AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO *in vitro* DE *Plasmodium falciparum*

Pardave L. Blanca¹, Arce B. Cecilia¹, Cabezas S. César²

RESUMEN

Se aislaron 08 cepas de *Plasmodium falciparum* a partir de 10 pacientes. Luego fueron adaptadas y mantenidas en cultivo *in vitro* durante 60 días en eritrocitos humanos grupo O, en medio RPMI 1640 enriquecido con plasma humano grupo O, bajo una atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de Nitrógeno y luego preservados a -70°C.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, aislamiento, Perú.

ABSTRACT

Eight strains of *Plasmodium falciparum* were isolated from 10 patients. They were adapted and maintained in culture during 60 days using human red cells, group O, RPMI 1640 medium and human plasma, group O, under 5% oxygen and 90% Nitrogen mixed gases. Finally, they were preserved at -70°C.

Key words: *Plasmodium falciparum*, isolation, Peru.

INTRODUCCION

La malaria o paludismo, es una enfermedad infecciosa producida por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura del mosquito del género *Anopheles*.

Esta enfermedad es endémica en nuestro país, donde circulan tres de las cuatro especies de *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum*, causando esta última la malaria maligna que puede producir la muerte del hospedero³.

En la actualidad se desconocen aún las cepas circulantes de *P. falciparum* en el país, su conocimiento es importante para comprender las características clínicas y epidemiológicas de la malaria migna, según se ha demostrado en otras partes del mundo¹.

Para establecer las características mencionadas, una primera etapa es el aislamiento de *P. falciparum* en medio de

cultivo a partir de casos conocidos de la enfermedad².

El desarrollo del parásito en los medios de cultivo nos permitirá mediante el estudio de la biología molecular del parásito, determinar las diferentes cepas de *P. falciparum*.

El trabajo se ha realizado con la finalidad de aislar *P. falciparum* en cultivo procedentes de diferentes regiones del país, iniciándose el estudio, en la zona de Loreto, por presentar las tasas más altas de infección por esta especie de *Plasmodium*⁵.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS:

Se colectó sangre venosa asépticamente en tubos heparinizados de 10 pacientes con diagnóstico parasitológico positivo (gota gruesa) para *Plasmodium falciparum* procedentes de las localidades de Santa Clara y Padre Cocha (Iquitos) y fueron transportadas desde la ciudad de Iquitos al Laboratorio del INS en Lima

¹ Laboratorio de Malaria, División de Parasitología.

² Director General del Centro Nacional de Laboratorios de Salud.

dentro de las 24 horas siguientes, conservadas en un frasco termo a 4°C.

LAVADO DE LAS MUESTRAS:

Los glóbulos rojos obtenidos fueron lavados tres veces en medio de cultivo RPMI 1640 incompleto (Sin plasma). El sedimento fue resuspendido en 5 mL de medio completo (RPMI 1640, suplementado con 25 mM de buffer HEPES, 25 mM bicarbonato de sodio, 25 uL de Sulfato de Gentamicina y 10% de plasma humano grupo O, y el pH fue ajustado a 7,4). La concentración de glóbulos tenía un hematocrito de 2% y se transfirió a frascos de 50 mL para cultivo⁶.

CULTIVO

La metodología empleada para el cultivo fue la descrita por Trager y Jensen⁴. Los parásitos fueron cultivados en medio RPMI 1640 completo; para lo cual se utilizó una estufa a 37°C y una mezcla de gases de 5% CO₂, 5% O₂ y 90 % de Nitrógeno. El medio fue cambiado cada dos días hasta que la concentración de parásitos se hizo detectable, a partir del cual se cambió diariamente el medio.

Eritrocitos frescos grupo O previamente lavados fueron añadidos al cultivo una vez por semana para aumentar el hematocrito al 2%. Cuando el porcentaje de parásitos alcanzó al 1%, estos fueron subcultivados para mantener las condiciones óptimas de los parásitos⁶.

El conteo de células infectadas se hizo en base a 10,000 hematíes.

Los eritrocitos parasitados con formas anulares predominantes fueron criopreservados a -70°C en congeladora REVCO para un posterior estudio de la sensibilidad a las drogas antimaláricas, del patrón genético parásito, así como para la preparación de antígenos para pruebas serológicas (IFI y ELISA).

RESULTADOS

De las 10 muestras procedentes de igual número de pacientes, en 02 se observaron gametocitos en la lámina del día 0 y en sus cultivos no se pudo recuperar la cepa.

De las 08 muestras restantes, la adaptación fue lenta en dos de ellas, una a los 23 días y otra a los 31 días. Las 06 restantes se adaptaron a los 7 días en promedio (Tabla 1).

Tabla 1. Cultivo de Cepas de *P. falciparum*

Paciente	Parasitemia Inicial	Fecha de Obtención	Fecha de Siembra	Observación de desarrollo	Días para adaptación	Procedencia de las cepas
1	3Fg	15-04-97	16-04-97	ND	-	Santa Clara (Iquitos)
2	+F	15-04-97	16-04-97	4 días	7	Santa Clara (Iquitos)
3	++F	15-04-97	16-04-97	4 días	7	Santa Clara (Iquitos)
4	++F	15-04-97	16-04-97	8 días	6	Santa Clara (Iquitos)
5	++F	15-04-97	16-04-97	4 días	23	Santa Clara (Iquitos)
6	++F	15-04-97	16-04-97	8 días	7	Santa Clara (Iquitos)
7	2Fg	16-04-97	17-04-97	ND	-	Río Grande (Iquitos)
8	++F	16-04-97	17-04-97	11 días	31	Padre Cocha (Iquitos)
9	++F	16-04-97	17-04-97	11 días	4	Padre Cocha (Iquitos)
10	++F	16-04-97	17-04-97	8 días	6	Padre Cocha (Iquitos)

DISCUSION

Es la primera vez en el Instituto Nacional de Salud, se logra aislar y mantener *in vitro* cepas de *P. falciparum*, siguiendo la técnica estandarizada por Trager y Jensen⁴. El contar con cepas aisladas y mantenidas *in vitro* permitirá realizar estudios de sensibilidad para drogas antimaláricas, considerando que la resistencia del *P. falciparum* viene construyendo un serio problema para su control.

Asimismo, a partir de los aislamientos se podran realizar estudios de variabilidad genética, que permitirá evaluar la virulencia del parásito como uno de los factores en la severidad o no de la infección por *P. falciparum*.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Liese, B.H. & Hammer, J. 1992 Malaria: New Patterns and Perspectives World Bank Technical Paper 183:7
- 2 Jesen, B. 1988. In Vitro cultivation of Malaria parasites. In: Malaria-Principies and Practices of Malariology, Wernsdorfer W.H. and Mc Gregor (Eds) Churchill, Livingstone 1:307-329
- 3 MINSA, 1997. Dirección Regional de Loreto. Supervisión y evaluación externa de las actividades de control de la Malaria realizadas durante el año 1996. Informe Técnico del Comité de Lucha Contra la Malaria, Lima 1997.
- 4 Trager, W And Jensen J. 1997. Human Malaria Parasite in continuous culture. Science 193: 673-675.
- 5 Ministerio de Salud, Doctrina, Normas y Procedimientos para el Control de la Malaria en el Perú, Programa de Control de la Malaria Documento Técnico. Lima, 1993.
- 6 Pardave B, Arce C, Gutierrez S. Manual de Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico de Malaria. 1997. Zavaleta A, Cabezas C, Chang J. (Eds). Serie de Normas Técnicas N° 14. Segunda Edición, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Red Nacional de Laboratorios de Salud. Lima. Art Lautrec. 121 págs.