darzustellen.

Der Faktor **n** steht für die Anzahl der getesteten Isolate, der verwendbaren Proben, **a** steht für das Interzept der Regression, **b** beschreibt die Steigungswert der Regressionsgeraden. Der Faktor **r** steht für den Korrelationskoeffizienten. Er ist identisch mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Wenn **r** gleich eins ist, dann sind Regressand und Regressor direkt proportional, wenn **r** gleich minus eins ist, so sind sie umgekehrt proportional und ist **r** gleich Null, dann sind sie linear unabhängig (unkorreliert).

Der Parameter χ^2 , stellt den Wert der Heterogenität dar, er entspricht der Summe der Quadrate der Abweichung der Datenpunkte von der errechneten Regressionslinie und gibt somit Auskunft über die Heterogenität der verwendeten Daten für das betreffende Medikament. Wenn χ^2 den Wert 11,070 bei einer siebengliedrigen Regression übersteigt ist dies ein Zeichen für eine signifikante Heterogenität. Ist dies der Fall, kann die Regression nicht für Vergleiche auf Parallelität oder Wirkungsgrad verwendet werden.

Der Parameter **S** gibt die Steigung der Regressionslinie an. Je niedriger der Wert ist, desto steiler ist der Anstieg der Linie und umso enger sind die einzelnen Werte um den Mittelwert verteilt.

A steht für den intermediären Term der Kalkulation von f_s .

Der Wert **K** steht für die Anzahl der getesteten Medikamentenkonzentrationen, **N'** steht für die Anzahl der Datenpunkte zwischen EC_{16} und EC_{84} .

Der Wert von **R** steht für die höchste bzw. die niedrigste getestete Konzentration.

Der Faktor von **S** beziehungsweise (f_s) gibt die 95%ige Vertrauensgrenze für die Steigung der Regression an.

Der Korrelationskoeffizient **r** drückt die Qualität der Übereinstimmung zwischen den ermittelten Datenpunkten und der Regressionsgeraden aus.

3.8.2 Vergleich der Regressionen

Das Vergleichen von zwei oder mehreren Regressionsgeraden und die longitudinale Überwachung der in vitro- Sensibilität ermöglichen es Entwicklungen in Richtung Resistenz rechtzeitig zu erfassen (77).

Es kann so die Wirkung eines Medikaments chronologisch verglichen und etwaige Resistenzentwicklung dokumentiert werden. Es gelingt damit auch, Sensibilitätsvergleiche zwischen verschiedenen Regionen bis hin zu Kontinenten zu erstellen. Es darf aber nur die Wirksamkeit des gleichen Medikaments, bzw. die Aktivität chemisch verwandter Präparate verglichen werden (79).

Zum Vergleichen von Regressionen benötigt man als ersten Schritt einen Test auf Parallelität.

Dabei wird die **Slope Ratio** ($SR = S_1 / S_2$) berechnet, sie stellt das Steigungsverhältnis der beiden Regressionen dar. S_1 ist der höhere Wert.

Der zweite wichtige Wert ist die **Slope function ratio** ($f_{SR} = \text{antilog} [(\log f_{S1})^2 + (\log f_{S2})^2]^{-0,5}$). Sie stellt den gemeinsamen Slope factor für zwei zu vergleichende Regressionen dar.

Ist der Slope function ratio Wert höher als die Slope Ratio, so können die beiden Regressionen innerhalb der 95 % Vertrauensgrenzen als parallel angesehen werden.

Daraufhin wird der Unterschied des Wirkungsgrads getestet. Hierbei sind wiederum zwei Werte von Bedeutung.

Als erstes sei die **Potency Ratio** ($PR = EC_{50-1} / EC_{50-2}$) zu erwähnen, bei welcher der Dividend wieder der höhere Wert ist.

Der zweite Wert ist der **Faktor von PR**, dieser ergibt sich aus folgender Formel: ($f_{PR} = \text{antilog} [(\log f_{EC50-1})^2 + (\log f_{EC50-2})^2]^{-0,5}$). Wenn der PR-Wert höher ist als der f_{SR} Wert, so weisen die EC_{50} - Werte und die dazugehörigen 95%igen Zuverlässigkeitsbereiche einen signifikanten Wirkungsunterschied auf ($p < 0,05$).

Die kann auch an anderen IC-Werten angewandt werden, jedoch müssen auch die dementsprechenden f_{EC} -Werte verwendet werden.

3.8.3 Vergleich der Korrelation der einzelnen Medikamente

Folgende Medikamente wurden korreliert:

ART- ATO

ART- DBB

ATO- DBB

Die Aktivitätskorrelation erfolgte nach der Pearson- Korrelations- Analyse.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich und Korrelation

Es wurden durch die Punktion der Fingerbeere 49 Patientenproben gewonnen. Davon stellten sich drei Proben als INVALID heraus. Diese bezogen sich auf die Isolate V-11, V- 21 und V- 40. Mit den übrigen wurde wie oben beschrieben verfahren und es wurden die, in den folgenden Punkten beschriebenen, Ergebnisse erzielt.

4.1.1 Artemisinin/ART

Es wurden insgesamt 46 (n) Präparate erfolgreich auf ihre Sensibilität gegenüber Artemisinin getestet.

Tabelle 1: Schlüsselparameter für Artemisinin aus dem Computerausdruck

| | | |
|-------------------|-------------|-----------------------------|
| n = 46 | S = 13,0010 | fs= 2,1478 |
| a = 4,2380 | A = 2,8511 | fEC ₋₅₀ = 1,8309 |
| b = 0,3877 | K = 7 | fEC ₋₉₀ = 3,2007 |
| r = 0,9961 | N' = 138 | fEC ₋₉₅ = 4,0506 |
| $\chi^2 = 0,4457$ | R = 1000 | fEC ₋₉₉ = 6,6563 |

| | |
|------------------|------------------|
| IC ₅₀ | 7,1368 nmol/l |
| IC ₉₀ | 194,5687 nmol/l |
| IC ₉₉ | 2879,2581 nmol/l |

Die Steigung der Regressionsgeraden (S) beträgt für Artemisinin 13,0010 und der Steigungswert (b) 0,3877. Die IC₅₀ und IC₉₀ Werte liegen mit 7,1368 und 194,5687 nmol pro Liter BMM relativ weit auseinander und deuten damit auch auf eine flache Steigung der Regressionsgeraden hin. Der χ^2 Wert, welcher bei

einer siebengliedrigen Regression maximal 11,07 betragen darf liegt mit 0,4457 weit unter dieser Höchstgrenze und zeigt dass die Datenpunkte eine gute Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden aufweisen.

Der Wert a , das Interzept der Regression liegt bei 4,2380 und der Korrelationskoeffizient, welcher maximal eins betragen kann, liegt bei 0,9961 und weist auf eine log-normale Verteilung mit nahezu idealer Übereinstimmung zwischen den Datenpunkten und der Regressionsgeraden hin.



Abbildung 6: Sensibilität von *Plasmodium vivax* gegenüber Artemisinin 2007

Die Abbildung zeigt die Regressionsgerade der Sensibilität von *P. vivax* gegenüber Artemisinin ermittelt mittels Logprobit mit 95%iger Vertrauensgrenze. Der Wert der Y-Achse (GI) steht für die Hemmung des Parasitenwachstums.

4.1.2 ART (2007)- ART (2004)

Bei einer Untersuchung aus dem Jahre 2004 (die Daten wurden von Hr. Prof. Wernsdorfer zur Verfügung gestellt) ergaben sich für Artemisinin folgende Werte:

| | |
|------------------|------------------|
| IC ₅₀ | 17,1555 nmol/l |
| IC ₉₀ | 282,3512 nmol/l |
| IC ₉₉ | 2769,0524 nmol/l |

Werte von 2007:

| | |
|------------------|------------------|
| EC ₅₀ | 7,1368 nmol/l |
| EC ₉₀ | 194,5687 nmol/l |
| EC ₉₉ | 2879,2581 nmol/l |

Die Werte für IC₅₀ und IC₉₀ lagen bei den Proben von 2004 höher als die Werte welche für die Präparate von 2007 erzielt wurden. Der IC₉₉ Wert lag 2007 höher als 2004.

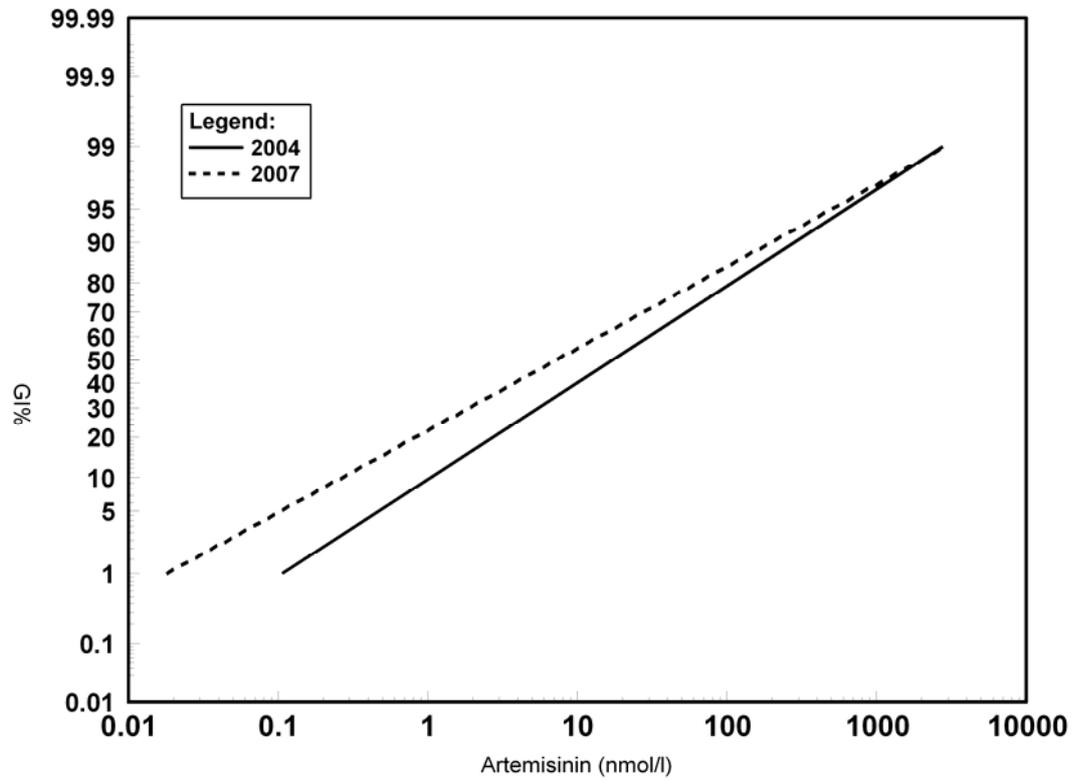


Abbildung 7: Sensibilität von *Plasmodium vivax* gegenüber Artemisinin 2004 und 2007

4.1.3 Desbutyl- Benflumentol/ DBB

Es wurden insgesamt 46 (n) Präparate erfolgreich auf ihre Sensibilität gegenüber Desbutyl- Benflumentol getestet.

Tabelle 2: Schlüsselparameter für Desbutyl- Benflumentol aus dem Computerausdruck

| | | |
|-------------------|-------------|-----------------------------|
| n = 46 | S = 15,6717 | fs = 2,4106 |
| a = 4,3673 | A = 3,3397 | fEC ₋₅₀ = 1,9134 |
| b = 0,3614 | K = 7 | fEC ₋₉₀ = 3,7250 |
| r = 0,9958 | N' = 138 | fEC ₋₉₅ = 4,9047 |
| $\chi^2 = 0,4333$ | R = 1000 | fEC ₋₉₉ = 8,7332 |

| | |
|------------------|------------------|
| IC ₅₀ | 5,7592 nmol/l |
| C ₉₀ | 199,7534 nmol/l |
| IC ₉₉ | 3596,9616 nmol/l |

Die Steigung der Regressionsgeraden (S) beträgt für Desbutyl-Benflumentol 15,6717 und der Steigungswert (b) 0,3614. Die EC₅₀ und EC₉₀ Werte liegen mit 5,7592 und 199,7534 nmol pro Liter BMM relativ weit auseinander und deuten damit auch auf eine flache Steigung der Regressionsgeraden hin. Der χ^2 Wert, welcher bei einer siebengliedrigen Regression maximal 11,07 betragen darf liegt mit 0,4333 weit unter dieser Höchstgrenze und zeigt dass die Datenpunkte eine gute Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden aufweisen.

Der Wert a, das Interzept der Regression liegt bei 4,3673 und der Korrelationskoeffizient r, welcher maximal eins betragen kann, liegt bei 0,9958, auch in diesem Fall liegt eine log-normale Verteilung vor.

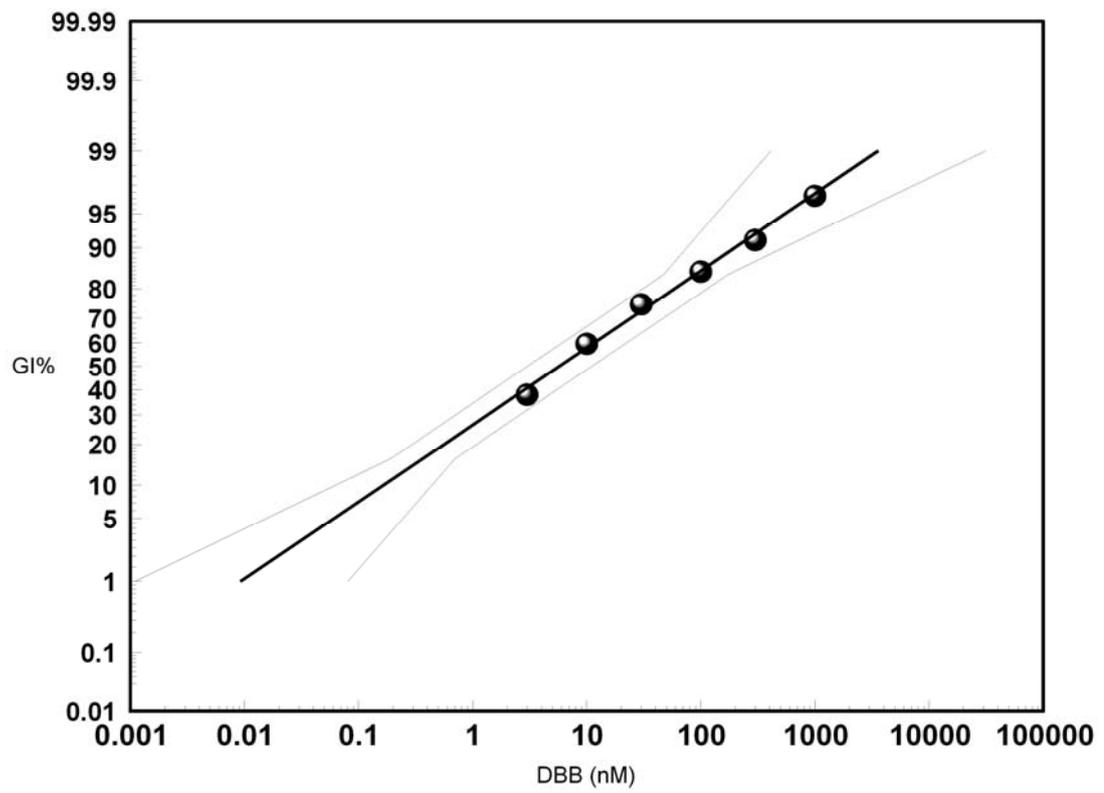


Abbildung 8: Sensibilität von *Plasmodium vivax* gegenüber DBB 2007

4.1.4 Atovaquon/ ATO

Es wurden insgesamt 46 (n) Präparate erfolgreich auf ihre Sensibilität gegenüber Atovaquon getestet. Die Medikamentenkonzentrationen betragen 3, 10, 30, 100, 300, 1000 und 3000 nmol/l.

Tabelle 3: Schlüsselparameter für Atovaquon aus dem Computerausdruck

| | | |
|-------------------|-------------|----------------------------|
| n = 46 | S = 13,3346 | fs = 1,9644 |
| a = 4,1209 | A = 2,9110 | fEC ₅₀ = 1,6972 |
| b = 0,3839 | K = 7 | fEC ₉₀ = 2,7866 |
| r = 0,9945 | N' = 184 | fEC ₉₅ = 3,4324 |
| $\chi^2 = 0,6548$ | R = 1000 | fEC ₉₉ = 5,3256 |

| | |
|------------------|------------------|
| IC ₅₀ | 9,8725 nmol/l |
| IC ₉₀ | 278,0838 nmol/l |
| IC ₉₉ | 4226,1303 nmol/l |

Die Steigung der Regressionsgeraden (S) beträgt für Atovaquon 13,3346 und der Steigungswert (b) 0,3839. Die EC₅₀ und EC₉₀ Werte liegen mit 9,8725 und 278,0838 nmol pro Liter BMM relativ weit auseinander und deuten damit auch auf eine flache Steigung der Regressionsgeraden hin. Der χ^2 Wert, welcher bei einer siebengliedrigen Regression maximal 11,07 betragen darf liegt mit 0,6548 weit unter dieser Höchstgrenze, aber ist geringfügig höher, als bei den beiden anderen Medikamenten. Er zeigt dass die Datenpunkte eine gute Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden aufweisen.

Der Wert a, das Interzept der Regression liegt bei 4,1209 und der Korrelationskoeffizient, welcher maximal eins betragen kann, liegt bei 0,9945 und man kann wieder von einer log-normalen Verteilung sprechen.

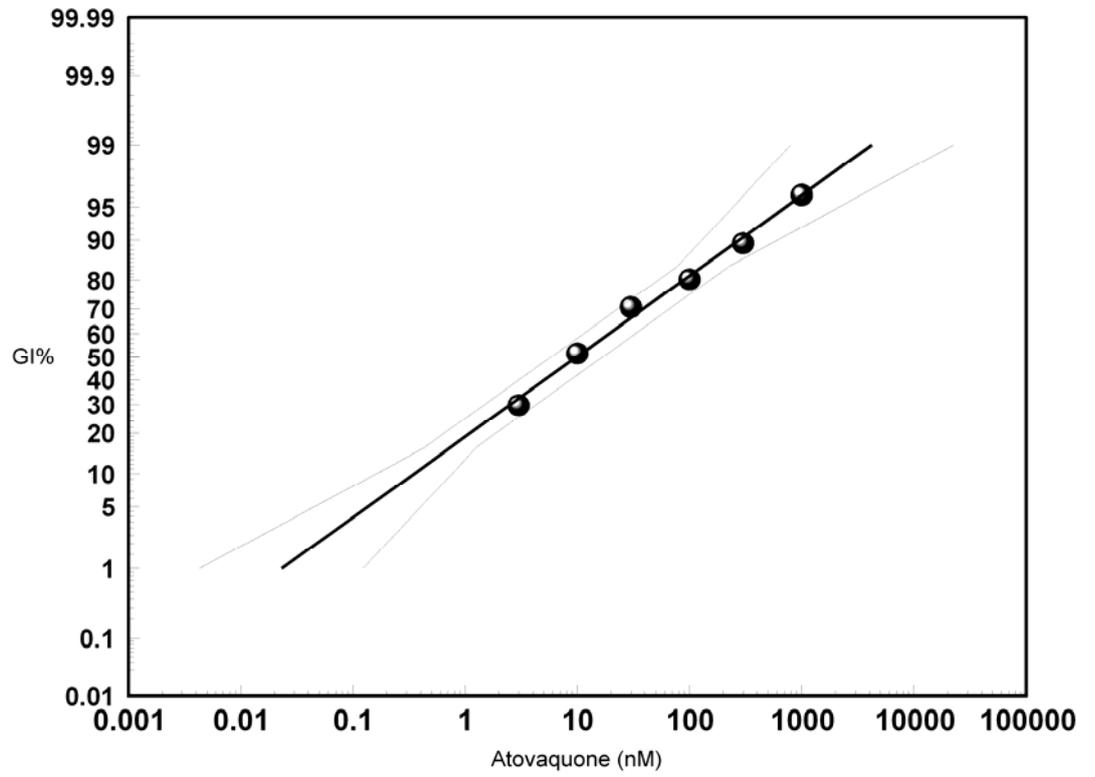


Abbildung 9: Sensibilität von *Plasmodium vivax* gegenüber Atovaquon 2007

4.1.5 Korrelation zwischen Artemisinin und Desbutyl- Benflumentol

Die Korrelationsanalyse nach Pearson wurde mit einer Anzahl von 46 Präparaten bei beiden Medikamenten durchgeführt.

Folgende Werte ergaben sich für die Korrelation zwischen Artemisinin und Desbutyl- Benflumentol:

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| ART- DBB IC ₅₀ | r= 0,158754533 p = 0,2585 |
| ART- DBB IC ₉₀ | r= 0,261664681 p = 0,0873 |
| ART- DBB IC ₉₉ | r= 0,036254859 p = 0,4307 |

An Hand der direkten Messwerte konnte keine Wirkungskorrelation zwischen den beiden Medikamenten festgestellt werden.

In Anbetracht der log-normalen Verteilung der Messwerte wurden letztere log-transformiert. Deren Prüfung auf Korrelation ergab folgende Resultate::

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| ART- DBB IC ₅₀ | r= 0,089053706 p = 0,3870 |
| ART- DBB IC ₉₀ | r= 0,33895706 p = 0,0226 |
| ART- DBB IC ₉₉ | r= 0,364381564 p = 0,0137 |

Hier ergab sich signifikante Korrelation bei IC₉₀ und IC₉₉.

4.1.6 Korrelation zwischen Artemisinin und Atovaquon

| | | |
|---------------------------|-----------------|------------|
| ART- ATO EC ₅₀ | r= -0,012120508 | p = 0,4272 |
| ART- ATO EC ₉₀ | r= 0,263966494 | p = 0,0791 |
| ART- ATO EC ₉₉ | r= 0,21619742 | p = 0,1466 |

Die Korrelationen zwischen den Messwerten für Artemisinin und Atovaquon lagen unterhalb der Signifikanzgrenze.

Auch hier wurden die Korrelation mit den log-transformierten Messwerten erneut berechnet, da letztere eine log-normale Verteilung zeigten. Resultate:

| | | |
|---------------------------|----------------|------------|
| ART- ATO EC ₅₀ | r= 0,279968091 | p = 0,0724 |
| ART- ATO EC ₉₀ | r= 0,504435262 | p = 0,0004 |
| ART- ATO EC ₉₉ | r= 0,502474928 | p = 0,0004 |

Bei den logarithmierten Werten sieht man eine hoch signifikante Korrelation zwischen Artemisinin und Atovaquon bei den IC₉₀ und IC₉₉ Werten.

4.1.7 Korrelation zwischen Atovaquon und Desbutyl- Benflumentol

| | | |
|---------------------------|----------------|------------|
| ATO- DBB EC ₅₀ | r= 0,455842403 | p = 0,0016 |
| ATO- DBB EC ₉₀ | r= 0,01205837 | p = 0,4271 |
| ATO- DBB EC ₉₉ | r= 0,010714659 | p = 0,4265 |

Die Korrelation zwischen den direkten Messwerten für Atovaquon und Desbutyl-Benflumentol ergab Signifikanz.

Die erneute Korrelationsberechnung mit den log-transformierten Werten für Atovaquon und DBB ergab Signifikanz bei sämtlichen IC-Stufen:

| | | |
|---------------------------|----------------|------------|
| ATO- DBB EC ₅₀ | r= 0,315993741 | p = 0,0344 |
| ATO- DBB EC ₉₀ | r= 0,408124781 | p = 0,0052 |
| ATO- DBB EC ₉₉ | r= 0,314055948 | p = 0,0356 |

4.1.8 Vergleich der geometrischen Mittelwerte der EC Werte aller drei Medikamente (Werte in nM)

| | ART | DBB | ATO |
|------|------------------|---------------|-----------|
| EC50 | 8,6912 | 5,7152 | 9,8963 |
| EC90 | 121,0413 | 160,1376 | 233,3652 |
| EC99 | 1036,0095 | 2423,3114 | 2965,6213 |

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der ECs zeigt sich, dass die IC₅₀ für DBB am niedrigsten ist, ansonsten liegen aber die Werte für Artemisinin unter den Konzentrationen der beiden anderen Medikamente. Atovaquon zeigt bei allen drei ICs die höchsten benötigten Konzentrationen.

4.1.9 Die Mittelkonzentration für volle Wachstumshemmung (MCOC)

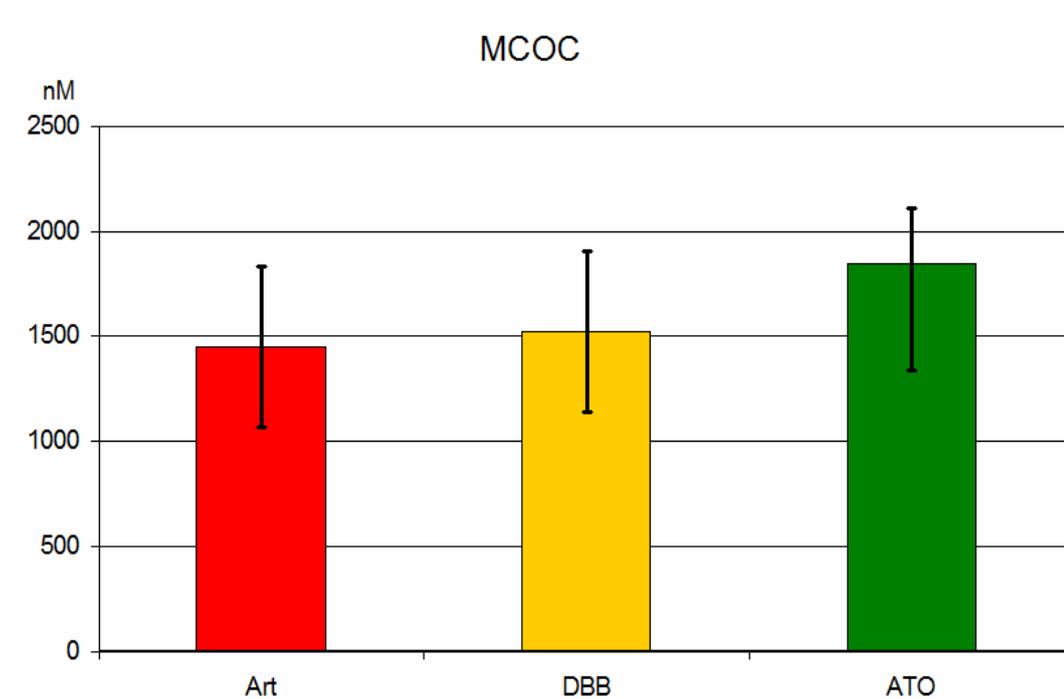


Abbildung 10: MCOC aller drei Medikamente

Die Mittelkonzentrationen für volle Wachstumshemmung durch Artemisinin (1448,91 nM), Desbutyl-Benflumetol (1522,39 nM) und Atovaquon (1844,48 nM) liegen relativ eng beisammen und noch immer im therapeutisch möglichen Bereich.

5 Diskussion

In dieser Studie wurden insgesamt 46 Patientenproben von 48 ursprünglich angesetzten Isolaten erfolgreich auf ihre in vitro Sensibilität gegenüber Artemisinin, Desbutyl-Benflumentol und Atovaquon geprüft. Die Erfolgsrate von 96 % ist hoch.

Für Artemisinin wurden auch Vergleichsdaten aus dem Jahr 2004 zu Verfügung gestellt. Es zeigte sich, dass die IC_{50} und IC_{90} Werte für die getesteten Präparate von 2004 höher lagen, jedoch lag der IC_{99} Wert 2007 höher.

Der IC_{50} Wert lag 2004 bei 17,1555 nmol/l und im Jahr 2007 bei 7,1368 nmol/l. Diese Entwicklung zeigt sich auch in einer Abflachung der Regressionsgeraden, Sie weist auf eine weitere, bevorstehende Verschlechterung der Sensibilität hin. In der Korrelation mit den anderen Medikamenten sieht man für Artemisinin vor allem bei den log-transformierten Werten eine Korrelation mit den Medikamenten Atovaquon und Desbutyl- Benflumentol.

Der Korrelationskoeffizient der log-transformierten IC_{50} Werte lag für Artemisinin und Atovaquon bei 0,2800 und damit knapp unter der Signifikanzgrenze, noch betonter für Artemisinin und Desbutyl-Benflumentol. Bei der Korrelation von Desbutyl-Benflumentol und Atovaquon liegt er bei 0,3160 und somit im signifikanten Bereich ($p = 0,0344$)

Bei den IC_{90} und IC_{99} Werten lagen alle Korrelationen mit Artemisinin über der Signifikanzgrenze ($p < 0,05$).

Es liegt zwischen den drei getesteten Medikamenten keine enge strukturelle Verwandtschaft vor, trotzdem sind diese Ergebnisse möglicherweise auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus zurückzuführen. Hier ist zu erwähnen, dass Atovaquon und Desbutyl-Benflumentol als Klasse-2 Blutschizontozide eingestuft sind. Es ist auch bekannt, dass Artemisinin und andere Klasse-2 Blutschizontozide, z.B. Mefloquin, signifikante Wirkungskorrelation zeigen. Dies könnte auch darauf hinweisen, dass man mit Kreuzresistenzen bei Artemisinin rechnen muss.

Bei Atovaquon zeigte sich auch bei den nicht log-transformierten IC_{50} Werten, aber nur bei diesen, ein deutlich über der Signifikanzgrenze liegender Wert für die Korrelation mit Desbutyl-Benflumentol ($p = 0,0016$). Werden die log-transformierten Werte für Atovaquon und Desbutyl-Benflumentol korreliert, so liegen alle Korrelationskoeffizienten deutlich über der Signifikanzgrenze.

Das geometrische Mittel der IC_{50} Werte lag für Desbutyl-Benflumentol unter jenem der beiden anderen getesteten Medikamente, jedoch waren die IC_{90} und IC_{99} Werte für Artemisinin die geringsten. Somit zeigt *P. vivax* gegenüber Artemisinin eine auf mol/mol Basis höhere Sensibilität, als gegenüber Atovaquon oder Desbutyl-Benflumentol.

Der Steigungsindex der Regressionsgeraden liegt für Artemisinin und Atovaquon bei 13,0010 und 13,3346, diese Werte sind recht ähnlich. Bei Desbutyl- Benflumentol liegt er höher, bei einem Wert von 15,6717. Auch der Grad der Steigung (b) ist bei allen drei Medikamenten in etwa gleich, was zu sehr ähnlichen Regressionsgeraden führt.

6 Zusammenfassung

Die Malaria ist wohl so alt wie die Menschheit selbst und wurde in zahlreichen alten Schriften erwähnt, jedoch entdeckte man erst 1880 die wahre Ursache der immer wiederkehrenden Fieberschübe. Laveran schloss von den in den Erythrozyten gefundenen Pigmenten auf einen parasitären Erreger.

Auch die Therapie der Malaria hat eine lange Geschichte und einige Medikamente, welche schon in alten Kulturen verwendet wurden, zeigen in vielen Regionen immer noch Wirkung.

Heute jedoch sieht man sich mit dem Problem zunehmender Resistenz der Malariaerreger gegen gängige Malariamittel konfrontiert. Daher sind *in vitro* Methoden für die Messung der Arzneimittelempfindlichkeit und ihr Einsatz in deren Überwachung ein wichtiges Werkzeug in der Malariabekämpfung geworden.

Diese *in vitro* Studie über die Arzneimittelempfindlichkeit von *Plasmodium vivax* im Nordwesten Thailands wurde 2009/2010 in Wien anhand von Material aus Mae Sot durchgeführt. Insgesamt wurden 46 Patientenproben erfolgreich auf ihre *in vitro* Sensibilität gegenüber den Präparaten Artemisinin, Atovaquon und Desbutyl-Benflumentol getestet. Dies wurde mittels des speziell für *Plasmodium vivax* entwickelten Testverfahrens von Tسانور *et al.* (2002) durchgeführt.

Für Artemisinin wurden von Herrn Prof. Wernsdorfer Vergleichsdaten aus dem Jahr 2004 zu Verfügung gestellt. Beim Vergleich der Parameter der beiden Jahre zeigte sich, dass die IC_{50} und IC_{90} Werte für die getesteten Präparate von 2004 höher lagen, jedoch lag der IC_{99} Wert von 2007 höher als jener von 2004. Die Verringerung der Artemisininempfindlichkeit drückt sich auch in der Abflachung der Regressionsgeraden aus. Dies weist auf eine Verschlechterung der Sensibilität gegenüber Artemisinin hin.

Die Korrelation mit den anderen Medikamenten zeigt bei den log-transformierten Messdaten Signifikanz zwischen der Aktivität von Artemisinin und den Medikamenten Atovaquon und Desbutyl- Benflumentol.

Der Korrelationskoeffizient der IC_{50} Werte lag für die log-transformierten Daten für Artemisinin und Atovaquon knapp unter der Signifikanzgrenze. Für Artemisinin und Desbutyl-Benflumetol lag er weit unter der Signifikanzgrenze. ebenso bei Artemisinin und Desbutyl-Benflumentol, während die Ergebnisse für Atovaquon und Desbutyl-Benflumetol signifikant korrelierten,

Mit den log-transformierten IC_{90} und IC_{99} Werten lagen die Korrelationskoeffizienten sämtlicher Vergleiche zwischen Artemisinin, Atovaquon und Desbutyl-Benflumetol über der Signifikanzgrenze ($p < 0,05$).

Zwischen den drei getesteten Medikamenten liegt keine enge strukturelle Verwandtschaft vor, doch gelten Atovaquon und Desbutyl-Benflumetol als Klasse-2 Blutschizontozide und Artemisinin hat Wirkungskorrelation mit anderen Klasse-2 Blutschizontoziden. Daher sind diese Ergebnisse möglicherweise auf eine ähnliche Wirkungsweise zurückzuführen. Es könnte auch ein Indiz dafür sein, dass man mit Kreuzresistenzen bei Artemisinin rechnen muss.

Auf molarer Basis lag der Mittelwert der IC_{50} für Artemisinin zwischen jenen der beiden anderen getesteten Medikamente, die IC_{90} und IC_{99} Werte für Artemisinin waren jedoch die geringsten. Am höchsten waren die IC-Werte für Atovaquon.

Der Steigungsindex der Regressionsgeraden liegt für Artemisinin und Atovaquon bei 13,0010 und 13,3346, diese Werte sind sehr ähnlich. Bei Desbutyl- Benflumentol liegt er nur wenig höher, bei einem Wert von 15,6717. Auch der Grad der Steigung (b) ist bei allen drei Medikamenten in etwa gleich, was zu ähnlich steilen Regressionsgerade führt.

7 Literaturverzeichnis

1. **Webb**, J. L. A. Jr., (2009): *Humanity's Burden: A Global History of Malaria* (Studies in Environment and History), Cambridge University Press.
2. **Lambert**, P. H., (2003): *Malaria: Past and Present*, http://nobelprize.org/educational_games/medicine/malaria/readmore/history.html, DOR: 29.12.2009.
3. **Cornejo**, O. E. u. **Escalante**, A. A., (2006): The origin and age of *Plasmodium vivax*, *Trends in Parasitology* 22, 558- 563.
4. **Poser**, C. M. u. **Bruyn**, G. W. (1999): *An illustrated history of malaria*, Parthenon Publishing.
5. **Kramar**, T. (2010): Tutanchamun wurde nicht ermordet, <http://diepresse.com/home/science/540218/index.do> DOR: 19.02.2010.
6. **Dönges**, J. (1980): *Parasitologie*, Thieme Verlag.
7. **Herberth**, K. (2004): Paläopathologische Untersuchungen zur chronischen Anämie mit molekularer Analyse von aDNA zum Plasmodien- Nachweis (Malaria) in Skelettmaterial aus dem 15. –18. Jahrhundert aus Süddeutschland (Rain am Lech), http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=97406291x&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=97406291x.pdf DOR: 11.01.2010.
8. Laveran an the Discovery of the Malaria Parasite, <http://www.cdc.gov/malaria/history/laveran.htm> DOR: 11.01.2010

9. **Sherman**, I. W. (2008): Advances in Parasitology- Reflections on a century of malaria biochemistry, ACADEMIC PR INC.

10. **Lucius**, R. u. **Loos- Frank**, B. (2008): Biologie der Parasiten, Springer-Verlag, 2.Auflage, Seite 214- 215.

11. **Stich**, A. u. **Schlitzer**, M. (2008): Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria, Chemotherapie Journal, 17. Jahrgang, Heft 2 , 37- 56.

12. **Stemberger**, H. (1987): Protozoeninfektionen des Menschen, Maudrich Verlag.

13. **WHO**: World Malaria Report 2008,
<http://www.malaria.org/malaria2008.pdf> DOR: 30.03.2010

14. **WHO**: World Malaria Report 2009,
http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf
DOR: 30.03.2010

15. **WHO** (2009): Fact sheet N° 94,
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>, DOR:
11.01.2010)

16. **Mendis**, K., **Sina**, B., **Marchesini**, P. u. **Carter**, R. (2001): The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria, Am. J. Med. Hyg., 64(1, 2), 97-106.

17. **Wildner**, R. K. (2007): Malaria - Tatsachen, Historie und Gegenmittel, 18.07.2007,
<http://www.hcberlinpharma.de/de/presse/23-malaria-tatsachen-historie-und-gegenmittel--18072007.html> , DOR: 11.01.2010

18. **Gallup**, J. L. u. **Sachs**, J. D. (2001): The economic burden of malaria, *American Journal of Tropical Hyg.*, 64, 85-96.
19. **Kayser**, F. H., **Böttger**, E. C., **Zinkernagel**, R. M., **Haller**, O., **Eckert**, J., **Deplazes**, P. (2005): *medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag, 11.Auflage.
20. **Hille-Rehfeld**, A. (2007): Malariafieber: Hämozoïn als DNA-Fährte, *Biol. Unserer Zeit*, 3/2007(37), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
21. **Galinski**, M. R., **Barnwell**, J. W. (2008): *Plasmodium vivax*: who cares?, *Malaria Journal* , 9.
22. **Ceravolo**, I. P., **Bruno-Romero**, O., **Bragea**, E. M., **Fontes**, C. J. F., **Brito**, C. F. A., **Souza**, J. M., **Krettli**, A. U., **Adams**, J.H. u. **Carvalho**, L. H. (2005): Anti- *Plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the brazilian amazon, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(6), 675- 681
23. **Morel**, C. M., **Thang**, N. D., **Xuan Xa**, N., **Xuan Hung**, L., **Khan Thuan**, L., **Van Ky**, P., **Erhart**, A., **Mills**, A. J. u. **D'Alessandro**, U. (2008): The economic burden of malaria on the household in south-central Vietnam, *Malaria Journal* 2008, 7, 166.
24. **Severinia**, C., **Menegona**, M., **Lucaa**, M. D., **Abdullaevb**, I., **Majoria**, G., **Razakovb**, S. A. u. **Gradonia** L. (2004): Risk of *Plasmodium vivax* malaria reintroduction in Uzbekistan: genetic characterization of parasites and status of potential malaria vectors in the Surkhandarya region, *Elsevier the transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene*, Volume 98, 585-592.

25. **Park, J., Gyo Jun, G., u. Yeom, J.** (2009): *Plasmodium vivax* Malaria: Status in the Republic of Korea Following Reemergence, Korean J Parasitol., Vol. 47, 39-50.
26. **Zhao, C.** (1989): Untersuchungen zur Wirkung L. auf chloroquinsensible und Malariaparasiten, Journal of Tongji Medical University 9(1): 22-24.
27. **Zhao, C.** (1989): Untersuchungen zur Wirkung von Pasta ulmi auf Malariaparasiten, Journal of Tongji Medical University 9(1),22-24,
28. **Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U. u. Starke, K.** (2001): Allgemein und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban und Fischer Verlag, 8. Auflage, 916.
29. **Rieckmann, K. H., Davis, T. M. u. Hutton, B.:** *Plasmodium vivax* resistance to Chloroquine?, The Lancet, Volume 334, 1183- 1184.
30. **Baird, J. K.** (2004): Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 48, 4075- 4083.
31. **Srivastasa, H. C., Yadav, R. S., Joshi, H., Valecha, N., Mallick, P. K., Prajapati, S. K. u. Dash, A. P.** (2008): Therapeutic responses of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to chloroquine, in an area of western India where *P. vivax* predominates, Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 102, nr. 6, 471-480.
32. **Maguire, S., Krisin, S., Marwoto, W., Richie, J. P. Jr., Fryauff, D. u. Baird, T.** (2006): Mefloquine Is Highly Efficacious against Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax* Malaria and *Plasmodium falciparum* Malaria in Papua, Indonesia, Clinical Infectious Diseases 42, 1067- 1072.
33. **Daunerer, M.:** Klinische Toxikologie, 144. Erg.- Lfg. 4/00 Seite 53

34. **Reddy, P. u. Flaherty, J. P.** (2006): *Plasmodium vivax* Malaria Relapses after Primaquine Prophylaxis, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 12, No. 11.
35. **Vinetz, J.** (2006): Emerging Chloroquine- Resistant *Plasmodium vivax* (Bening Tertian) Malaria: The Need for Alternative Drug Treatment, *Clinical Infectious Diseases* 42, 1073- 1074
36. **Radek, R.** (2009): Acidocalcisomen, Mitosomen und Apicoplasten. Neu entdeckte Zellorganellen, *Biologie unserer Zeit* Vol. 39, 242- 248.
37. **White, N. J. u. Pontavornpinyo, W.** (2003): The de novo selection of drug- resistant malaria parasites, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270, 545- 554.
38. **May, J.:** Die ideale Malariaprophylaxe ist noch nicht gefunden, <http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/1596.php> DOR: 26.01.2010
39. **Miksits, K., Großgebauer, K. u. Hahn, H.** (1992): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag, 192.
40. **Imwong, M., Snounou, G., Pukrittayakamee, S., Tanomsing, N., Kim, J. R., Nandy, A., Guthmann, J. P., Nosten, F., Carlton, J., Looareesuwan, S., Nair, S., Sudimack, D., Day, N. P. J., Anderson, T. J. C. u. White N. J.** (2007): Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites, *The Journal of Infectious Diseases*, 195, 927- 933.
41. **Roche** Lexikon Medizin, Urban& Fischer, 5. Auflage, Seite 908

42. **Whitby**, M. (1997): Drug resistant *Plasmodium vivax* malaria, The British Society for Antimicrobial Chemotherapy Nr. 40, 749- 752.
43. **Korenromp**, E. L., **Williams**, B. G., **Gouwx**, E., **Dye**, C. u. **Snow**, R. W.(2003): Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy, The Lancet Infectious Diseases, Vol. 3, 349- 358.
44. **Schwöbel**, B. (2004): *Plasmodium falciparum*: Resistenzbestimmung durch molekulare Resistenzmarker sowie in vivo Sensitivitätstests, Dissertation, Universitätsbibliothek München.
45. **White**, N.J. (2002): The assessment of antimalarial drug efficacy, Trends in Parasitol., No. 18, 458- 464.
46. **White**, N. J. (2004): Antimalarial drug resistance“, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 113, Issue 8, 1084-1092.
47. **Giglioli**, G., **Rutten**, F. J. u. **Ramjattan**, S. (1967): Interruption of malaria transmission by chloroquinized salt in Guyana“, Bull World Health Organ, 36(2), 283–301.
48. **WHO**: “Global malaria control and elimination: report of a meeting on containment of artemisinin tolerance”
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596817_eng.pdf
 DOR: 19.01.2010
49. **Davidson**, R. J., **Davis**, I., **Willey**, B. M., **Rizg**, K., **Bolotin**, S., **Porter**, V., **Polsky**, J., **Daneman**, N., **Mc Geer**, A., **Yang**, P., **Scolnik**, D., **Rowell**, R., **Imas**, O. u. **Silverman**, M. S. (2008): Antimalarial therapy selection for quinolone resistance among *Escherichia coli* in the absence of quinolone exposure, in tropical South America, PLoS One. 2008 Jul 16; 3(7):e2727.

50. **Rathod, P. K., Mc Erlean, T. u. Lee, P. C.** (1997): Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*, Proc. Natl. Acaad. Sci., Vol. 94, 9389-9393.
51. **Tasanor, O., Noedl, H., Na- Bangchang, K., Congpuong, K., Sirichaisinthop, J., Wernsdorfer, W. H.** (2002): An in vitro system for assessing the sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine, Acta Tropica 83, 49-61.
52. **Dua, V.K., Kar, P. K. u. Sharma, V. P.** (1996): Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria, Tropical Medicine and International Health, Vol. 1, no. 6, 816- 819.
53. **Phan, G. T., de Vries, P. J., Tran, B. Q., Le, H. Q., Nguyen, N. V ., Nguyen, T. V., Heisterkamp, S. H. u. Kager, P. A.** (2002): Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam, Tropical Medicine and International Health, Vol. 7, 858- 864.
54. **Woitsch, B., Wernsdorfer, G., Congpuong, K., Rojanawatsirivet, C., Sirichaisinthop, J., Wernsdorfer, W. H.** (2004): Susceptibility to chloroquine, mefloquine and artemisinin of *Plasmodium vivax* in northwestern Thailand, Wiener Klinische Wochenschrift 119, 76- 82.
55. **Tasanor, O., Ruengweerayuth, R., Sirichaisinthop, J. , Congpuong, K. , Wernsdorfer, W. H. u. Na- Bangchang, K.** (2006): Clinical-parasitological response and in-vitro sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine and quinine on the western border of Thailand, Elsevier the transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene, Volume 100, Issue 5, 410-418

56. **Wernsdorfer, W. H., Congpuong, K., Sirichaisinthop, J., Wernsdorfer, G.** (2007): Drug Sensitivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the area of Mae Sot, Tak Province, northwestern Thailand, *Tropical Medicine and Health*, Vol. 35, 1- 9.
57. **Guthmann, J. P, Pitte, A., Lesage, A.** (2008): *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Dawei, southern Myanmar, *Tropical Medicine and International Health*; Volume 13, 91–98.
58. **Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M. Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P. J., Lindegardh, N., Socheat, D. u. White, N. J.** (2009): Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria, *The new England journal of medicine*, 361; 445- 467
59. **WHO:** „Drug resistance could set back malaria control success” DOR: 15.01.2010
http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/malaria_drug_resistance_20090225/en/index.html
60. **Alecrim, M., Alecrim, W. u. Macêdo, V.** (1999): *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine(R2) and mefloquine(R3) in brazilian Amazon Region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(1), 67-68.
61. **Maquire, J. D., Krisin, Marwoto, H., Richie, T. L., Fryauff, D. J. u. Baird, J. K.** (2006): Mefloquine is highly efficacious against Chloroquine-Resistent *Plasmodium vivax* Malaria and *Plasmodium falciparum* Malaria in Papua, Indonesia. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 1067- 1072.

62. <http://www.landkarte-online.net/landkarte-land.php/landkarte-thailand>
DOR: 06.02.2010
63. **Pröll, P.** (2009): "Synergism of pyronaridine and retinol against *P. falciparum* in vitro". Diplomarbeit (Humanmedizin Dipl. ZI 08/09-043), Medizinische Universität Graz.
64. **Congpuong, K., Na- Bangchang, K., Thimasarn, K., Tasanor u. Wernsdorfer, W. H.** (2002): Sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine in Sa Kaeo Province, Thailand, Elsevier Science B.V., Acta Tropica83, 117- 121.
65. THAILAND - Mae Sot ICT to fight malaria for Myanmar refugees
<http://www.tsfi.org/en/action/development/95-thailande-mae-sot-refugies-birmans-les-tic-contre-la-malaria-> DOR 05.02.2010
66. **Ettling, M. B., Thimasarn, K., Krachaiklin, S. u. Bualombai, P.** (1991): Malaria clinics in Mae Sot, Thailand: factors affecting clinic attendance. Bull World Health Organ. 467–476.
67. „Artemisinin in Wermut oder Beifuß: Gegen Malaria, aber auch Hoffnung in der Krebsheilkunde“ http://pharmazie-medikamente.suite101.de/article.cfm/artemisinin_in_wermut_oder_beifus s#ixzz0efcRXnfT DOR: 11.10.2009
68. **Chen, T., Mian, L., Ruiwen, Z. u. Wang, H.** (2009): Dihydroartemisinin Induces Apoptosis and Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Carboplatin Therapy, Journal of Cellular and Molecular Medicine, Volume 13, Number 7, 1358-1370.
69. **Du, J., Zhang H., Ma, Z. u. Ji, K.** (2009): Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer

xenografts in vivo, *Cancer Chemother Pharmacol*, DOI 10.1007/s00280-009-1095-5.

70. **Noedi, H., Allmendinger, T., Prajakwong, S., Wernsdorfer, G. u. Wernsdorfer W. H.** (2001): Desbutyl-Benflumetol, a Novel Antimalarial Compound: In Vitro Activity in Fresh Isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Vol. 45, No. 7, 2106–2109.
71. **Samal, D., Rojanawatsirivet, C., Wernsdorfer, G., Kollaritsch, H., Sirichaisinthop, J. u. Wernsdorfer, W. H.** (2005): Synergism of desbutyl-benflumetol and retinol against *Plasmodium falciparum* in vitro, *Wien Klin. Wochenschr.* 117 [Suppl 4]: 39–44; DOI 10.1007/s00508-005-0446-4;
72. **Bass, C. C. u. Johns, F. M.** (1912): The cultivation of Malaria Plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*) in vitro", *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 16, 567- 579.
73. **Trager W. u. Jensen, J. B.** (1976): Human malaria parasites in continuous culture, *Science*, No 193(4254), 673- 675.
74. <http://wwwuser.gwdg.de/~sekbak02/download/gross/SkriptWS0708.pdf>
DOR: 05.02.2010
75. **Roche** Lexikon Medizin, Urban und Fischer Verlag, 5.Auflage, 2003, 705.
76. **Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. u. De Risi, J. L.** (2003): The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*, *PLoS Biol.* 2003 Oct; 1 (1):E5. Epub 2003 Aug 18.

77. **Wernsdorfer, G., Rooney, W. u. Wernsdorfer, W. H.** (1998): Kriterien für die Arzneimittelresistenz bei Malariaerregern, Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 20, 197- 204.
78. **Grab, B. u. Wernsdorfer, W. H.** (1983): Evaluation of in vitro tests for drug sensitivity in *P. falciparum*, Probit analysis of log-dose/ response tests from 3-8 points assay. WHO/Mal/83: 990.
79. **Wernsdorfer, W. H. u. Wernsdorfer, G.** (1995): The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in *Plasmodium falciparum*. Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie 17, 221–228.

Mae Sot 2007

Plasmodium vivax

Pre-Incubation Counts

| Isol.No | Par/ μ l | Young Troph | M & A Troph | Young Schiz | Adv. Schiz | PI Pop Index | Well A Pop.Ind. | RESULT |
|---------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|-----------------|---------|
| V-01 | 6 169 | 82 | 114 | 4 | 0 | 393.00 | 594.75 | VALID |
| V-02 | 1 077 | 120 | 80 | 0 | 0 | 310.00 | 411.00 | VALID |
| V-03 | 3 243 | 116 | 68 | 16 | 0 | 346.00 | 736.75 | VALID |
| V-04 | 9 106 | 132 | 61 | 7 | 0 | 298.25 | 675.50 | VALID |
| V-05 | 1 662 | 169 | 31 | 0 | 0 | 212.00 | 635.00 | VALID |
| V-06 | 1 000 | 191 | 9 | 0 | 0 | 168.00 | 655.25 | VALID |
| V-07 | 1 374 | 120 | 64 | 16 | 0 | 338.00 | 710.50 | VALID |
| V-08 | 3 400 | 78 | 120 | 2 | 0 | 397.50 | 631.25 | VALID |
| V-09 | 60 364 | 84 | 110 | 6 | 0 | 374.50 | 660.50 | VALID |
| V-10 | 22 609 | 141 | 59 | 0 | 0 | 268.00 | 574.00 | VALID |
| V-11 | 1 002 | 81 | 119 | 0 | 0 | 388.00 | 438.75 | INVALID |
| V-12 | 1 020 | 133 | 67 | 0 | 0 | 284.00 | 651.50 | VALID |
| V-13 | 1 288 | 148 | 52 | 0 | 0 | 254.00 | 676.25 | VALID |
| V-14 | 12 148 | 89 | 109 | 2 | 0 | 375.50 | 629.75 | VALID |
| V-15 | 10 811 | 105 | 92 | 3 | 0 | 358.25 | 727,25 | VALID |
| V-16 | 18 133 | 81 | 119 | 0 | 0 | 388.00 | 546.50 | VALID |
| V-17 | 12 651 | 83 | 117 | 0 | 0 | 384.00 | 508.75 | VALID |
| V-18 | 7 593 | 181 | 19 | 0 | 0 | 188.00 | 567.25 | VALID |
| V-19 | 6 000 | 83 | 109 | 8 | 0 | 398.00 | 510,00 | VALID |
| V-20 | 8 001 | 107 | 87 | 3 | 3 | 349.50 | 702.50 | VALID |
| V-21 | 6 514 | 25 | 169 | 4 | 2 | 512.50 | 704.00 | INVALID |
| V-22 | 2 930 | 76 | 124 | 0 | 0 | 398.00 | 571.25 | VALID |
| V-23 | 9 571 | 112 | 88 | 0 | 0 | 326.00 | 562.00 | VALID |
| V-24 | 1 829 | 82 | 118 | 0 | 0 | 386.00 | 755.00 | VALID |
| V-25 | 14 857 | 123 | 77 | 0 | 0 | 304.00 | 657.25 | VALID |

Mae Sot 2007

Plasmodium vivax

Pre-Incubation Counts

| Isol.No | Par/ μ l | Young Troph | M & A Troph | Young Schiz | Adv. Schiz | PI Pop Index | Well A Pop.Ind. | RESULT |
|---------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|-----------------|---------|
| V-26 | 1 195 | 91 | 109 | 0 | 0 | 368.00 | 512.75 | VALID |
| V-27 | 2 476 | 114 | 86 | 0 | 0 | 322.00 | 748.75 | VALID |
| V-28 | 2 595 | 114 | 86 | 0 | 0 | 322.00 | 614.75 | VALID |
| V-29 | 30 933 | 173 | 24 | 0 | 3 | 212.75 | 645.75 | VALID |
| V-30 | 14 118 | 110 | 86 | 4 | 0 | 337.00 | 505.75 | VALID |
| V-31 | 2 720 | 117 | 77 | 6 | 0 | 326.50 | 456.50 | VALID |
| V-32 | 5 714 | 174 | 26 | 0 | 0 | 202.00 | 625.75 | VALID |
| V-33 | 2 338 | 157 | 38 | 0 | 5 | 249.75 | 576.25 | VALID |
| V-34 | 1 863 | 149 | 44 | 7 | 0 | 264.25 | 585.00 | VALID |
| V-35 | 6 621 | 102 | 98 | 0 | 0 | 346.00 | 559.25 | VALID |
| V-36 | 1 538 | 103 | 97 | 0 | 0 | 344.00 | 505.00 | VALID |
| V-37 | 15 515 | 111 | 89 | 0 | 0 | 338.00 | 580.00 | VALID |
| V-38 | 8 000 | 165 | 31 | 4 | 0 | 227.00 | 438.75 | VALID |
| V-39 | 17 032 | 125 | 75 | 0 | 0 | 300.00 | 486.00 | VALID |
| V-40 | 2 805 | 126 | 74 | 0 | 0 | 298.00 | 532.50 | VALID |
| V-41 | 7 091 | 42 | 148 | 7 | 3 | 486.50 | 592.75 | INVALID |
| V-42 | 2 612 | 77 | 123 | 0 | 0 | 396.00 | 609.75 | VALID |
| V-43 | 2 743 | 76 | 124 | 0 | 0 | 398.00 | 555.50 | VALID |
| V-44 | 1 000 | 122 | 78 | 0 | 0 | 306.00 | 552.50 | VALID |
| V-45 | 3 200 | 176 | 24 | 0 | 0 | 198.00 | 549.75 | VALID |
| V-46 | 4 000 | 128 | 64 | 8 | 0 | 308.00 | 539.50 | VALID |
| V-47 | 8 780 | 138 | 62 | 0 | 0 | 274.00 | 679.25 | VALID |
| V-48 | 17 290 | 155 | 40 | 5 | 0 | 230.75 | 559.75 | VALID |
| V-49 | 4 837 | 97 | 103 | 0 | 0 | 356.00 | 551.50 | VALID |
| | | | | | | | | |

| | | |
|-------------|-------|----------------|
| Study Area: | Year: | Drug: |
| MAE SOT | 2007 | PV ARTEMISININ |

| Drug conc. | SMI% |
|------------|--------|
| 3,0 | 34,69 |
| 10,0 | 55,91 |
| 30,0 | 74,11 |
| 100,0 | 84,65 |
| 300,0 | 91,25 |
| 1000,0 | 97,29 |
| 3000,0 | 100,00 |

| | | | | | |
|------------|--------|------|---------|---------------|--------|
| n = | 46 | S = | 13,0010 | f_s = | 2,1478 |
| a = | 4,2380 | A = | 2,8511 | f_{EC-50} = | 1,8309 |
| b = | 0,3877 | K = | 7 | f_{EC-90} = | 3,2007 |
| r = | 0,9961 | N' = | 138 | f_{EC-95} = | 4,0506 |
| χ^2 = | 0,4457 | R = | 1000 | f_{EC-99} = | 6,6563 |

| EC | Mean | 95% Confidence Intervals | |
|------------------|-----------|--------------------------|------------|
| | | Lower | Higher |
| EC ₁ | 0,0177 | 0,0027 | 0,1177 |
| EC ₁₆ | 0,5489 | 0,2998 | 1,0051 |
| EC ₅₀ | 7,1368 | 3,8979 | 13,0671 |
| EC ₈₄ | 92,7858 | 50,6766 | 169,8850 |
| EC ₉₀ | 194,5687 | 60,7890 | 622,7600 |
| EC ₉₅ | 496,6139 | 122,6022 | 2011,5900 |
| EC ₉₉ | 2879,2581 | 432,5643 | 19165,0740 |

© W. H. Wernsdorfer (April 1995)

| | | |
|-------------|-------|---------------|
| Study Area: | Year: | Drug: |
| MAE SOT | 2007 | PV ATOVAQUONE |

| Drug conc. | SMI% |
|------------|--------|
| 3,0 | 29,72 |
| 10,0 | 51,59 |
| 30,0 | 70,70 |
| 100,0 | 80,24 |
| 300,0 | 89,39 |
| 1000,0 | 96,23 |
| 3000,0 | 100,00 |

| | | | | | |
|------------|--------|------|---------|---------------|--------|
| n = | 46 | S = | 13,3346 | f_s = | 1,9644 |
| a = | 4,1209 | A = | 2,9110 | f_{EC-50} = | 1,6972 |
| b = | 0,3839 | K = | 7 | f_{EC-90} = | 2,7866 |
| r = | 0,9945 | N' = | 184 | f_{EC-95} = | 3,4324 |
| χ^2 = | 0,6548 | R = | 1000 | f_{EC-99} = | 5,3256 |

| EC | Mean | 95% Confidence Intervals | |
|------------------|-----------|--------------------------|------------|
| | | Lower | Higher |
| EC ₁ | 0,0231 | 0,0043 | 0,1228 |
| EC ₁₆ | 0,7404 | 0,4362 | 1,2565 |
| EC ₅₀ | 9,8725 | 5,8170 | 16,7554 |
| EC ₈₄ | 131,6459 | 77,5672 | 223,4274 |
| EC ₉₀ | 278,0838 | 99,7945 | 774,8984 |
| EC ₉₅ | 716,3768 | 208,7107 | 2458,8851 |
| EC ₉₉ | 4226,1303 | 793,5441 | 22506,8474 |

© W. H. Wernsdorfer (April 1995)

| | | |
|-------------|-------|--------|
| Study Area: | Year: | Drug: |
| MAE SOT | 2007 | PV DBB |

| Drug conc. | SMI% |
|------------|--------|
| 3,0 | 37,91 |
| 10,0 | 59,61 |
| 30,0 | 75,02 |
| 100,0 | 84,69 |
| 300,0 | 91,34 |
| 1000,0 | 96,72 |
| 3000,0 | 100,00 |

| | | | | | |
|------------|--------|------|---------|---------------|--------|
| n = | 46 | S = | 15,6717 | f_s = | 2,4106 |
| a = | 4,3673 | A = | 3,3397 | f_{2C-50} = | 1,9134 |
| b = | 0,3614 | K = | 7 | f_{2C-90} = | 3,7250 |
| r = | 0,9958 | N' = | 138 | f_{2C-95} = | 4,9047 |
| χ^2 = | 0,4333 | R = | 1000 | f_{2C-99} = | 8,7332 |

| EC | Mean | 95% Confidence Intervals | |
|------------------|-----------|--------------------------|------------|
| | | Lower | Higher |
| EC ₁ | 0,0092 | 0,0011 | 0,0805 |
| EC ₁₆ | 0,3675 | 0,1921 | 0,7032 |
| EC ₅₀ | 5,7592 | 3,0099 | 11,0197 |
| EC ₈₄ | 90,2566 | 47,1708 | 172,6970 |
| EC ₉₀ | 199,7534 | 53,6249 | 744,0832 |
| EC ₉₅ | 545,8593 | 111,2921 | 2677,3001 |
| EC ₉₉ | 3596,9616 | 411,8739 | 31412,8494 |

© W. H. Wernsdorfer (April 1995)

| | | |
|-------------|-------|---------------------|
| Study Area: | Year: | Drug: |
| MAE SOT | 2004 | VIVAV - ARTEMISININ |

| Drug conc. | SMI% |
|------------|--------|
| 3,0 | 17,52 |
| 10,0 | 45,81 |
| 30,0 | 61,98 |
| 100,0 | 79,41 |
| 300,0 | 89,02 |
| 1000,0 | 96,52 |
| 3000,0 | 100,00 |

| | | | | | |
|------------|--------|------|--------|---------------|--------|
| n = | 43 | S = | 8,7881 | f_s = | 1,6350 |
| a = | 3,6994 | A = | 2,1217 | f_{zC-90} = | 1,5826 |
| b = | 0,4578 | K = | 7 | f_{zC-90} = | 2,1965 |
| r = | 0,9928 | N' = | 172 | f_{zC-95} = | 2,5397 |
| χ^2 = | 1,1220 | R = | 1000 | f_{zC-99} = | 3,4665 |

| EC | Mean | 95% Confidence Intervals | |
|------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | | Lower | Higher |
| EC ₁ | 0,1063 | 0,0307 | 0,3684 |
| EC ₁₆ | 1,9521 | 1,2335 | 3,0894 |
| EC ₅₀ | 17,1555 | 10,8403 | 27,1496 |
| EC ₈₄ | 150,7643 | 95,2659 | 238,5938 |
| EC ₉₀ | 282,3512 | 128,5450 | 620,1892 |
| EC ₉₅ | 624,6022 | 245,9356 | 1586,3009 |
| EC ₉₉ | 2769,0524 | 798,7990 | 9598,9746 |

© W. H. Wernsdorfer (April 1995)

MAE SOT STUDIES 2007

PATIENT RECORD FORM

Plasmodium vivax

| DATE | PAT. No. | PAT. REG. MC | SEX | AGE | OCCUPAT. | RESIDENCE Country | ORIGIN of Infection Country | No. DAYS Sympt. before seek.treatm. | COMMENTS |
|---------|----------|--------------|------|-----|--------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------|
| 21.5.07 | 1 | 62 | Male | 19 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 21.5.07 | 2 | 118/50 | Male | 26 | labour | Thai | Thai | 2 | |
| 21.5.07 | 3 | 73A | Male | 26 | labour | Thai | Thai | 4 | |
| 21.5.07 | 4 | 40B | Male | 20 | labour | Myanmar | Thai | 3 | |
| 23.5.07 | 5 | | Male | 47 | Government officer | Thai | Thai | 2 | |
| 23.5.07 | 6 | 44B | Male | 33 | labour | Thai | Myanmar | 3 | |
| 24.5.07 | 7 | 94A | Male | 28 | labour | Myanmar | Thai | 3 | |
| 25.5.07 | 8 | 82B | Male | 48 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 25.5.07 | 9 | 89d | Fem | 16 | labour | Myanmar | Myanmar | 2 | |
| 28.5.07 | 10 | 10A | Fem | 33 | labour | Thai | Thai | 3 | |

MAE SOT STUDIES 2007

PATIENT RECORD FORM

Plasmodium vivax

| DATE | PAT. No. | PAT. REG. MC | SEX | AGE | OCCUPAT. | RESIDENCE Country | ORIGIN of Infection Country | No. DAYS Sympt. before seek.treatm. | COMMENTS |
|---------|----------|--------------|------|-----|----------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------|
| 28.5.07 | 11 | 4 | Male | 49 | labour | Thai | Myanmar | - | |
| 28.5.07 | 12 | 6 | Male | 29 | labour | Thai | Myanmar | - | |
| 28.5.07 | 13 | 7 | Male | 31 | labour | Thai | Myanmar | 2 | |
| 28.5.07 | 14 | 1B | Male | 18 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 28.5.07 | 15 | 6B | Male | 35 | labour | Myanmar | Myanmar | 2 | |
| 29.5.07 | 16 | 7B | Male | 9 | young | Myanmar | Myanmar | 2 | |
| 29.5.07 | 17 | 8B | Fem | 60 | labour | Thai | Thai | 4 | |
| 29.5.07 | 18 | 11B | Fem | 17 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 30.5.07 | 19 | 10B | Male | 17 | labour | Myanmar | Myanmar | 2 | |
| 30.5.07 | 20 | 22 | Male | 51 | labour | Thai | Thai | 3 | |

MAE SOT STUDIES 2007

PATIENT RECORD FORM

Plasmodium vivax

| DATE | PAT. No. | PAT. REG. MC | SEX | AGE | OCCUPAT. | RESIDENCE Country | ORIGIN of Infection Country | No. DAYS Sympt. before seek.treatm. | COMMENTS |
|---------|----------|--------------|------|-----|----------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------|
| 30.5.07 | 21 | 131 | Male | 51 | driver | Thai | Thai | 5 | |
| 30.5.07 | 22 | 20 | Fem | 15 | labour | Thai | Myanmar | 5 | |
| 30.5.07 | 23 | 509/50 | Male | 20 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 01.6.07 | 24 | 13B | Male | 32 | labour | Thai | Myanmar | 4 | |
| 01.6.07 | 25 | 15 | Fem | 48 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 01.6.07 | 26 | 35A | Fem | 33 | labour | Thai | Thai | 2 | |
| 01.6.07 | 27 | 36A | Male | 31 | labour | Thai | Thai | 1 | |
| 04.6.07 | 28 | 49A | Male | 32 | labour | Thai | Thai | 2 | |
| 05.6.07 | 30 | 26 | Male | 21 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |

MAE SOT STUDIES 2007

PATIENT RECORD FORM

Plasmodium vivax

| DATE | PAT. No. | PAT. REG. MC | SEX | AGE | OCCUPAT. | RESIDENCE Country | ORIGIN of Infection Country | No. DAYS Sympt. before seek.treatm. | COMMENTS |
|---------|----------|--------------|------|-----|----------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------|
| 05.6.07 | 31 | 27 | Male | 24 | labour | Thai | Myanmar | 5 | |
| 06.6.07 | 32 | 28B | Male | 38 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 07.6.07 | 33 | 67A | Male | 52 | labour | Thai | Thai | 4 | |
| 07.6.07 | 34 | 66 | Male | 25 | labour | Thai | Myanmar | 3 | |
| 07.6.07 | 35 | 463/50 | Male | 21 | labour | Thai | Myanmar | 2 | |
| 08.6.07 | 36 | 73A | Male | 53 | labour | Thai | Thai | 3 | |
| 08.6.07 | 37 | 42B | Male | 25 | labour | Thai | Myanmar | 3 | |
| 13.6.07 | 38 | 80B | Male | 21 | labour | Myanmar | Myanmar | 4 | |
| 13.6.07 | 39 | 82B | Male | 13 | young | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 18.6.07 | 40 | 135A | Fem | 38 | labour | Thai | Thai | 2 | |

MAE SOT STUDIES 2007

PATIENT RECORD FORM

Plasmodium vivax

| PAT. No. | PAT. REG. MC | SEX | AGE | OCCUPAT. | RESIDENCE Country | ORIGIN of Infection Country | No. DAYS Sympt. before seek.treatm. | COMMENTS |
|----------|--------------|------|-----|--------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------|
| 41 | PVKS 854 | Fem | 38 | labour | Thai | Thai | 3 | |
| 42 | PVKS 855 | Fem | 46 | labour | Myanmar | Myanmar | 1 | |
| 43 | 96B | Male | 25 | labour | Myanmar | Myanmar | 4 | |
| 44 | 110B | Male | 33 | farmer | Myanmar | Myanmar | 2 | |
| 45 | 120B | Male | 24 | labour | Myanmar | Myanmar | 3 | |
| 46 | 125B | Male | 49 | Mine foreman | Thai | Thai | 3 | |
| 47 | 114B | Male | 25 | labour | Myanmar | Myanmar | 1 | |
| 48 | 10A | Male | 30 | labour | Thai | Thai | 3 | |
| 49 | 8B | Male | 37 | woodcutting | Myanmar | Myanmar | 1 | |
| | | | | | | | | |

9 Curriculum vitae

Name:

Silvia Gloser

Geboren:

01.09.1983, in Stockerau

Nationalität:

Österreich

Familienstand:

ledig

Ausbildung:

1997-2002 Erzbischöfliches Aufbaugymnasium Hollabrunn
mit humanbiologischem Schwerpunkt

2002- 2010 Biologiestudium an der Universität Wien,
Schwerpunkt Anthropologie