

## Monografía

# La malaria y su sombra: Diagnóstico y tratamiento (fin de la serie)

Francisco J López Antuñano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Investigador Titular, Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mor., México

### **Medición de anticuerpos contra plasmodios**

Se han propuesto gran variedad de pruebas, como hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia directa e indirecta, inmunoradiometría y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Los anticuerpos IgG pueden persistir en el suero después de que el paciente ha curado, por lo que no pueden ser usadas estas pruebas para determinar la presencia actual de plasmodios en la sangre. Sin embargo la medición de anticuerpos puede tener gran valor en el estudio seroepidemiológico masivo para analizar la evolución de la malaria retrospectivamente. Los estudios serológicos estandarizados proveen: a) evidencia del establecimiento de tasas de endemidad, incluyendo prevalencia por especies parasitarias y su distribución por grupos de edad; b) datos sobre cambios en el grado de transmisión en relación a las medidas de control aplicadas; c) delimitación de áreas con transmisión de malaria; d) identificación y seguimiento de focos de transmisión persistente; e) identificación de especie parasitaria y f) tamizaje de donadores de sangre. Las pruebas más usadas en este tipo de estudios son la inmunofluorescencia indirecta y el ELISA. La modificación de este método permite identificar simultáneamente anticuerpos IgG e IgM en el mismo suero. El ELISA que usa como antígeno la proteína circum esporozoítica, mide la respuesta humoral de inmunógenos y es útil en estudios longitudinales para definir áreas con transmisión de malaria. La identificación de plasmodios también se hace por medio de disecciones de mosquitos anofelinos vectores en los que se determina el índice oocístico y esporozoítico en el intestino y glándulas salivares del artrópodo, respectivamente.<sup>28</sup> En laboratorios donde se dispone de facilidades para microscopía de inmunofluorescencia indirecta es muy eficiente el examen microscópico directo de los plasmodios marcados con isotiocianato de fluoresceína en la muestra de sangre del paciente, con luz UV.<sup>29</sup>

Al comparar el ensayo ELISA con el método de inmunofluorescencia indirecta para medir anticuerpos de malaria, usando antígeno de *Plasmodium falciparum*, se puede concluir que el ELISA es suficientemente sensible y especí-

fico para tamizar donadores de sangre en riesgo<sup>30</sup> (Wang et al, 1987).

El método de ELISA para identificar antígeno de *Plasmodium vivax* muestra sensibilidad de 98.5% y especificidad de 100%. La menor parasitemia fue de 3 parásitos/10<sup>5</sup> eritrocitos en frotis de sangre<sup>31</sup> (Voller et al, 1994).

Por inmunofluorescencia se pueden determinar anticuerpos IgM e IgG anti-gametocitos bloqueadores de la transmisión de *P. falciparum*. Los sueros de personas que habitan áreas hiperendémicas inmunoprecipitan los antígenos de 230 y 48/45 kD de los gametocitos. Para investigar la especificidad de los epítopos de las muestras de suero de los pacientes adultos se procesaron ELISAs competitivos con 3 anticuerpos monoclonales (AMs) que bloquean la transmisión y reconocen los diferentes epítopos con el antígeno 48/45 kD. Los anticuerpos específicos de estos epítopos se encontraron en 60% de los sueros, mientras cerca de la tercera parte fueron capaces de inhibir la liga con por lo menos dos AMs<sup>32</sup> (Ong et al,...).

### **Benzotiocarboxipurina (BCP)**

La sensibilidad del diagnóstico coloreando las GGS con este fluorocromo es de 92% y la especificidad, de 98%.<sup>33</sup> El argumento a favor es que en igualdad de sensibilidad y especificidad de las GGS coloreadas con tinciones derivadas del Romanowsky, es la rapidez con que se identifican los plasmodios. Los argumentos en contra de utilizar esta técnica son: 1) la necesidad de contar con microscopios costosos de iluminación con luz UV y 2) la tinción de remanentes nucleares de los eritrocitos (cuerpos de Howell-Jolly), que podrían confundirse con la cromatina de los plasmodios. Este segundo argumento en contra por supuesto que puede corregirse con el adecuado adiestramiento.<sup>34</sup>

### **Proteína C-reactiva y amiloide**

Gillespie et al<sup>35</sup> (1991) midieron la concentración sérica de la proteína C-reactiva y la proteína amiloide que se presentan en la fase aguda de la infección malárica para

evaluar la gravedad de las infecciones maláricas. También se determinaron el porcentaje de glóbulos rojos infectados, los electrolitos, la función hepática, la hemoglobina y las cuentas lobulares y de plaquetas. El promedio de la proteína C-reactiva fue de 49.0 mg/L suero y la proteína amiloide A, 28 mg/L bajando a los límites normales al 7o. día de iniciado el tratamiento. Ambas proteínas guardaban correlación con el sodio en suero. Este procedimiento es de valor en la evaluación de la gravedad de la malaria por *P falciparum*, y para hacer el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

### **Amplificación del ADN - Reacción en cadena de la polimerasa**

Cuando se dispone solamente de muestras de sangre fijadas y coloreadas, puede ser necesaria la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de los loci polimórficos para MSA1 y MSA2 del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Plasmodium*. En 92% de GGS positivas, se pudo demostrar el producto de la PCR y en el caso de infecciones con baja parasitemia se encontraron en el 71% de las MES. En todas las fallas, la preparación del ADN fue el factor limitante<sup>36</sup> (Edoh, et al, 1991).

Brown et al<sup>37</sup> (1992), intentaron determinar la frecuencia de las infecciones mixtas de *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* y compararon los resultados del examen de la GGS coloreadas con Giemsa (con aumento total de 1000X, el cual consideramos inadecuado) con la amplificación enzimática del gen de la proteína circumesporozoítica extraída de muestras de sangre en papel filtro para amplificar el ADN especie específico por medio de la PCR e hibridización con sondas radio etiquetadas de *P. falciparum* y *P. vivax*. Se encontró que el 9% (3/32) de las infecciones diagnosticadas microscópicamente como *P. falciparum* y el 5% (5/104) de las diagnosticadas microscópicamente como infecciones con *P. vivax* eran mixtas, por medio del sistema de sondas PCR/ADN, mientras sólo un caso resultó mixto por ambos métodos: microscopía y PCR. Es importante tener presente la posibilidad de infecciones mixtas, sobre todo cuando existe la posibilidad de *P. falciparum* resistente a la cloroquina en virtud de que el tratamiento del ataque agudo de malaria podría ser diferente al de la infección por *P. vivax*.

### **Manejo de la enfermedad grave**

Tres casos de malaria severa producida por *P. falciparum* con alta parasitemia, uno de ellos complicado con coagulación diseminada intravascular, fueron tratados con exanguinotransfusión (EST), además de la quimioterapia convencional. Los tres se recuperaron. Hay pocos reportes al

respecto, por lo que este tratamiento merece mayor atención y evaluación;<sup>38-40</sup> se basa en que en los casos severos de infecciones por *P. falciparum*, conviene bajar el riesgo rápidamente reemplazando los eritrocitos parasitados con eritrocitos sanos y corregir la anemia grave. Además, se remueven antígenos plasmódiales tóxicos. No obstante algunos informes sobre el beneficio de la EST desde 1974, este tratamiento es controvertido y su papel y técnica ha sido definido pobremente. Wilkinson et al<sup>41</sup> (1994) desarrollaron un modelo matemático de EST que relaciona el volumen de intercambio para reducir la parasitemia y cambiar la concentración de hemoglobina.

### **Tratamiento**

Debe hacerse todo esfuerzo para mejorar el diagnóstico parásitológico oportuno, asegurando la mayor sensibilidad y especificidad con el objeto de administrar de inmediato el tratamiento específico. En la mayor parte de los países del mundo, tanto las formas asexuadas como los gametocitos de *Plasmodium vivax* son sensibles a la dosis única de 10 mg/kg de cloroquina-base administrada vía oral. Es innecesario, inseguro y dispendioso usar cualquier otra droga. Deben hacerse esfuerzos para registrar la tasa de recaídas después de esa dosis única de cloroquina con el fin de definir políticas y estrategias.

La actividad antimalárica y los efectos deletéreos (hemolíticos, metahemoglobinémicos y de detoxificación) de la primaquina parecen depender de varios productos de biotransformación de la droga. No se conocen con precisión sus mecanismos de formación y degradación, ni sus efectos biológicos, particularmente en los seres humanos. La primaquina aparentemente se absorbe rápidamente, pero no se conoce hasta qué grado, ni cómo está sujeta a modificaciones por acción de otras substancias químicas o enzimáticas en la pared del intestino o del hígado del huésped humano. En vez de asociarlas empíricamente a la frecuencia de las recaídas, las dosis de primaquina a emplear en el tratamiento llamado de "cura radical", sólo pueden determinarse si se consideran la farmacoquinecia y farmacodinamia de la droga y sus efectos sobre los esporozoitos, los merontes pre y exo eritrocíticos, hipnozoitos y gametocitos. Existe un trabajo extraordinario sobre la identificación de metabolitos de la primaquina, pero no ha sido posible demostrar las substancias responsables del efecto parasiticida ni la estabilidad de las mismas.

No se ha dado suficiente atención a los modelos animales alternativos adecuados para el tamizaje de drogas. Los sistemas en *Rhesus* y *Chimpanzee* no son adecuados en virtud de la disponibilidad limitada y los costos elevados de la operación. Como no es factible el desarrollo de formas exo-eritrocíticas ni de hipnozoitos *in vitro* la demostración de los efectos de agentes quimioterápicos contra estos estadios, es hasta ahora imposible. Deben evaluarse críticamente los modelos

en aves, roedores y primates no humanos con el propósito de identificar similitudes y diferencias con la respuesta de los seres humanos a la infección malárica.

Desde los años 60, las poblaciones de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina se han dispersado a todas las áreas maláricas del mundo. Se han intentado tratamientos alternativos con las siguientes sustancias o combinaciones: asociación de quinina + pirimetamina + sulfadoxina; quinina + tetraciclina; mefloquina; artemisinina; artesunato; artemeter; halofantrina; pironaridina y otras. Existe una literatura muy extensa sobre las indicaciones, dosificación, toxicidad y efectividad. Debe evitarse la combinación de primaquina con quinina, mefloquina, antifúngicos y sulfonamidas. Excepcionalmente, se recomienda la administración de dosis única gametocitocida de 0,75 mg/kg de primaquina-base, después de haber tratado apropiadamente el ataque agudo de una infección producida por *P. falciparum* y solamente, cuando sea factible realizar un seguimiento clínico y parasitológico del paciente. Antes de la administración de la primaquina debe determinarse el nivel de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. Un método práctico colorimétrico de campo podría ser de gran utilidad antes de tomar la decisión de administrar primaquina. No recomendamos el uso de primaquina y tratar tanto el ataque primario como las recaídas de *P. vivax* cuando ocurran con dosis única de 10 mg/kg de cloroquina-base p.o.<sup>42,43</sup> (López Antuñano, 1999).

### **Desarrollo de vacunas antimaláricas**

Desde la década de los 70 se observó que el problema de las infecciones maláricas estaba empeorando en los países del mundo en desarrollo en donde los métodos convencionales de control y tratamiento se estaban tornando inefectivos. No obstante, con los adelantos y uso de los instrumentos de la nueva biología, anticuerpos monoclonales y clonación de genes, se trajeron las vacunas antimaláricas al albor de la realidad. El entusiasmo para el urgente desarrollo de agentes inmunizantes contra la malaria no ha permitido reflexionar suficientemente sobre los posibles orígenes de los plasmódios. Los estudios de las proteínas de los genes de parásitos de la malaria relacionados desde el punto de vista de su evolución, junto con otras características biológicas e inmunológicas, podrían ayudar a entender mejor la evolución de la relación huésped parásito y dar elementos para identificar los determinantes que faciliten el desarrollo de vacunas contra la malaria. Creemos importante señalar la necesidad de no perder de vista la complejidad de variables que habrá que tener presente en el proceso de desarrollo de una vacuna contra estos protozoarios. Algunos investigadores no toman en cuenta que aún no se genera el conocimiento sobre aspectos básicos de la biología, los orígenes y el polimorfismo de las especies de *Plasmodia* que parasitan a

los seres humanos, ni sobre la complejidad de la respuesta inmune de éstos.

Hasta ahora, se han descrito las estrategias generales para el desarrollo de vacunas contra la malaria. El reto continúa siendo: ¿cómo se pretende activar los mecanismos de protección con el objeto de identificar formulaciones de agentes inmunizantes que sean seguros y eficaces y cómo inducir la mayor protección inmune contra la malaria humana? La inmunización satisfactoria de voluntarios expuestos a esporozoitos irradiados *Plasmodium falciparum* o *P. vivax* estimuló el desarrollo de agentes inmunizantes para prevenir la infección desde que se inicia en el huésped humano. Como no se dispone de esporozoitos purificados y atenuados por irradiación, la alternativa es desarrollar vacunas con subunidades del primer antígeno pre-eritrocítico identificado: la proteína circumesporozoítica (CSP). Este antígeno está presente en todas las especies de plasmódia, mostrando una estructura similar con una región central de repeticiones y dos regiones conservadas, esenciales para su desarrollo. La CSP se ha expresado en varias líneas celulares, microorganismos y recientemente, en el correspondiente ADN. Se han identificado epítopes específicos de la CSP en linfocitos T y B, reconocidos por los sistemas inmunes de roedores y primates, inclusive seres humanos, y se han usado para desarrollar vacunas con péptidos sintéticos. Para inmunización en seres humanos, se han usado antígenos con múltiples péptidos y polioximas. Se realizan avances sobre la inmunidad mediada por linfocitos T, inclusive la protección lograda con vectores bacterianos, levaduras y virus que expresan epítopes CSP-específicos de linfocitos T citotóxicos CD8+ T y el efecto de refuerzo de la vacuna recombinante con virus vacuna (vaccinia). Aún se cuestiona a qué grado contribuyen los linfocitos T CD8+, y/u otros linfocitos T específicos para esporozoitos y/o epítopes de merontes hepáticos, a la inmunidad protectora pre-eritrocítica. Se ha avanzado en el conocimiento de la respuesta humorar a inmunógenos para evitar la invasión de merozoitos eritrocíticos con la consecuente prevención de la morbilidad y mortalidad, y se han identificado anticuerpos capaces de bloquear la trasmisión que evitan el desarrollo esporogónico del plasmódio en el anofelino vector. Sin embargo, aún no se dispone de productos inmunizantes certificados que puedan incorporarse a los programas de inmunización colectiva.<sup>28,44,45</sup>

### **Referencias**

1. Cruz SJ Jr. Molecular parasitology: progress towards the development of vaccines for malaria, filariasis, and schistosomiasis. *Experientia*; 1991 Feb 15; 47(2); 146-51.
2. Koella JC, Hatz C, Mshinda H, de Savigny D, Macpherson CN, Deggremont AA, Tanner M. *In vitro* resistance patterns of *Plasmodium falciparum* to chloroquine-a reflection of strain-specific immunity? *Trans-R-Soc-Trop-Med-Hyg*; 1990 Sep-Oct ; 84(5); 662-5.
3. Sidhu PS, Ng SC. Recognition of pernicious syndromes in malaria infections. *Ann Acad Med Singapore* 1991 May; 20(3): 324-7.

4. Luxemburger C, Nosten F, Kyle DE, Kiricharoen L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Clinical features cannot predict a diagnosis of malaria or differentiate the infecting species in children living in an area of low transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998 Jan-Feb; 92(1): 45-9.
5. Thomson S, Lohmann RC, Crawford L, Dubash R, Richardson H. External quality assessment in the examination of blood films for malarial parasites within Ontario, Canada. *Arch Pathol Lab Med* 2000 Jan; 124(1): 57-60 MDS.
6. Touze JE, Chaudet H, Bourgeade A, Faugere B, Hovette P, Aubry P, Pene P. [Current clinical aspects and role of parasitic density in the manifestations of falciparum malaria]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1989 Jan; 82(1): 110-7 [Artículo en Francés].
7. Hoffmann JJ, Penning JM. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin Lab Haematol* 1999 Aug; 21(4): 257-260.
8. Dement'eva II. [Laboratory of rapid diagnosis]. *Klin Lab Diagn* 1998 Oct; (10): 25-33 [Artículo en Ruso]
9. Kawai T. [Activity of ISO/TC212, clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems]. *Rinsho Byori* 1998 Oct; 46(10): 961-7 [Artículo en Japonés].
10. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994 Aug; 47(8): 740-2
11. Braendli B. [Clinical aspects and diagnosis of malaria]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1991 Jan; 80(4): 57-61 [Artículo en Alemán].
12. López Antuñano FJ. Diagnosis of malaria in the blood. In *Diagnosis of Malaria*, edited by F. J. López-Antuñano and G. Schmunis, PAHO Scientific Publication No. 512, 1990, vii, 139 pages.
13. Avila SL, Ferreira AW. Malaria diagnosis: a review. *Braz J Med Biol Res* 1996 Apr; 29(4): 431-43.
14. Makler MT, Gibbins B. Laboratory diagnosis of malaria. *Clin Lab Med* 1991 Dec; 11(4): 941-56 Fe de erratas publicada en *Clin Lab Med* 1992 Jun; 12(2): viii.
15. Singh N, Valecha N, Sharma VP. Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997 Jul-Aug; 91(4): 396-7.
16. Rawlins SC, Chaillet P, Validum L, Ragoonanansingh RN, Mangru S, Prabhakar P, Baboolal S, Gayle C. Evaluation of methods for the laboratory diagnosis of malaria in Guyana. *West Indian Med J* 1993 Sep; 42(3): 111-4.
17. Collier JA, Longmore JM. The reliability of the microscopic diagnosis of malaria in the field and in the laboratory. *Ann Trop Med Parasitol* 1983 Apr; 77(2): 113-7.
18. Hanscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol* 1999 Aug; 21(4): 235-245.
19. Kong HH, Chung DI. Comparison of acridine orange and giemsa stains for malaria diagnosis. *Korean J Parasitol* 1995 Dec; 33(4): 391-4.
20. Gay F, Traore B, Zanoni J, Danis M, Fribourg-Blanc A. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996 Sep-Oct; 90(5): 516-8.
21. Hemvani N, Chitnis DS, Dixit DS, Asolkar MV. Acridine orange stained blood wet mounts for fluorescent detection of malaria. *Indian J Pathol Microbiol* 1999 Apr; 42(2): 125-8.
22. Rickman LS, Long GW, Oberst R, Cabanban A, Sangalang R, Smith JI, Chulay JD, Hoffman SL. Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Lancet* 1989 Jan 14; 1(8629): 68-71.
23. Baird JK, Purnomo, Jones TR. Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Jan-Feb; 86(1): 3-5.
24. Kumar BK, al Fadhel M, Sehgal SC. Efficacy and limitations of QBC acridine orange staining as a routine diagnostic technique for malaria in developing countries. *J Trop Med Hyg* 1993 Aug; 96(4): 245-8.
25. Quintana M, Piper R, Boling HL, Makler M, Sherman C, Gill E, Fernandez E, Martin S. Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 1998 Dec; 59(6): 868-71.
26. WHO. A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of falciparum malaria. WHO Informal Consultation on Recent Advances in Diagnostic Techniques and Vaccines for Malaria. *Bull World Health Organ* 1996; 74(1): 47-54.
27. Cooke AH, Chiodini PL, Doherty T, Moody AH, Ries J, Pinder M. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMAL) with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. *Diagnosis of malaria by acridine orange fluorescent Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996 Jan-Feb; 91(1): 83-6.
28. López Antuñano FJ & Schmunis GA. *Plasmodia of Humans Chapter 4. Parasitic Protozoa*, Vol 5 1993 Academic Press Inc Pages 192-204.
29. Chiodini PL, Moody AH, Hunt-Cooke. A Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy. *Lancet* 1991 Mar 9; 337(8741): 624-5 Comment on: *Lancet* 1991 Jan 26; 337(8735): 200-2.
30. Wang M, Deng QJ, Liu RZ, Tao P, Lu CA, Deng ZN. Diagnosis of tertian malaria by enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81(6): 888-90.
31. Voller A, Bidwell DE, Chiodini PL. Evaluation of a malaria antigen ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Mar-Apr; 88(2): 188.
32. Ong CS, Zhang KY, Eida SJ, Graves PM, Dow C, Looker M, Rogers NC, Chiodini PL, Targett GA. The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite-Immunol*; 1990 Sep; 12(5); P 447-56.
33. Cooke AH, Moody AH, Lemon K, Chiodini PL, Horton J. Use of the fluorochrome benzothiocarboxypurine in malaria diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Jul-Aug; 86(4): 378.
34. Cooke AH, Morris-Jones S, Horton J, Greenwood BM, Moody AH, Chiodini PL. Evaluation of benzothiocarboxypurine for malaria diagnosis in an endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993 Sep-Oct; 87(5): 549.
35. Gillespie SH, Dow C, Raynes JG, Behrens RH, Chiodini PL, McAdam KP. Measurement of acute phase proteins for assessing severity of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Pathol* 1991 Mar; 44(3): 228-31.
36. Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP. PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997 May-Jun; 91(3): 361-3.
37. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 Nov-Dec; 86(6): 609-12.
38. Ellis CJ, Chiodini PL. The treatment of falciparum malaria. *J Antimicrob Chemother* 1984 Apr; 13(4): 311-4.
39. Chiodini PL, Somerville M, Salam I, Tubbs HR, Wood MJ, Ellis CJ. Exchange transfusion in severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79(6): 865-6.
40. Chiodini PL, Hall AP. Controlled trial of exchange transfusion in falciparum malaria. *Lancet* 1990 Mar 3; 335(8688): 554 Comentario en: *Lancet* 1990 Feb 10; 335(8685): 324-5.
41. Wilkinson RJ, Brown JL, Pasvol G, Chiodini PL, Davidson RN. Severe falciparum malaria: predicting the effect of exchange transfusion. *QJM* 1994 Sep; 87(9): 553-7.
42. López Antuñano FJ. Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug? *Salud Pública de México* 1999; 41(5) 410-419.
43. WHO Practical Chemotherapy of Malaria, Report of WHO Scientific Group, Technical Report Series, No. 805, 1990, 158 pages.
44. WHO Malaria Vaccine Development, Pre-erythrocytic Stages, Proceedings of a Conference Held in Bethesda, Maryland, USA, edited by S. L. Hoffmann and L. J. Martinez, Bulletin of the World Health Organization, Supplement to Volume 68, 1990, 196 pages.
45. López Antuñano FJ Vacunas antimálaricas: estrategias de investigación. Artículo de revisión en evaluación. Octubre, 2000.