

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE PLASMODIUM FALCIPARUM DO ESTADO DE RONDÔNIA, BRASIL, UTILIZANDO MICROTTESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMALÁRICOS, TIPIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E ANTICORPOS MONOCLONAIS

S. M. DI SANTI (1), M. BOULOS (1), M. A. VASCONCELOS (2), S. OLIVEIRA (2),
A. COUTO (2) & V. E. ROSÁRIO (3)

RESUMO

Nove amostras de *Plasmodium falciparum* foram coletadas de migrantes infectados no Estado de Rondônia. Estas amostras foram mantidas em cultivo para caracterização por tipificação enzimática em acetato de celulose, sensibilidade à cloroquina, amodiaquina, mefloquina e quinino e análise da diversidade antigênica através de anticorpos monoclonais específicos.

Os resultados obtidos mostraram variação entre todas as amostras estudadas: encontrou-se resistência crescente à cloroquina, resistência intermediária à amodiaquina e quinino e sensibilidade a baixos níveis de mefloquina; apenas dois isolados mostraram sensibilidade a todas as drogas. A tipificação enzimática mostrou presença de parasitas GPI 1 e 2 e ADA 1 e 2, enquanto que para PEP e LDH todas as amostras foram do tipo 1. Sorotipagem com anticorpos monoclonais PSA mostrou presença de três sorotipos diferentes (II, III e IV). Estes resultados mostraram: a) variação entre as amostras para os marcadores analisados; b) nesta região, para o pequeno número de amostras analisadas, não foram observadas diferenças significativas ou novos tipos de parasitas.

UNITERMOS: Malária; Caracterização de cepas; *P. falciparum*.

INTRODUÇÃO

A incidência da malária vem aumentando de forma alarmante no país, sobretudo nos últimos anos. Em 1985 foram notificados 400.000 casos no Brasil, sendo 98% destes da Região Amazônica e mais de 40% do Estado de Rondônia. Foi em Rondônia que, em 1963¹, após Colômbia¹⁰, observou-se resistência à cloroquina pela primeira vez no Brasil, e por esta razão esta região é de grande importância. Desconhece-se se esta resistência foi importada de outro país ou se foi originada no próprio local.

Hoje considera-se controverso o processo descrito por PINOTTI (1954)¹¹, que utilizou o sal cloroquinado para uso profilático na região. Tal medida pode ter sido o agente seletivo sobre os parasitas resistentes, que na presença de uma pressão permanente desfavorável aos parasitas sensíveis, teriam predominância na transmissão, com conseqüente persistência na área. A descrição histórica da resistência à cloroquina é revista por PETERS¹⁰ e pela Organização Mundial de Saúde²³.

- (1) Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), da Secretaria de Estado da Saúde Rua Cardeal Arcoverde, 2878. CEP 05408 São Paulo, SP. — Brasil.
- (2) Instituto Evandro Chagas da FSESP. Av. Almirante Barroso, 492. Caixa Postal 621. CEP 66000 Belém, PA. — Brasil.
- (3) Biomedical Research Institute. 12111 Parklawn Drive. Rockville, Maryland 20852 — U.S.A.
Endereço para correspondência: Dr. Marcos Boulos. Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Av. Cardeal Arcoverde, 2878. CEP 05408 São Paulo, SP. — Brasil.

O estudo das características dos parasitas em diferentes regiões constitui-se de meta fundamental para a adoção de medidas eficazes contra o generalizado fenômeno da resistência aos medicamentos. Trabalhos anteriores^{4,13,20} descreveram um grande número de amostras de *Plasmodium falciparum* da Região Amazônica Brasileira, mas não incluíram uma amostragem mais significativa de Rondônia.

MATERIAL E MÉTODOS

A nomenclatura, origem e história das amostras é apresentada a seguir:

S-60/85, N.S.Z., masculino, 41 anos, infectado em Guajará-Mirim; sangue coletado em setembro de 1985, com parasitemia de 46.850/mm³. Descongelada em novembro de 1985 para cultivo e caracterização.

S-84/85, J.A.P.V., masculino, 33 anos, infectado junto à fronteira com o Acre. Amostra com 135.000/mm³, coletada em outubro de 1985 e criopreservada. Descongelada em novembro de 1985 para cultivo e caracterização.

S-87/85, O.F.S., masculino, 53 anos, infectado em Costa Marques; anteriormente tratado com cloroquina e sulfa-pirimetamina; amostra de sangue coletada e criopreservada em novembro de 1985, com parasitemia de 61.440/mm³; descongelada em novembro de 1985, para cultivo e caracterização.

S-91/85, J.P.S., masculino, 23 anos, infectado em Costa Marques; anteriormente tratado com cloroquina; amostra coletada em novembro de 1985, com parasitemia de 10.500/mm³.

S-92/85, V.G.F., masculino, 49 anos, infectado em Ouro Preto d'Oeste; tratado anteriormente com quinino, sulfa-pirimetamina e clindamicina; amostra coletada em novembro de 1985, com parasitemia de 34.320/mm³.

S-93/85, V.G.P., masculino, 35 anos, infectado em Guajará-Mirim; tratado anteriormente com sulfa-pirimetamina; amostra coletada em novembro de 1985, com parasitemia de 32.040/mm³.

S-94/85, R.S.B., masculino, 17 anos, infectado em Porto Velho; parasitemia de 8.400/mm³.

S-95/85, J.A.P., masculino, 30 anos, infectado em Guajará-Mirim; parasitemia de 13.200/mm³.

S-97/85, S.B.S., masculino, 26 anos, infectado em Guajará-Mirim; tratado anteriormente com quinino e cloroquina; amostra com parasitemia de 12.040/mm³.

Todas as amostras foram mantidas em cultivo até a caracterização. O cultivo contínuo, a criopreservação e o descongelamento das amostras foram realizados de acordo com trabalhos anteriormente descritos^{6,18}.

MICROTESTES DE SENSIBILIDADE: estes testes, baseados nos trabalhos de RIECKMANN e colaboradores¹² e LOPEZ-ANTUÑANO e WERNSDORFER⁷, foram efetuados para cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino. Devido ao fato de os testes terem sido realizados com parasitas obtidos a partir de cultivo contínuo, as amostras foram diluídas para redução da parasitemia a 1%.

Foram utilizadas placas de fundo chato, colocando-se 100 microlitros de cada diluição da droga (duplicado) e 10 microlitros de sangue parasitado, a um hematócrito de 50%, em cada um dos orifícios. As diluições utilizadas foram as seguintes:

- a) cloroquina: 1; 2; 4; 6; 8; 16 e 32x10⁻³M
- b) mefloquina: 0.5; 1; 2; 4; 6; 8 e 16x10⁻³M
- c) amodiaquina: 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8 e 16x10⁻³M
- a) quinino: 3.9; 7.8; 15.6; 31.25; 62.5; 125 e 250x10⁻³M

ANÁLISE ENZIMÁTICA: utilizou-se o sistema de eletroforese em placas de acetato de celulose para tipagem dos parasitas, obtidos por lise em saponina, de acordo com a técnica de CARTER e VOLLER². Foram estudadas as enzimas glicose fosfato isomerase (GPI), adenosina deaminase (ADA), lactato desidrogenase (LDH) e peptidase E (PEP). A descrição dos tampões e as condições da eletroforese estão presentes no trabalho de COUTO e colaboradores⁴ e trabalhos para referência comparativa são descritos por CARTER & VOLLER², THAITHONG¹⁶, THAITHONG e colaboradores¹⁷ e WALLIKER²¹.

ANÁLISE DA DIVERSIDADE ANTIGÊNICA: para estes estudos, utilizaram-se 15 anticorpos monoclonais cedidos por Jana McBride (Universidade de Edimburgo, Departamento de Zoologia). Estes anticorpos foram produzidos em camundongos, utilizando-se duas amostras de *Plasmodium falciparum* (K1 e PB1). Hibri-

domas com produção de anticorpos foram clonados e os sobrenadantes utilizados para tipar os parasitas^{8,9}. Todos os anticorpos reagem com antígenos expressos por esquizontes ou merozoítas. Cultivos com presença de parasitas em suas diversas fases de evolução (exceto gametócitos), foram lavados com meio de cultura RPMI 1640 e gotas espessas foram realizadas em lâminas para imunofluorescência, sendo então estocadas a -20°C. No momento da utilização dos anticorpos monoclonais, segundo diluições padronizadas por McBRIDE e colaboradores⁸, as lâminas foram descongeladas e desmembradas com PBS pH 7.3. Colocaram-se 10 microlitros de cada anticorpo monoclonal sobre

o antígeno, incubando-se em câmara úmida por 30 minutos, seguindo-se de 2 lavagens de 5 minutos com PBS. Adicionaram-se 10 microlitros de imunoglobulina anti-camundongo conjugada com isotiocianato de fluoresceína diluído em PBS e Azul de Evans a 0.01%, com nova incubação. Após lavagem final as lâminas foram montadas em glicerol a 50% em PBS e observadas em microscópio de fluorescência.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas I, II, III e IV.

TABELA I

Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Estado de Rondônia, Brasil. Microtestes de sensibilidade aos anti-maláricos

Número da cepa	Parasitemia inicial (%) [*]	Cloroquina MIC ^{**}	Mefloquina MIC ^{**}	Amodiaquina MIC ^{**}	Quinino MIC ^{**}
S-60/85	0,3	6,0	0,5	2,0	31,25
S-87/85	0,5	16,0	1,0	1,0	31,25
S-91/85	0,8	16,0	1,0	1,0	31,25
S-92/85	1,0	16,0	1,0	1,0	15,6
S-93/85	0,8	16,0	0,5	0,25	31,25
S-94/85	0,3	6,0	0,5	0,25	7,8
S-95/85	0,5	4,0	0,5	0,25	15,6
S-97/85	0,8	6,0	0,5	0,5	31,25
Controle					
Clone IEC-132/83 C	2,0	8,0	1,0	1,0	31,25

^{*} Parasitemia inicial de material de cultivo contínuo.

^{**} Concentração mínima inibitória, expressa em $\times 10^{-5}$ Molar.

TABELA II

Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Estado de Rondônia, Brasil
Caracterização enzimática

Número da cepa	Enzimas			PEP
	GPI	ADA	LDH	
S-60/85	1	1	1	1
S-84/85	2	2	1	—
S-87/85	1	—	1	1
S-91/85	2	—	1	1
S-92/85	1	1	1	—
S-93/85	2	—	1	1
S-94/85	1	2	1	1
S-95/85	1	2	1	1
S-97/85	2	2	1	1
Controle				
Clone IEC-132/83 C	2	2	—	1

MICROTTESTES DE SENSIBILIDADE (Tabela I): estes resultados confirmam dados anteriores de generalizada resistência à cloroquina, sensibilidade à mefloquina e média resistência ao quinino e amodiaquina. Apenas as amostras S-94/85 e S-95/85 apresentaram no seu conjunto uma maior sensibilidade a todas as drogas.

TIPAGEM ENZIMÁTICA (Tabela II): esta análise mostrou uma grande variação entre as amostras estudadas, sobretudo para GPI e ADA. Todas as amostras são do tipo LDH 1 e PEP 1

DIVERSIDADE ANTIGÊNICA (Tabelas III e IV): os estudos mostraram surpreendente variação para a pequena amostragem estudada. De acordo com WALLIKER, D. (comunicação pessoal) estes anticorpos podem ser distribuídos em serotipos para o denominado "polymorphic

T A B E L A III
Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Estado de Rondônia, Brasil. Anticorpos monoclonais

Cepa	S-60/85	S-87/85	S-91/85	S-92/85	S-93/85	S-94/85	S-97/85
Antic. monoclonal							
9,8-4-4-1	+	+	+	+	+	+	+
12,4-3-3	+	+	+	+	+	+	+
6,1-1-3	—	—	—	—	—	—	—
7,3-7	—	—	—	—	—	—	—
7,6-2	—	—	—	—	—	—	—
9,2-6-2	+	+	+	+	+	+	+
10,3-2	+	+	+	+	+	+	+
9,5-1-5	+	+	—	+	+	+	+
12,1-5-4	+	+	—	—	+	—	—
12,2-1-1	—	—	+	—	—	—	—
13,2-3	—	—	—	—	—	—	+
12,3-2-2	—	+	—	+	—	—	+
12,5-1-2	—	+	—	+	—	—	+
12,7-1-2-4	—	+	—	+	—	—	+
9,4-3-5	+	—	—	—	—	—	+
Controle negativo	—	—	—	—	—	—	—

T A B E L A IV
Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Estado de Rondônia, Brasil. Diversidade antigênica

Cepa	S-60/85	S-87/85	S-91/85	S-92/85	S-93/85	S-94/85	S-97/85
Antic. monoclonal							
Grupo PSA							
6,1/7,3/7,6	—	—	—	—	—	—	—
9,2/10,3	+	+	+	+	+	+	+
9,5	+	+	—	+	+	+	+
12,2	—	—	+	—	—	—	—
12,1	+	+	—	—	+	—	—
Serotipo	III	III	IV	II	III	II	II
13,2	—	—	—	—	—	—	+
9,8	+	+	+	+	+	+	+
12,4	+	+	+	+	+	+	+
12,3/12,5/12,7	—	+	—	+	—	—	+
9,4	+	—	—	—	—	—	+

schizont antigen" (PSA). Segundo McBRIDE e col.⁸ existem sete combinações distintas (serotipos I a VII) de especificidades do parasita reconhecidas por nove anticorpos monoclonais. O serotipo I apresenta reação positiva com os anticorpos 6.1, 7.3 e 7.6 e negativa com 9.2, 9.7, 10.3, 9.5, 12.2 e 12.1. Os serotipos II a VII não apresentam as especificidades do tipo I, mas compartilham os determinantes definidos pelos anticorpos 9.2, 9.7 e 10.3. Os serotipos II e III reagem com o anticorpo 9.5, mas não com o 12.2, e podem ser diferenciados, respectivamente, por reação negativa e positiva com o anticorpo monoclonal 12.1. Os serotipos IV e V

são positivos para o anticorpo 12.1 e negativos para 9.5 e podem ser diferenciados um do outro pela reatividade com o 12.1. Serotipos VI e VII são negativos ou positivos, respectivamente, com o anticorpo 12.1 e negativos com o 9.5. Além disso, reagem fracamente com o 12.2. No Brasil, neste presente estudo, foram encontrados os serotipos II, III e IV (Tabela IV).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Este estudo, embora com pequeno número de amostras, confirma a grande variedade de

fenótipos encontrados para os marcadores estudados e este tipo de resultado tem sido observado em todos os estudos anteriores já publicados.

Apesar de hoje ser esta região uma área de elevado movimento migratório, com possível introdução de cepas de *Plasmodium falciparum* de estados vizinhos, é importante o conhecimento das características dos parasitas. Um dado de interesse para a análise deste estudo é o fácil acesso dos doentes a drogas para auto-medicação, com exceção da primaquina, controlada por autoridades sanitárias; por esta razão deve existir nesta e em outras regiões, uma permanente pressão seletiva de medicamentos antimaláricos, cuja dosagem efetiva é colocada em dúvida.

A dosagem mais elevada para cloroquina nos testes de sensibilidade é de $16 \times 10^{-8} M$ e surpreendeu-nos não encontrar amostras resistentes a dosagens mais elevadas, bem como encontramos amostras sensíveis. Os testes de sensibilidade mostram a perspectiva do nível de resistência *in vitro* e talvez *in vivo*, visto que segundo WEBSTER e colaboradores²², é possível a correlação entre os dois níveis.

Os resultados de tipagem enzimática não mostraram presença de novos tipos enzimáticos e a análise da diversidade antigênica comprovou elevada variação entre as amostras.

Nesta fase, em que mais de três centenas de amostras foram analisadas por diversos grupos em vários países, torna-se importante iniciarem-se novos estudos para melhor analisar e avaliar uma determinada região no que diz respeito à caracterização de *Plasmodium falciparum*: estudos de fragmentação cromossômica por eletroforese de pulso^{3,14,19}, utilização de "probes" para análise de ácidos nucleicos⁵ e análise proteica pela eletroforese e "screening" bidimensional¹⁵, dirão mais sobre a variação entre os mesmos. Ainda, a produção de gametócitos para completar a cadeia de transmissão e permitir o estudo da relação da resistência às drogas e a capacidade de transmissão pelo vetor, são estudos importantes a serem realizados por grupos de pesquisa.

SUMMARY

Characterization of *Plasmodium falciparum* isolates from Rondônia State, Brazil, by drug susceptibility, enzyme typing and monoclonal antibodies.

Nine samples of *Plasmodium falciparum* were collected from migrant workers who were infected in the State of Rondônia, Brazil. These samples were maintained in culture for characterization by enzyme typing using acetate cellulose electrophoresis, drug susceptibility to chloroquine, amodiaquine, mefloquine and quinine and antigenic diversity analysis using strain specific monoclonal antibodies. The results obtained have confirmed major variation among all samples studied: it was found consistent resistance to chloroquine moderated resistance to amodiaquine and quinine and susceptibility to low levels of mefloquine; only two isolates have shown susceptibility to all drugs in the *in vitro* assays. Enzyme typing showed presence of both GPI 1 and 2 and ADA 1 and 2 parasites, while for PEP and LDH all samples were type 1. Serotyping with PSA monoclonal antibodies showed presence of three different serotypes (II, III and IV). These results confirm: a) variation among samples for markers analysed; b) in this area and for the small number of samples studied, no significant differences or new types of parasites were seen.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi subsidiado pelo CNPq (PIDE VI e POLONOROESTE), Biomedical Research Institute e PAHO (Dr. F. J. Lopez-Anutuano). Agradecemos Dr. Jana McBride pelo fornecimento dos anticorpos monoclonais, produzidos pela Universidade de Edimburgo, Escócia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOX, E. D.; BOX, A. T. & YOUNG, M. D. — Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* from Porto Velho, Brazil. Amer. J. trop. Med. Hyg., 12: 300-304, 1963.
2. CARTER, R. & VOLLER, A. — The distribution on enzyme variation in populations of *Plasmodium falciparum* in Africa. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 69: 371-376, 1975.

DI SANTI, S. M.; BOULOS, M.; VASCONCELOS, M. A.; OLIVEIRA, S.; COUTO, A. & ROSARIO, V. E. — Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Estado de Rondônia, Brasil, utilizando microtestes de sensibilidade aos antimaláricos, tipificação enzimática e anticorpos monoclonais. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 29:142-147, 1987.

3. CORCORAN, L. M.; FORSYTH, K. P.; BIANCO, A. E.; BROWN, G. V. & KEMP, D. — Chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum* can involve deletions and are frequent in natural parasite populations. *Cell*, 44: 87-95, 1986.
4. COUTO, A.; ROSÁRIO, V. E. & WALLIKER, D. — Análise enzimática de 56 amostras de *Plasmodium falciparum* da Bacia Amazônica (Brasil). *Rev. bras. Malar.*, 35: 11-18, 1983.
5. FRANZEN, L.; SHABO, R.; PERLMANN, H.; WIGZELL, H.; WESTIN, G.; ASLUND, L.; PERSSON, T. & PETERSSON, U. — Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Lancet*, 1: 525-527, 1984.
6. JENSEN, J. B. & TRAGER, W. — *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasit.*, 63: 883-886, 1977.
7. LOPEZ-ANTUÑANO, F. J. & WERNSDORFER, W. H. — In vitro response to chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* to mefloquine. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57: 663-665, 1979.
8. McBRIDE, J.; NEWBOLD, C. I. & ANAND, R. — Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. exp. Med.*, 161: 160-180, 1985.
9. McBRIDE, J.; WALLIKER, D. & MORGAN, G. — Antigenic diversity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 217: 254-257, 1982.
10. PETERS, W. — Chemotherapy and drug resistance in malaria. London, Academic Press, 1970.
11. PINOTTI, M. — Um novo método de profilaxia da malária: associação de uma droga antimalárica ao sal de cozinha usado na alimentação diária. *Rev. bras. Malar.*, 6: 5-12, 1954.
12. RIECKMANN, K. H.; SAX, L. J.; CAMPBELL, G. H. & UREMA, J. E. — Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* — an in vitro microtechnique. *Lancet*, 1: 22-23, 1978.
13. ROSÁRIO, V. E. — Caracterização de cepas de *Plasmodium falciparum* do Brasil. *Rev. Fund. SESP*, 28 (2): 115-136, 1983.
14. SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. — Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse-field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75, 1984.
15. TAIT, A. — Analysis of protein variation in *Plasmodium falciparum* by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasit.*, 2: 205-218, 1981.
16. THAITHONG, S. — Biological characterization of malaria parasites by means of enzyme identification on pattern analysis. *WHO/Mal.*, 81: 935, 1981.
17. THAITHONG, S.; SUEBLINWONG, T. & BEALE, G. H. — Enzyme typing of some isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 75: 268-270, 1981.
18. TRAGER, W. & JENSEN, J. B. — Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 674-675, 1976.
19. VAN DER PLOEG, L. H. T.; SMITS, M.; PONNUDURAL, T.; VERMEULEN, A.; MEUWISSEN, J. H. E. T. & LANGSLEY, G. — Chromosome-sized DNA molecules of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 229: 658-661, 1985.
20. VASCONCELOS, M. A. & ROSÁRIO, V. E. — Testes de sensibilidade in vitro de amostras de *Plasmodium falciparum* da Bacia Amazônica (Brasil). *Rev. bras. Malar.*, 35: 21-28, 1983.
21. WALLIKER, D. — Genetic variation in malaria parasites. *Brit. med. Bull.* 38: 123-128, 1982.
22. WEBSTER, H. K.; BOUDREAU, E. F.; PAVANAND, K.; YONGVANITCHIT, K. & PANG, L. W. — Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Thailand using a microdilution radioisotope method. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 228-235, 1985.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of malaria. Report of a W.H.O. Scientific Group. *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.*, (375), 1967.

Recebido para publicação em 2/10/86.