Epidemiologia molecolare della malaria d'importazione in Italia: l'impiego di marcatori genetici e di saggi di sensibilità *in vitro* nello studio della clorochino-resistenza in *Plasmodium falciparum*

Michela Menegon[a], Anna Rosa Sannella[a], Carlo Severini[a], Maria Grazia Paglia[b], Alberto Matteelli[c], Pietro Caramello[d], Francesco Severini[a], Donatella Taramelli[e] e Giancarlo Majori[a]

[a]Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma
[b]Istituto Nazionale di Malattie Infettive IRCCS "Lazzaro Spallanzani", Roma
[c]Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi, Brescia
[d]Clinica Universitaria di Malattie Infettive, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino
[e]Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Milano

Riassunto. La diffusione della farmacoresistenza di *Plasmodium falciparum*, in particolar modo la clorochina-resistenza, rappresenta uno dei maggiori ostacoli al controllo della malaria. Numerosi studi hanno dimostrato che in *P. falciparum* la clorochino-resistenza è correlata alla presenza di specifiche mutazioni puntiformi nel gene *pfcrt*. Nel nostro studio abbiamo analizzato 120 isolati di *P. falciparum* relativi a casi di malaria importata in Italia per valutare la frequenza nel gene *pfcrt* delle mutazioni 76T e 220S. Inoltre, su 25 isolati plasmodiali è stata valutata la correlazione tra la presenza delle mutazioni e il livello di resistenza *in vitro* alla clorochina. I risultati del nostro studio hanno mostrato un'alta frequenza delle mutazioni 76T (65,8%) e 220S (60%) negli isolati analizzati ed una significativa associazione tra le mutazioni nel gene *pfcrt* e la resistenza *in vitro* alla clorochina (Pearson's test: $p< 0,001$). Lo screening molecolare dei casi importati può fornire un utile strumento per le attività di sorveglianza e per monitorare lo sviluppo e la diffusione della farmaco-resistenza nelle aree endemiche.

Parole chiave: Plasmodium falciparum, farmaco-resistenza, clorochina, *pfcrt*, epidemiologia molecolare, Italia, malaria importata.

Summary *(Molecular epidemiology of imported malaria in Italy: the use of genetic markers and in vitro sensitivity test in a study of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum)*. The emergence of *Plasmodium falciparum* drug-resistance, especially chloroquine resistance, represents one of the main obstacles to the control of malaria. Several studies have shown that in *P. falciparum* the mechanism of chloroquine resistance is linked to specific point mutations in the *pfcrt* gene of the parasite. In the present study we have analyzed 120 Italian imported malaria cases to evaluate the prevalence of 76T and 220S mutantions in the *pfcrt* gene. Moreover, the correlation between the presence of *pfcrt* point mutations and in vitro chloroquine resistance has been evaluated on 25 plasmodial isolates. The results showed a high prevalence of the pfcrt point mutations in isolates analyzed and a significant association between point mutations and *in vitro* chloroquine resistance. Molecular screening on imported malaria cases can be a useful tool to be employed in surveillance activity and also in monitoring the development and spread of drug resistance in endemic areas.

Key words: Plasmodium falciparum, drug resistance, chloroquine, *pfcrt*, molecular epidemiology, Italy, imported malaria.

INTRODUZIONE

La malaria rappresenta un problema sanitario di grande rilievo nelle numerose regioni endemiche della fascia tropicale e sub-tropicale ed è attualmente considerata una malattia riemergente. I paesi con reddito procapite inferiore ai 400 $ USA sono quelli più colpiti dall'infezione, evidenziando che la malaria è una delle più importanti patologie legate alla povertà.

Nei paesi dell'Unione Europea questa parassitosi non è più presente in forma endemica, ma la malaria d'importazione costituisce comunque un problema sanitario di rilievo. In Italia tale problema si è presentato concretamente già alla fine degli anni '70, ma è a partire dagli anni 1985-1986 che si registra un continuo, costante incremento dei casi di importazione. In particolare, il numero totale annuo è gradualmente

Indirizzo per la corrispondenza (Address for correspondence): Michela Menegon, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma. E-mail: menegonm@iss.it.

aumentato da 191 nel 1986 a 811 nel 1994, per poi stabilizzarsi, con una lieve tendenza al ribasso, al di sotto degli 800 casi nel triennio 94-96, e aumentare nuovamente nel triennio 1997-1999, fino a raggiungere un picco di oltre 1000 casi nel 1999 [1-3]. È da rilevare, inoltre, che nel 1997 si è verificato in Toscana un caso di malaria introdotta trasmesso da un vettore locale, il primo dopo 50 anni dall'interruzione della trasmissione in Italia [4]. Nel 2000 si è tuttavia verificata un'inversione di tendenza nel numero totale di casi importati annualmente, con una riduzione di circa l'8-10% per anno nel periodo 2000-2004 (dati ISS non pubblicati).

Nonostante i notevoli sforzi sostenuti da lungo tempo per il controllo della malaria, si registra complessivamente un forte aumento dell'incidenza di questa parassitosi a causa di diversi fattori tra i quali spicca la diffusione della resistenza di *P. falciparum* ai più tradizionali farmaci antimalarici [5]. Particolarmente preoccupante risulta la rapidità con cui è andata diffondendosi la resistenza ai 4-aminochinolici ed in particolar modo alla clorochina, che, grazie alle sue caratteristiche di efficacia, bassa tossicità ed economicità, ha rappresentato per decenni il farmaco di riferimento per la profilassi e la terapia della malaria. La resistenza nei confronti di questo farmaco è comparsa già a partire dagli anni '50, al confine tra la Cambogia e la Tailandia, e si è diffusa in tutte le aree endemiche del Sud America e in quasi tutta l'Asia e l'Oceania, entro la fine degli anni '80. Stesso destino è spettato ai Paesi africani, particolarmente all'Africa occidentale, dove la diffusione della resistenza alla clorochina ha determinato, negli ultimi anni, un notevole aumento dell'incidenza della morbidità e della mortalità infantile. Di recente, molti paesi africani si sono visti costretti a sostituire la clorochina come antimalarico di prima scelta con la sulfadossina-pirimetamina o con una terapia combinata a base di derivati dell'artemisinina [6].

Di fronte all'emergenza del fenomeno, particolare attenzione è stata rivolta allo studio delle basi molecolari della clorochino-resistenza nei plasmodi. Le prime ricerche effettuate hanno portato all'identificazione di due geni, il gene *pfmdr1* e il gene *cg2* e delle corrispettive proteine coinvolte nel trasporto di membrana a livello del vacuolo digestivo di *P. falciparum*. Tuttavia, studi successivi hanno portato all'esclusione di questi loci come determinanti della clorochino-resistenza [7]. Alla fine dell'anno 2000, è stato identificato un nuovo gene, il gene *pfcrt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) [8], codificante per una proteina transmembranaria del vacuolo digestivo, nel quale sono state riscontrate una serie di mutazioni puntiformi tra cui le mutazioni K76T e A220S ritenute cruciali per la resistenza alla clorochina [8, 9]. Successivi studi di trasfezione hanno dimostrato che l'inserzione di un allele *pfcrt* mutato conferisce, ad un ceppo sensibile, un fenotipo resistente [10], confermando il coinvolgimento di questo gene nel determinare la clorochino-resistenza.

Relativamente all'effetto prodotto dalla presenza di mutazioni del gene *pfcrt* sul meccanismo d'azione della clorochina, è stato osservato da Howard *et al.* che i ceppi resistenti presentano una diminuizione del pH vacuolare fino a valori di acidità ai quali la clorochina perde la sua attività nei confronti del pigmento malarico. Questi risultati sostengono l'ipotesi che il fenomeno della clorochino-resistenza sia imputabile ad un'aumentata acidificazione del vacuolo digestivo [11].

Sebbene il meccanismo che permette l'instaurarsi della resistenza richieda ulteriori indagini, molti altri studi supportano l'esistenza di un'alta correlazione tra il fenotipo clorochino-resistente e il polimorfismo della sequenza del gene *pfcrt*. Tali studi sono stati condotti sia in diverse aree endemiche - Uganda [12, 13], Mozambico [14], Sudan [15], Camerun [16], Brasile [17], Venezuela [18], Tailandia [19], Cambogia [20] - sia sui casi importati in Canada [21], Francia [22], Germania e altri paesi europei [23]. In particolar modo, il sequenziamento delle regioni codificanti del gene *pfcrt* di isolati resistenti alla clorochina di origine asiatica, africana e sud-americana, ha permesso di identificare, fin'ora, dieci mutazioni puntiformi [24]. Tuttavia, anche se le mutazioni a carico del gene *pfcrt* sono attualmente considerate efficaci marcatori della clorochino-resistenza in *P. falciparum*, recenti studi effettuati in Senegal e in Tailandia non confermano una correlazione del 100% tra la presenza di tali mutazioni e il fenotipo clorochino-resistente, suggerendo che altri geni, oltre al *pfcrt*, potrebbero essere coinvolti nella determinazione della resistenza alla clorochina in *P. falciparum* in queste aree. È importante notare, inoltre, che solo poche ricerche [20, 25-27] hanno focalizzato l'attenzione sulla presenza della mutazione A220S negli isolati clinici di *P. falciparum*.

Per fornire un ulteriore contributo alla conoscenza di questo fenomeno dagli aspetti ancora controversi, abbiamo intrapreso uno screening molecolare su 120 isolati di *P. falciparum* relativi a casi di malaria importata in Italia provenienti da differenti aree endemiche africane. Lo studio ha riguardato l'identificazione delle mutazioni K76T e A220S, la loro frequenza e il loro livello di associazione. Inoltre su 25 degli isolati presi in esame sono stati valutati i livelli di resistenza *in vitro* alla clorochina, comparandoli con quelli ottenuti da tre ceppi plasmodiali di riferimento.

MATERIALI E METODI

Isolati di Plasmodium falciparum

La raccolta dei campioni di sangue infetto da *P. falciparum*, relativa a 120 casi di importazione, è stata effettuata nel periodo compreso tra il 1998 e il 2003 tra i pazienti (immigrati e turisti) degli ospedali "Lazzaro Spallanzani" di Roma, "Spedali Civili" di Brescia e "Amedeo di Savoia" di Torino. Il livello di parassitemia riscontrato era compreso tra 30 e > 100 000 parassiti/µl. Il campione preso in esame era costituito per il 72,8% da uomini e per il 27,2% da donne, l'età compresa tra i 4 e i 58 anni, con una media di 34 anni. Tutti i pazienti sono stati trattati con adeguato proto-

collo terapeutico, utilizzando la meflochina o il chinino, in relazione alla gravità della malattia.

Estrazione del DNA plasmodiale

Il DNA totale degli isolati clinici è stato estratto da 200 µl dei campioni di sangue infetto, precedentemente raccolto in provette contenenti anticoagulante (citrato sodico) e congelato. Il DNA totale degli isolati clinici sottoposti ai saggi di clorochino-resistenza *in vitro* è stato estratto da 200 µl della coltura *in vitro*.

Tutte le estrazioni di DNA sono state effettuate facendo uso del QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, CA), seguendo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice.

Genotipizzazione degli isolati di Plasmodium falciparum

Due geni polimorfici, *msp1* e *msp2*, sono stati utilizzati per individuare le infezioni sostenute da più cloni di *P. falciparum*. Un frammento di ciascun gene è stato amplificato secondo il protocollo descritto da Wooden *et al.* [28]. I campioni risultanti avere infezioni policlonali sono stati esclusi dal presente studio.

Analisi delle mutazioni del gene pfcrt

Per l'identificazione della mutazione 76T, un frammento di 212 nucleotidi del gene *pfcrt*, frammento che include i codoni 72-76, è stato amplificato come segue: a 10 µl di ciascun campione di DNA estratto, sono stati addizionati 40 µl di una miscela di reazione composta da: 1X tampone per PCR (Promega), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun dNTP (Promega), 2,5 U di Taq DNA polymerase (Promega), 20 pmoli di ciascun primer TCRP2A for (senso) (5' CCC TTG TCG ACC TTA ACA GAT GGC TCA CG 3') e TCRP2 rev (antisenso) (5' CGG ATG TTA CAA AAC TAT AGT TAC C 3') e H_2O fino ad un volume finale di 50 µl. Il programma di amplificazione utilizzato prevedeva 35 cicli alle seguenti temperature: 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e 1 min e 30 s a 72 °C in un DNA thermal cycler (modello 9600; Perkin Elmer).

Per l'identificazione della mutazione A220S è stato amplificato un frammento di 297 nucleotidi del gene *pfcrt*, utilizzando per l'amplificazione il primer New220 for (senso) (5' TCT CGG AGC AGT TAT TAT TGT TG 3') e il primer New220 rev (antisenso) (5' CAT GTT TGA AAA GCA TAC AGG C 3'). In questo caso, la miscela di reazione è stata sottoposta alle seguenti condizioni di amplificazione: 35 cicli di 94 °C per 30 s, 57 °C per 15 s, 53 °C per 15 s, 68 °C per 45 s.

Colture cellulari e saggi in vitro *di sensibilità ai farmaci*

Crio-preservazione degli isolati plasmodiali. - Campioni di sangue infetto da *P. falciparum* di pazienti ospedalizzati sono stati raccolti in vacutainer contenente l'anticoagulante acido citrico. Il siero e i globuli bianchi sono stati eliminati dai campioni mediante lavaggi con RPMI 1640 e centrifugazione, ed il pellet di eritrociti infetti cosi ottenuto è stato risospeso in 2 volumi di *glycerolite*, aliquotato e conservato a - 80°C.

Colture plasmodiali. - I campioni, dopo scongelamento, sono stati fatti crescere in RPMI 1640, supplementato con il 10% di siero umano, ed in presenza, per i primi sette giorni, di macrofagi murini che favoriscono la coltura e il mantenimento *in vitro* di isolati di *P. falciparum* [29], e successivamente coltivati in accordo con il metodo descritto da Trager e Jansen [30]. La sensibilità alla clorochina è stata saggiata con un test enzimatico dove viene misurata l'attività della lattato deidrogenasi del plasmodio (test pLDH) [31] su 16 isolati clinici, e mediante il test WHO Mark III, in accordo con le istruzioni fornite dall'OMS, su 9 isolati. I test pLDH sono stati effettuati presso l'Istituto Superiore di Sanità; i test WHO Mark III sono stati eseguiti presso l'Ospedale "Amedeo di Savoia" di Torino.

RISULTATI

La caratterizzazione molecolare dei campioni da noi inizialmente raccolti (n. = 132), ottenuta mediante amplificazione dei geni polimorfici *msp1* e *msp2*, ha portato all'identificazione di 12 campioni con infezioni policlonali, individuabili dalla presenza di più bande nello stesso campione per uno o entrambi i geni amplificati *(Fig. 1)*. Tali campioni sono stati esclusi dallo studio.

Il maggior numero di infezioni, relative ai 120 casi analizzati, provengono dal Ghana (n. = 17, 14,2%), dal Senegal (n. = 16, 13,3%), dalla Nigeria (n. = 15, 12,5%) e dalla Costa D'Avorio (n. = 12, 10%), paesi che costituiscono, infatti, la fonte principale dei casi di malaria d'importazione in Italia. In generale, il 74,2% degli isolati è stato importato dall'Africa occidentale, il 10% dall'Africa Centrale, l'8,3% dall'Africa orientale e il 7,5% dall'Africa meridionale.

L'analisi molecolare delle mutazioni del gene *pfcrt* è stata ottenuta su tutti i 120 isolati analizzati. I risultati relativi alla suddetta analisi sono riassunti nella *Tabella 1*. Il sequenziamento della regione comprensiva dei codoni 72-76 ha messo in evidenza un'alta frequenza delle tre mutazioni 74I-75E-76T, presenti nel 65,8% (79/120)

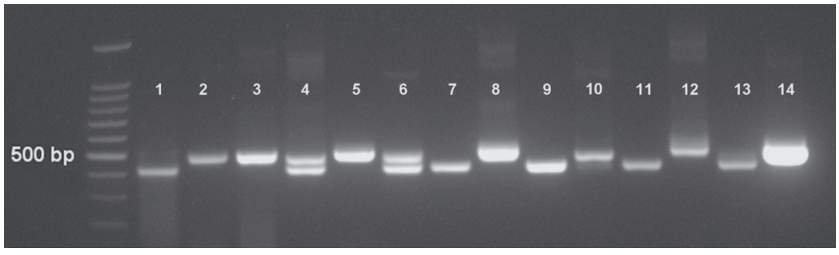

Fig. 1 | *Gel d'agarosio all'1,7% rappresentativo della genotipizzazione, ottenuta su 14 degli isolati analizzati, per mezzo dell'amplificazione del gene polimorfico msp2. Le due bande osservabili nei campioni 4 e 6 indicano la presenza di infezioni policlonali.*

Tabella 1 | *Mutazioni puntiformi del gene pfcrt identificate nei 120 casi malaria importata*

Isolati	Origine	Codoni pfcrt				Isolati	Origine	Codoni pfcrt			
		74	75	76	220			74	75	76	220
BS6	Ghana	I	E	T	S	SPA2	Niger	I	E	T	S
BS7	Ghana	V	M	K	A	SPA7	Niger	I	E	T	S
BS12	Ghana	I	E	T	A	SPA8	Niger	V	M	K	A
BS17	Ghana	I	E	T	S	SPA17	Niger	I	E	T	S
BS20	Ghana	I	E	T	S	SPA29	Niger	I	E	T	A
BS22	Ghana	I	E	T	S	SPA40	Niger	I	E	T	S
BS27	Ghana	V	M	K	A	SPA45	Niger	I	E	T	S
BS29	Ghana	V	M	K	A	BS52	Niger	V	M	K	A
BS30	Ghana	I	E	T	A	TO14	Niger	I	E	T	S
BS31	Ghana	I	E	T	S	TO15	Niger	I	E	T	S
BS37	Ghana	V	M	K	A	TO16	Niger	I	E	T	S
BS40	Ghana	I	E	T	S	BS34	Mali	V	M	K	A
BS41	Ghana	I	E	T	S	BS47	Mali	I	E	T	S
BS43	Ghana	V	M	K	A	SPA5	Mali	V	M	K	A
BS44	Ghana	I	E	T	S	SPA36	Mali	V	M	K	A
BS46	Ghana	I	E	T	S	SPA39	Mali	V	M	K	A
BS50	Ghana	I	E	T	S	SPA41	Mali	I	E	T	S
BS1	Senegal	V	M	K	A	TO4	Mali	V	M	K	A
BS4	Senegal	I	E	T	S	SPA24	Kenia	I	E	T	S
BS10	Senegal	I	E	T	S	SPA3	Kenia	I	E	T	S
BS26	Senegal	V	M	K	A	SPA43	Kenia	I	E	T	S
BS28	Senegal	I	E	T	S	SPA46	Kenia	I	E	T	S
BS32	Senegal	I	E	T	S	BS9	Kenia	V	M	K	A
BS35	Senegal	I	E	T	S	BS51	Kenia	I	E	T	A
BS38	Senegal	I	E	T	S	TO18	Kenia	I	E	T	A
BS42	Senegal	I	E	T	S	SPA16	Guinea B.	V	M	K	S
BS18	Senegal	I	E	T	S	SPA20	Guinea B.	I	E	T	S
SPA9	Senegal	I	E	T	S	SPA42	Guinea B.	V	M	K	A
SPA27	Senegal	I	E	T	S	TO19	Guinea B.	V	M	K	A
SPA13	Senegal	V	M	K	A	TO20	Guinea B.	V	M	K	A
BS45	Senegal	I	E	T	S	SPA15	Camerun	V	M	K	A
BS48	Senegal	I	E	T	S	SPA30	Camerun	I	E	T	S
BS49	Senegal	I	E	T	S	SPA35	Camerun	I	E	T	A
BS2	Nigeria	V	M	K	A	BS25	Camerun	I	E	T	S
BS8	Nigeria	I	E	T	S	TO17	Camerun	I	E	T	S
BS13	Nigeria	V	M	K	A	SPA32	RDC	V	M	K	A
BS14	Nigeria	I	E	T	S	SPA33	RDC	V	M	K	A
BS19	Nigeria	I	E	T	S	SPA49	RDC	I	E	T	S
BS21	Nigeria	I	E	T	S	SPA51	RDC	I	E	T	S
BS23	Nigeria	I	E	T	S	TO11	RDC	I	E	T	S
TO3	Nigeria	I	E	T	S	Spa54	Mozambico	I	E	T	S
TO6	Nigeria	I	E	T	S	SPA1	Mozambico	V	M	K	A
TO7	Nigeria	V	M	K	A	SPA23	Mozambico	I	E	T	S
TO10	Nigeria	I	E	T	A	SPA31	Mozambico	V	M	K	A
TO22	Nigeria	I	E	T	S	BS3	Benin	I	E	T	S
SPA28	Nigeria	V	M	K	A	TO12	Benin	I	E	T	S
SPA34	Nigeria	I	E	T	S	TO13	Benin	V	M	K	A
SPA53	Nigeria	I	E	T	S	SPA25	RCA	I	E	T	S
BS33	Costa D'Avorio	I	E	T	S	BS11	RCA	V	M	K	S
BS36	Costa D'Avorio	V	M	K	A	BS15	Burkina F.	V	M	K	A
BS39	Costa D'Avorio	I	E	T	A	BS16	Burkina F.	V	M	K	A

Tabella 1 | *Continua*

Isolati	Origine	Codoni pfcrt				Isolati	Origine	Codoni pfcrt			
		74	75	76	220			74	75	76	220
SPA10	Costa D'Avorio	V	M	K	A	SPA48	Madagascar	V	M	K	A
SPA11	Costa D'Avorio	V	M	K	A	TO21	Madagascar	V	M	K	A
SPA44	Costa D'Avorio	V	M	K	A	SPA38	Zambia	I	E	T	S
SPA50	Costa D'Avorio	I	E	T	S	SPA18	Zambia	I	E	T	S
SPA52	Costa D'Avorio	I	E	T	S	SPA47	Sierra L.	V	M	K	A
TO2	Costa D'Avorio	I	E	T	S	SPA14	Ruanda	I	E	T	S
TO5	Costa D'Avorio	V	M	K	A	SPA4	Burundi	I	E	T	S
TO8	Costa D'Avorio	I	E	T	S	SPA19	Tanzania	I	E	T	S
TO9	Costa D'Avorio	I	E	T	A	SPA26	RSA	I	E	T	S

BS, TO, SPA = isolati di P. falciparum *da casi di malaria importata registrati negli ospedali "Lazzaro Spallanzani" di Roma, "Spedali Civili" di Brescia e "Amedeo di Savoia" di Torino; RDC = Rep. Democratica del Congo; RCA = Rep. Centro Africana; RSA = Rep. del Sud Africa.*
V74-M75-K76-A220 = codoni wild type; 74I-75E-76T-220S = codoni mutati.

Tabella 2 | *Associazione tra i genotipi del gene pfcrt e risposta in vitro alla clorochina degli isolati saggiati inclusi nello studio*

Isolati	Origine	pfcrt 74	pfcrt 75	pfcrt 76	pfcrt 220	CQ sensibilità	Test pLDH a (CQ IC50)a	Test WHO Mark III (CQ IC50)b
3D7c	Olanda	wt	wt	wt	wt	sensibile	0,014	<8
W2c	Tailandia	m	m	m	m	resistente	0,20	16
FCR-1/FV0c	Vietnam	m	m	m	m	resistente	0,10	
BS44	Ghana	m	m	m	m	resistente	0,10	
BS45	Senegal	m	m	m	m	resistente	0,10	
BS46	Ghana	m	m	m	m	resistente	0,127	
BS47	Mali	m	m	m	m	resistente	0,140	
BS48	Senegal	m	m	m	m	resistente	0,114	
BS49	Senegal	m	m	m	m	resistente	0,10	
BS50	Ghana	m	m	m	m	resistente	0,085	
BS51	Kenia	m	m	m	wt	resistente	0,132	
BS52	Niger	wt	wt	wt	wt	sensibile	0,013	
SPA34	Nigeria	m	m	m	m	resistente	0,120	
SPA35	Camerun	m	m	m	wt	resistente	0,080	
SPA36	Mali	wt	wt	wt	wt	sensitive	0,015	
SPA38	Zambia	m	m	m	m	resistente	0,10	
SPA40	Niger	m	m	m	m	resistente	0,118	
SPA48	Madagascar	wt	wt	wt	wt	sensibile	0,013	
SPA54	Mozambico	m	m	m	m	resistente	0,110	
TO2	Costa D'avorio	m	m	m	m	sensibile		4
TO7	Nigeria	wt	wt	wt	wt	sensibile		1
TO17	Camerun	m	m	m	m	sensibile		4
TO3	Nigeria	m	m	m	m	resistente		8
TO18	Kenia	m	m	m	wt	resistente		16
TO19	Guinea B.	wt	wt	wt	wt	sensibile		4
TO20	Guinea B.	wt	wt	wt	wt	sensibile		1
TO21	Madagascar	wt	wt	wt	wt	resistente		16
TO22	Nigeria	m	m	m	m	sensibile		1

BS, TO, SPA = isolati di P. falciparum *da casi di malaria importata registrati negli ospedali "Lazzaro Spallanzani" di Roma, "Spedali Civili" di Brescia e "Amedeo di Savoia" di Torino.*
CQ = clorochina; wt = wild type; m = mutato.
a = la resistenza alla clorochina nel test pLDH corrisponde ad un valore di IC50 ≥ 0.100 μg/ml.
b = la resistenza alla clorochina nel test WHO Mark III corrisponde ad un valore di IC50 ≥ 8 pmoli/pozzetto.
c = ceppi di laboratorio.

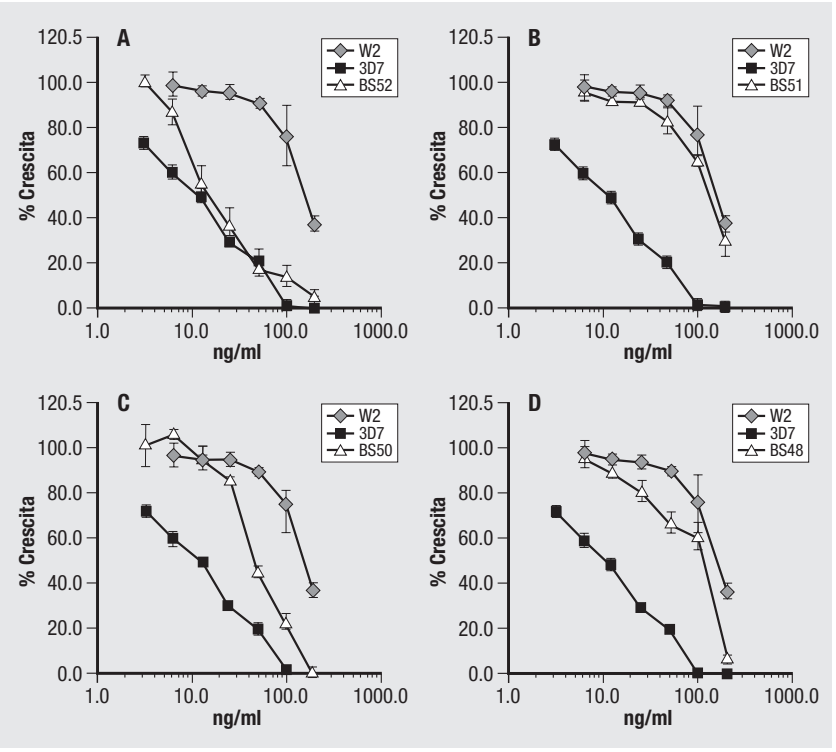

Fig. 2 | *Curve di dose risposta alla clorochina in quattro differenti isolati di Plasmodium falciparum (grafici A-D) sottoposti al test in vitro pLDH. I dati sono stati espressi come percentuale di crescita dei parassiti alle diverse concentrazioni del farmaco, comparata ai controlli (W2: ceppo resistente; 3D7: ceppo sensibile) coltivati in assenza di farmaco. I risultati rappresentano la media ± SD di tre esperimenti con tre repliche ciascuno. La resistenza alla clorochina nel test pLDH corrisponde ad un valore di IC50 ≥ 100 ng/ml.*

degli isolati, mentre per la 220S la frequenza registrata è stata del 60% (72/120).

I nostri risultati hanno mostrato anche un'alta frequenza della doppia mutazione 76T-220S (58,3%, 70/120). L'allele 76T- A220 (5,8%) è stato riscontrato in 7 isolati, mentre l'allele K76-220S (1,6%) in 2 isolati soltanto.

Per 28 isolati di *P. falciparum* è stata testata *in vitro* la suscettibilità alla clorochina. Per 16 isolati è stato effettuato il test immunoenzimatico pLDH, usando come controllo tre ceppi di riferimento, mentre i rimanenti 9 isolati sono stati sottoposti al test WHO Mark III. I risultati dei test *in vitro* sono riportati in *Tabella 2* e in *Figura 2*.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati dello screening molecolare effettuato sugli isolati, analizzati mostrano un'alta frequenza delle mutazioni 76T (65,8%) e 220S (60%) ed una loro significativa associazione (Pearson's test: $p < 0,001$) corrispondente ad una frequenza della presenza della doppia mutazione del 58,3%.

I risultati dei test *in vitro* hanno evidenziato che le mutazioni 74I, 75E e 76T sono sempre presenti negli isolati resistenti, tranne che in due dei test WHO Mark III. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta, secondo noi, alla difficoltà di interpretare correttamente i risultati di questo tipo di test, dato che in tutti i 19 isolati saggiati con il test pLDH, inclusi i ceppi di riferimento, è stata riscontrata una associazione altamente significativa tra mutazioni e clorochino-resistenza (Pearson's test: $p < 0,001$). Un così alto livello di significatività è probabilmente dovuto sia all'associazione del 100% osservata tra gli alleli 74I e 75E con l'allele 76T, sia alla alta frequenza dell'allele 220S riscontrata negli isolati risultati resistenti al test *in vitro*. Tuttavia, non è stato osservato nessun aumento significativo della resistenza ($p = 0,525$, two-sample Wilcoxon rank-sum and Mann-Whotney test) negli isolati BS44 e BS50 che presentano la doppia mutazione 76T/220S rispetto agli isolati con la sola mutazione 76T (SPA35-TO18 e BS51). Questi risultati, quindi, confermano l'affidabilità della mutazione 76T (e delle mutazioni correlate 74I e 75E) quale marcatore molecolare per la clorochino-resistenza. Al contrario, rimane ancora da definire il ruolo della mutazione puntiforme 220S nella resistenza a questo farmaco, in quanto, pur avendo riscontrato questa mutazione sempre associata agli isolati resistenti, la frequenza della stessa è più bassa rispetto alla 76T e tale presenza, inoltre, non influenza i livelli di resistenza saggiati nei test *in vitro*.

L'uso della clorochina è attualmente scoraggiato in tutti i paesi endemici a causa della diffusione della resistenza a questo farmaco, tuttavia, lo studio delle basi biochimiche e molecolari del meccanismo di resistenza (non ancora del tutto delucidato) rappresenta ancora un argomento di elevato interesse scientifico, sia perché la comprensione delle strategie che permettono al parassita di eludere l'attività della clorochina possono produrre informazioni basilari per lo sviluppo di nuovi antimalarici, in particolar modo quelli appartenenti alla stessa classe di farmaci (aminochinolinici) [32], sia perché nei paesi in cui la clorochina è stata già rimpiazzata da altri farmaci, questo studio rappresenta un utile strumento di indagine per monitorare il ristabilirsi della sensibilità alla clorochina, come è stato già osservato di recente in Malawi [27, 33].

Gli studi di efficacia terapeutica rappresentano il *gold standard* per il monitoraggio della resistenza agli antimalarici e per indurre le autorità sanitarie locali a cambiare

la strategia per il trattamento della malaria. Questi studi, tuttavia, sono di difficile realizzazione in quanto richiedono l'arruolamento di un elevato numero di persone che devono essere monitorate clinicamente ad intervalli regolari, condizione spesso di difficile realizzazione nei paesi endemici. Inoltre, i test *in vivo* forniscono risultati sull'efficacia di un farmaco senza tener conto dello stato di premunizione del paziente né di eventuali reinfezioni.

L'approccio molecolare, al contrario, è uno strumento funzionale per questo tipo di indagini, come dimostrato dalla sua applicazione allo studio della resistenza agli antifolati [34, 35]. L'impiego di questo strumento nel monitoraggio dei casi di malaria importata offre numerosi vantaggi addizionali: a) permette l'analisi di un alto numero di isolati provenienti da differenti aree malariche, senza dover affrontare le difficoltà che caratterizzano gli studi sul campo; b) le indagini effettuate su soggetti non immuni, quali sono, generalmente, i turisti e gli immigrati ormai residenti in Italia, facilitano l'interpretazione dell'esito di una terapia, potendo escludere reinfezioni e gradi diversi di immunità dei pazienti; c) allo stesso modo, la correlazione tra dati molecolari e efficacia terapeutica risulta più semplice perché non inficiata da troppe variabili (es. biodisponibilità del farmaco); d) i dati molecolari ottenuti da questi soggetti possono fornire una valida e complementare risorsa di informazioni per la strategia terapeutica da adottare nei paesi endemici.

In conclusione, i test molecolari possono rappresentare una efficace strategia di sorveglianza globale della resistenza agli antimalarici tenendo principalmente conto del fatto che le metodiche molecolari, risultando più facilmente standardizzabili, permettono il confronto dei dati ottenuti in studi diversi e rappresentano, quindi, una effettiva fonte di informazioni sullo sviluppo e la diffusione della farmacoresistenza dei plasmodi malarici.

Ricevuto il 5 novembre 2005.
Accettato il 9 febbraio 2006.

Bibliografia

1. Majori G, Sabatinelli G, Cavallini C, Squarcione S. Casistica della malaria di importazione in Italia nel periodo 1985-1989. *Parassitologia* 1990;32:173-4.
2. Sabatinelli G, Majori G, D'Ancona F, Romi R. Malaria epidemiological trends in Italy. *Eur J Epid* 1994;10:399-403.
3. Romi R, Boccolini D, Majori G. Malaria surveillance in Italy: 1997 analysis and 1998 provisional data. *Eurosurveillance* 1999;4:85-7.
4. Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna P, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M. Introduced malaria in Maremma Italy, decades after eradication. *Lancet* 1998;351:1246-8.
5. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature* 2002;415:670-2.
6. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Werndorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infec Dis* 2002;2:209-18.
7. Fidock DA, Nomura T, Cooper R, Su XZ, Talley AK, Wellems TE. Allelic modifications of the cg2 and cg1 genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol* 2000;110:1-10.
8. Fidock DA, Nomura T, Talley AT, Cooper RA, Dzekunov S, Ferdig MT, Ursos LMB, Sidhu AS, Naudé B, Deitsch KW, Su X, Wellems TE. Mutations in the *Plasmodium falciparum*. Digestive vacuole transmembrane protein Pfcrt and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000;6:861-71.
9. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su X, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *New Engl J Med* 2001;344:95-102.
10. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science* 2002;298:210-3.
11. Howard EM, Zhang H, Roepe PD. A novel transporter, Pfcrt, confers antimalarial drug resistance. *J Membr Biol* 2002;190:1-8.
12. Dorsey G, Kamya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfcrt point mutation and chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis* 2001;187:1417-20.
13. Talisuna AO, Kyosiimire-Lugemwa J, Langi P, Mutabingwa TK, Watkins W, Van Marck E, Egwang T, D'Alessandro U. Role of the pfcrt codon 76 mutation as a molecular marker for population-based surveillance of chloroquine (CQ)-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Ugandan sentinel sites with high CQ resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96:551-6.
14. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A, Alonso PL. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcrt) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001;183:1413-6.
15. Babiker A, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High level of chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene pfcrt and the multidrug resistance gene pfmdr1. *J Infect Dis* 2001;183:1535-8.
16. Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaoundé, Cameroon. *J Infect Dis* 2001;183:1828-31.
17. Vieira PP, das Graças Alecrim M, da Silva LHP, Gonzales-Jimenez I, Zalis MG. Analisys of the Pfcrt K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brasil. *J Infect Dis* 2001;183:1832-3.
18. Contreras CE, Cortese JF, Caraballo A, Plowe CV. Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolivar. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:400-5.
19. Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, do Rosario VE, Cravo P. Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria J* 2002;1:12.
20. Lim P, Chy S, Ariey F, Incardona S, Chim P, Sem R, Denis MB, Hewitt S, Hoyer S, Socheat D, Merecreau-Puijalon O, Fandeur T. pfcrt polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:87-94.
21. Labbé AC, Patel S, Crandall I, Kain KC. A molecular surveillance system for global patterns of drug resistance in imported malaria. *Emerg Infect Dis* 2003;9:33-6.
22. Durand R, Jafari R,Vauzelle J, Delabre JF, Jesic Z, Le Bras J. Analysis of pfcrt of point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2001;114:95-102.
23. Jelinek T, Peyerl-Hoffmann G, Muhlberger N, Wichmann O, Wilhelm M, Schmider N, Grobusch MP, Von Sonnenburg F, Gascon J, Laferl H, Hatz C, Alifrangis M, Burchard G, McWhinney P, Schulze M, Kollaritsch H, Da Cunha S, Beran J, Kern P, Gjorup I, Cuadros J. Molecular surveillance of drug resistance through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *Malaria J* 2002;1:11.
24. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001; 184:770-6.

25. Daily JP, Roberts C, Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wirth DF. Prevalence of *Plasmodium falciparum* pfcrt polymorphisms and in vitro chloroquine sensitivity in Senegal. *Parasitology* 2003;126:401-5.
26. Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q. pfcrt allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3500-5.
27. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Zungu IL, Tsukahara T, Eto H, Kobayakawa T, Bjorkman A, Tanabe K. Expansion of wild type allele rather than back mutation in pfcrt explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol* 2004;135: 159-63.
28. Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1993;9:303-5.
29. Trenholme KR, Phillips RS. The use of murine feeder cells in the cultivation of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Res* 1989;75:518-21.
30. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976;193:673-5.
31. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:739-41.
32. Davis TM, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF. Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs* 2005;65:75-87.
33. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 2003;187:1870-5.
34. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, Dao LD, Mshinda H, Tanner M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* 1997;89:161-77.
35. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* 1997;176(6):1590-6.