

6. SUMMARY

Evidence from this study supports that the *in vitro* induction of drug resistance to metronidazole is possible. This does not seem to be related to different geographic and host origin of *Giardia* isolates. As indicated by results of intermittent and constant treatment the development needs at least 24 weeks.

Only one (WB-1B-M1) of four intermittently treated metronidazole lines showed a significantly increased ID₅₀ value ($p < 0.005$) when examined with the two-sided T-test. Variance analysis of dose-response slopes in contrast suggested the parent stock to be the least sensitive to metronidazole which is questionable.

Three of four constantly treated metronidazole lines showed significantly increased ID₅₀ values (WB-1B-M2, $0.01 < p < 0.02$; BAC2-M2, $p < 0.001$; BRIS/87/HEPU/713, $p < 0.001$).

Three of four irradiated and constantly treated metronidazole lines had significantly different mean ID₅₀ values when compared with the parent stocks (WB-1B-M3, $p < 0.001$; WB-1B-M4, $0.002 > p > 0.005$; BRIS/87/HEPU/713-M3, $p < 0.001$).

It seems questionable if the induction of resistance to furazolidone is possible. None of the furazolidone treated lines displayed significantly different ID₅₀ values when compared to the parent stock. Variance analysis revealed that only one line BAC2-F2 was significantly less sensitive to furazolidone in the range from 0.5 to 2 μM when compared with the parent stock ($p < 0.05$).

The sensitivities of the parent stocks to furazolidone were compared. All isolates displayed very similar sensitivities and OAS1 and the BAC2, two animal stocks were the least sensitive stocks in the range from 0.5 to 2 μM . With exception of the WB-1B, all parent stocks displayed also very similar sensitivities to metronidazole. The line WB-1B was the least sensitive of all in the range from 1 to 4 μM . The sensitivity of all parent stocks to furazolidone and metronidazole were compared. Two parent stocks originally derived from animals (BAC2 and OAS1) showed a significantly higher sensitivity to metronidazole than to furazolidone in the concentration range from 1 to 4 μM ($p < 0.05$). The stock WB-1B appeared to be equally sensitive to furazolidone and metronidazole and the parent stock BRIS/87/HEPU/713 in contrast to all others seemed to be significantly more sensitive to furazolidone.

The analysis of total proteins of *Giardia duodenalis* isolates by SDS-PAGE revealed usually the existence of more than 30 different bands. Major differences among stocks of different geographic and host origin were not observed. No

deviations were identified comparing the SDS-PAGE patterns of parent stocks and their respective derived drug treated lines.

Electrophoretic karyotyping with FIGE revealed the existence of 4 to 5 intensively stained bands in the size range up to 2 Mb. Hybridization experiments with the probe G6/1 which has previously shown rearrangement in one metronidazole resistant line, did not hybridize differently to parent stocks and drug treated lines.

ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Helen Laqua: Die Induktion von Resistenz gegen Metronidazol und Furazolidon *in vitro* bei vier Isolaten von *Giardia duodenalis* verschiedener menschlicher und tierischer sowie geographischer Herkunft und die Untersuchung ihrer Proteine und Chromosomen

Zielsetzung

Untersuchungen im Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australien haben gezeigt, daß die Entwicklung von Resistenz gegen Metronidazol bei *Giardia duodenalis* in einem vom Menschen stammenden Isolat mit der Veränderung von Chromosomen korreliert ist. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob derartige Veränderungen auch in anderen von Mensch und Tier gewonnenen Isolaten von *Giardia*

duodenalis zu beobachten sind. Die Giardien wurden in modifiziertem Kulturmedium (TYI-S-33) vermehrt.

Induktion von Resistenz

Drei verschiedene Methoden zur Induktion von Resistenz gegen Metronidazol und Furazolidon wurden angewandt. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand dabei die Induktion von Resistenz durch intermittierende Behandlung.

1. Die Giardien wurden für eine Zeitdauer von 24 Stunden Konzentrationen der Chemotherapeutika ausgesetzt, die etwa 80 bis 90 % der Parasiten tötete. Die überlebenden Giardien wurden danach für 2 bis 7 Tage ohne Chemotherapeutika kultiviert. Dann wurden sie erneut einer Behandlung ausgesetzt die etwa 80 bis 90 % der Parasiten tötete. Die Konzentration der Chemotherapeutika wurde dabei kontinuierlich über einen Zeitraum von 27 bis 34 Wochen gesteigert.

2. Giardien wurden kontinuierlich in ständiger Präsenz sublethaler Konzentrationen der Chemotherapeutika Metronidazol und Furazolidon kultiviert. Diese Konzentrationen wurden im Laufe der Behandlungsdauer von 12 Wochen nur langsam und sehr wenig erhöht.

3. *Giardia* Trophozoiten der Elternisolate wurden zur Induktion von Mutationen 10 Minuten lang einer UV-bestrahlung (254 nm) ausgesetzt. Nach einer Erholungsphase von 48 Stunden wurden die Giardien in im Laufe einer 8wöchigen Behandlungsdauer kontinuierlich ansteigenden Konzentrationen der Chemotherapeutika kultiviert. Der Grad der Resistenz der behandelten *Giardia duodenalis* Isolate gegenüber den beiden Chemotherapeutika wurde in etwa 4wöchigen Abständen mit Hilfe des ³H-thymidine incorporation assays gemessen. Die Empfindlichkeit der unbehandelten Elternisolate wurde mit der von Furazolidon und Metronidazol behandelten Isolaten verglichen.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, daß die Induktion von Resistenz gegen Metronidazol bei Giardien *in vitro* möglich ist. Die geographische Herkunft und der Wirt, aus dem das Isolat stammt, scheinen hierbei keine Rolle zu spielen. In dieser Studie entwickelte sich die Resistenz gegen Metronidazol in einer Zeitdauer von wenigstens 24 Wochen. Ein einziges von vier intermittierend mit Metronidazol behandelten Isolaten zeigte eine gegenüber dem Elternisolat signifikant niedrigere Metronidazol-Empfindlichkeit (WB-1B-M1, $p < 0.005$).

Nach einer etwa 12wöchigen Kultivierung in konstanter Präsenz von Metronidazol zeigten 3 von 4 konstant behandelten Isolaten eine signifikant geringere Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol (BRIS-87-HEPU-713-

M2, $p < 0.001$; WB-1B-M2, $0.01 < p < 0.02$; BAC2, $p < 0.001$). Drei von vier UV-bestrahlten und für 8 Wochen konstant Metronidazol behandelten Isolaten zeigten ebenfalls eine signifikant erniedrigte Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol im Vergleich mit dem Elternisolat (WB-1B-M3, $p < 0.001$; WB-1B-M4, $0.002 > p > 0.005$; BRIS/87/HEPU/713-M3, $p < 0.001$).

Der Versuch der Induktion von Resistenz gegen Furazolidon war nicht erfolgreich. Keines der Furazolidon behandelten Isolate zeigte im Vergleich mit dem Elternisolat eine geringere Empfindlichkeit. Mit zweifaktorieller Varianzanalyse wurde nachgewiesen, daß ein Isolat im Konzentrationsbereich zwischen 0.5 und 2 μM gegenüber Furazolidon signifikant weniger empfindlich war als das Elternisolat (BAC2-F2, $p < 0.05$).

Alle Elternisolate zeigten eine sehr ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Furazolidon. Die Isolate OAS1 und BAC2 waren im Konzentrationsbereich zwischen 0.5 und 2 μM am wenigsten empfindlich. Bis auf WB-1B hatten auch alle Elternisolate sehr ähnliche Empfindlichkeiten gegenüber Metronidazol. WB-1B war das am wenigsten empfindliche Isolat von allen im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 4 μM .

Die Empfindlichkeiten aller Elternisolate gegenüber Metronidazol und Furazolidon wurden verglichen. Zwei ursprünglich von Tieren stammende Isolate (BAC2, OAS1) zeigten im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 4 μM eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegen Metronidazol ($p < 0.05$ für beide Isolate), während das Isolat WB-1B etwa gleich empfindlich gegenüber Furazolidon und Metronidazol war, zeigte das Elternisolat BRIS/87/HEPU/713 im Gegensatz zu allen anderen eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber Furazolidon.

Analyse der Proteine

Gesamtproteine von Giardien wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Im coomassiegefärbten Gel konnten die Proteinmuster der vier verschiedenen Elternisolate mit denen ihrer Metronidazol und Furazolidon behandelten Nachkommen verglichen werden. Mehr als 30 verschiedene Banden konnten dabei differenziert werden. Im Vergleich mit den Elternisolaten wiesen die Proteinmuster der behandelten Nachkommen dabei keine Unterschiede auf.

Analyse der Chromosomen

Durch FIGE-Analyse der Chromosomen wurden bei Elternisolaten sowie Metronidazol und Furazolidon behandelten Nachkommen in der Regel vier bis fünf intensiv gefärbte chromosomale Banden dargestellt. Diese Banden

waren in einer Größenordnung bis zu 2 Mb lokalisiert. In Hybridisierungsversuchen zeigte die DNA-Sonde G6/1 eine Reaktion mit dem dritten Chromosom der Isolate WB-1B, (Mensch) und OAS1, (Schaf, Kanada). G6/1 reagierte mit Chromosom vier des Isolates BAC2, (Katze, Australien) und mit Chromosomen drei und vier von Isolat BRIS/87/HEPU/713, (Mensch, Australien). Es wurden keine Unterschiede im Hybridisierungsmuster zwischen unbehandelten Elternstämmen und behandelten Nachkommen festgestellt.