

Malaria: fundamentos y alcances del control Características en Colombia

Carlos A. Agudelo^{1,2}, Augusto Corredor², María Clara Echeverry²,
Hernando Salcedo² y Berhmans Murraín².

Aspectos biológicos e inmunitarios

1. Características del genoma

Se estima que el tamaño del genoma de varias especies de *Plasmodium* es de aproximadamente $2-4 \times 10^7$ pares de bases. Cerca de 10% del genoma de las formas sexuales de *P. falciparum* está constituido por secuencias repetitivas (1). La composición de bases del genoma de *Plasmodium* varía según la especie. En *P. falciparum* el 17-19% de las bases del genoma son guanina y citosina (2). Por diferentes métodos se ha estimado que *P. falciparum* tiene 14 cromosomas cuyo tamaño se encuentra entre 600 kb y 3.500 kb (3-7). Sin embargo, el tamaño de los cromosomas puede presentar polimorfismo.

El parásito es haploide en los estadios de esporozoíto, macrogameto y trofozoíto en forma de anillo (8, 9). La síntesis de DNA tiene lugar en los trofozoítos en desarrollo y en los esquizontes. El genoma haploide entero se replica en un tiempo promedio de 3.2 minutos, lo que supone una duplicación de 50 pares de bases por segundo y un mínimo de 1.300 sitios de origen de la replicación.

La síntesis de RNA en *P. falciparum* es activa durante la 48 horas del ciclo de crecimiento intraeritrocítico, in vitro. En cultivos asincrónicos de este parásito se ha encontrado que 80 % del total de RNA es rRNA, aproximadamente el 15 % es tRNA y 5 % mRNA.

2. Antígenos

En los últimos años se ha logrado identificar una amplia variedad de proteínas que provocan respuesta inmune celular y humoral (10-23). Una parte de estas proteínas se han clonado y se han secuenciado, lo cual permite comprender mejor su estructura y sus expresiones funcionales (24-31). En algunos casos se ha logrado también identificar los respectivos epítopes (32-49).

Las proteínas que muestran antigenicidad son específicos de cada especie y de las fases que conforman el ciclo biológico (50-61). Sin embargo, hay excepciones.

De esta variedad de antígenos destacamos una lista parcial.

Antígenos	Localización	Epítopes
PfCSP	Proteína del circunsporozoíto de <i>P. falciparum</i>	NANP Th2R Th3R R32tet32 T3
LSA-1	Específicos de la fase hepática	EQQSDLEQERL AKEKLQ
LSA-2 Ag332 PfEMP-1 PfHRP-2	Superficie del eritrocito infectado con formas asexuales maduras. PfEMP-1 media la adherencia a células endoteliales	
Pf155 ó RESA	Superficie del eritrocito infectado con merozoítos en anillo de <i>P. falciparum</i>	EENV EENVEHDA EENVEHDA- EENVEENV DDEHVVEEPNA
MSA-1 MSA-2	Superficie del merozoíto de <i>P. falciparum</i> (33)	
EBA175	Micronemas que median unión del eritrocito al merozoíto de <i>P. falciparum</i> .	
AMA-1	Roptrio	

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

² Instituto de Salud en el Trópico, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Anlígenos	Localización	Epítopes
AMA-2		
RAP-1	Roptria	
RAP-2		
SERA	Serina repetida de <i>P. falciparum</i> . Soluble tras ruptura de eritrocito	
Ag2	Soluble tras la ruptura del eritrocito	
Ag7		
PfHRP-2		
PvCSP	Proteína del circunsporozoítode <i>P. vivax</i>	DRADGQPAG
Pv200	Superficie del merozoito de <i>P. vivax</i>	
Pis25	Superficie del cigoto y del ooquinto de <i>P. falciparum</i> (36)	
Pfs48/45	Gametocito del <i>P. falciparum</i>	
40/10		
16,27		
230		
Gam230	Gametos	Múltiple
Gam		
48/45		
42/37		
20,24		

Códigos de los aminoácidos de una sola letra: N, Asn;A, Ala;P, Pro;E, Glu;V, Val;H, His;D, Asp;T, Thr;R, Arg;G, Gly;Q, Gln;S, Ser;C, Cys;M, Met;F, Phe;W, Trp;Y, Tyr;I, Ile;L, Leu.

Cabe mencionar que se ha cuestionado el papel del Pf155/RESA como antígeno de superficie que facilita la invasión del merozoíto y se sugiere que su papel consiste en modificar la membrana del eritrocito (56).

La mayoría de los antígenos estudiados contienen secuencias que se repiten varias veces, una tras otra, de oligopéptidos correspondientes a los epítopes dominantes, al lado de las cuales se encuentran regiones que no se repiten (20). Así, por ejemplo, la proteína del circunsporozoíto (CSP), similar en todas las especies de *Plasmodium* tiene $10^6 - 10^7$ moléculas y la región inmunodominante ubicada en el centro, consiste en una secuencia de cuatro aminoácidos (Asn-Ala-Asn-Pro), también conocida como NANP, que se repite cerca de cuarenta veces y se encuentra rodeada de regiones no repetitivas. Precediendo al extremo 5' de la región repetida se encuentra una región conservada de cinco aminoácidos (KLKQP) que se denomina región I. En la región carbono terminal se encuentran dos pares de cisteína conservados junto con una secuencia también conservada que se denomina región II (27).

La CSP está asociada a la motilidad del esporozoíto. La CSP juega un papel como ligando en la

interacción esporozoíto-hepatocito. La región II de la proteína tiene un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos con porciones de la molécula de adhesión celular, la trombospondina, y con otras proteínas de unión, que actúan como receptores celulares de sulfato en el hígado.

Sin embargo, un número apreciable de antígenos y los genes que los codifican no tienen secuencias repetidas.

En las secuencias repetidas presentan una alta frecuencia los residuos N, A, D, V, P, E, G, Q, S y raramente los residuos C, M, F, W, Y, Y, L. Se considera que algunas regiones repetitivas son inmunodominantes en tanto la respuesta inmunológica se dirige en gran parte contra ellas y porque los anticuerpos generados pueden inhibir la invasión del parásito o proteger contra la infección.

Se ha sostenido que las unidades repetidas actúan como ligandos con respecto a las proteínas del huésped que sirven para suprimir el desarrollo de la inmunidad por medio de la reacción serológica cruzada. Estas consideraciones han sido objetadas. Como se indica adelante, la respuesta inmunológica natural parece dirigirse principalmente a las regiones no repetitivas. También se ha sugerido que los dominios repetitivos de los antígenos no desencadenan una inmunidad protectora sino un mecanismo de evasión inmune por su habilidad para inducir una activación de las células B, independiente del timo.

En consecuencia, en la actualidad se acepta que tanto las secuencias repetidas como las no repetidas juegan un papel en la infección y en la respuesta inmune, pero es aún poco claro en qué grado la respuesta inmune a cualquiera de estos antígenos contribuye a la protección adquirida de manera natural.

Aunque, en general, se considera que los antígenos son específicos de cada fase del parásito, se ha encontrado que los esquizontes hepáticos tardíos comparten algunos determinantes antigénicos con los esporozoítos y con las formas hemáticas sexuales (61). En esto se involucran por lo menos 2 epítopes de la CSP y 13 epítopes de 7 proteínas de la forma hemática sexual. Sin embargo, las respectivas

proteínas conservan sus diferentes características estructurales y funcionales (61-64).

3. Polimorfismo y variación

Los avances en la caracterización de los antígenos y de los genes que los codifican, han ratificado la importancia y extensión que tienen los fenómenos de polimorfismo, diversidad y variación, tanto genética como antigénica de las poblaciones naturales del parásito (65-69). La variación, diversidad y polimorfismo se han encontrado no sólo entre las fases del parásito, sino además entre cepas, aislamientos de la misma especie y en el estadio sanguíneo de la infección natural. El polimorfismo puede expresarse en la coexistencia de diferentes formas alélicas del mismo antígeno. La diversidad puede expresarse de varias maneras, como mutaciones puntuales en el estadio sanguíneo, o como desiguales entrecruzamientos y recombinaciones que ocurren dentro del mosquito. Todo esto indica que el parásito posee una gran plasticidad genética.

Las diferencias en el tamaño de los cromosomas probablemente sean resultado de eventos de recombinación que pueden llevar a traslocaciones, deleciones, expansiones y contracciones del material genético (7, 70 -75)

Aparentemente, estas características afectan a todas las fases de una manera diferente, pues las proteínas, antígenos y genes varían o son polimórficos en distinto grado. Tanto antígenos como genes tienen regiones que pueden presentar un alto grado de conservación entre especies o entre aislamientos de una especie (por ejemplo, de diferentes sitios geográficos) y tienen regiones variables, organizadas como secuencias repetidas o no repetidas (76-83). Esto incluye a la CSP, la mayoría de antígenos de las formas sanguíneas y de los que se ubican en la superficie del eritrocito. Algunos antígenos tienen poca variabilidad, como el Pf155/RESA. De tal manera que el grado de conservación de regiones o partes de los antígenos del parásito no se opone a los fenómenos de polimorfismo y variación, los cuales operan como instrumentos funcionales globales del parásito (84-89).

Gran parte de la estructura de los antígenos que varían y de las bases moleculares de estos fenómenos, son aún desconocidos.

Estos fenómenos, sin embargo, tienen una gran importancia, ya que son base de otros, como la supervivencia del parásito, su capacidad de evasión inmunológica, su resistencia a las drogas y la gran especificidad de la respuesta inmune en términos de especie, de cepas y aún de aislamientos (90, 91).

Uno de los fenómenos que estimulan la variación genética y antigénica, y acrecientan la adaptabilidad del parásito, es la llamada «presión inmune»), ocasionada por la respuesta natural del huésped, así como por los medicamentos o las vacunas.

4. Respuesta inmune

La inmunidad contra la malaria ocasionada por *P. falciparum* se desarrolla como resultado de la exposición por largo tiempo al parásito y depende de la memoria inmunológica. La clave en la regulación de la respuesta son las células T, cuando éstas reconocen los antígenos relevantes. Son muchos los mecanismos potencialmente efectoros y la importancia relativa de cada uno de ellos es desconocida. La protección parece estar mediada por diversos mecanismos de acuerdo con el grado de exposición y el patrón de transmisión (92-122).

De otra parte, el desarrollo de las formas exoeritrocíticas puede ser inhibido por el interferón α y otras linfocinas como la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral (FNT) y la interleucina 1 (IL-1).

La inmunidad protectora en la malaria natural es generalmente baja, pero altamente específica. Esto parece deberse al polimorfismo, la diversidad antigénica y a otros procesos. Sólo una parte de la población humana es capaz de reconocer los antígenos del parásito.

La principal debilidad parece radicar en la regulación de la respuesta inmune, aún si ésta es completa e incluye la activación celular, la memoria inmunológica y los mecanismos efectoros independientes de los anticuerpos. Este tipo de respuesta puede operar parcialmente contra los esporozoítos y las formas sanguíneas. Las formas hepáticas del parásito desencadenan una respuesta inmune citotóxica específica, genéticamente restrin-

gida y mediada por los linfocitos CD8⁺, que se asemeja a una respuesta viral o tumoral (113).

La inmunidad protectora no esterilizante, que atenúa los síntomas clínicos (inmunidad contra la enfermedad) y actúa sobre el parásito, se adquiere tras el reconocimiento prolongado del repertorio antigénico del parásito y se incrementa con la edad de las personas expuestas de manera natural. Pero, al abandonar una zona endémica, la inmunidad se pierde en poco tiempo. Debe remarcar que estudios bien diseñados y conducidos sugieren que la inmunidad estéril y la protección clínica nunca se alcanzan de manera completa, ni siquiera en humanos expuestos continuamente, desde el nacimiento a una intensa transmisión (201).

Desde los años 20 se ha reconocido la inmunidad protectora no esterilizante, pero, a pesar de décadas de investigación, el conocimiento sobre cómo el parasitismo se transforma en enfermedad es incompleto y no se posee un esquema claro sobre los mecanismos de la inmunidad adquirida de manera natural. Sin embargo, algunos aspectos han sido identificados, por medio de estudios realizados en zonas donde la transmisión de la malaria se restringe a la estación de lluvias y en zonas de malaria es hiperendémica y perenne.

La respuesta inmunológica a los exoantígenos del parásito se expresa en una disminución temporal de la actividad linfoproliferativa (celular) y de la producción de IgG cuando la densidad parasitaria o parasitemia es alta (123-125); incluso decrece el número de linfocitos que se encuentran en la circulación periférica lo que puede ser resultado del secuestro de células T dirigidas contra antígenos específicos, en diversos sitios. Al mismo tiempo, se eleva la IgM, lo que sugiere una respuesta independiente de las células T. En varios estudios se ha demostrado el efecto supresivo de una alta parasitemia (126-131).

De otra parte, cuando la parasitemia presenta un bajo nivel o no se encuentra, se observa una respuesta elevada de IgG, en especial IgG1 e IgG3, contra los exoantígenos, lo que sugiere un papel protector de estos isotipos (125).

En niños de Gambia se han identificado dos tendencias en la respuesta de anticuerpos con respecto a la edad. En la primera, en los niños más

jóvenes, la IgM y la IgG2 presentan un pico inicial y luego decrecen; en la segunda, se manifiesta un incremento gradual en los niveles de IgG1, IgG3 e IgG4.

En el modelo murino los exoantígenos estimulan la producción de anticuerpos, de manera predominante la IgM independiente de las células T, los cuales tienen especificidad por los fosfolípidos y el fosfatidilinositol (132). Esto es esencial para inducir la producción del FNT por los macrófagos (133), lo que, junto con los antígenos MSA-1 y RAP-1 que se encuentran en la mezcla de exoantígenos, contribuye al secuestro de los eritrocitos.

La inmunidad contra la enfermedad debe depender de la infección que induce una repetida estimulación de la IgM, independiente de las células T, de manera específica contra el componente de los exoantígenos que estimulan la producción del FNT. Los síntomas clínicos se reducen por la supresión de la producción del FNT por parte de los macrófagos.

El progresivo desarrollo de la inmunidad antiparasitaria en los niños mayores se reflejaría en el salto de la respuesta de IgG contra exoantígenos específicos. La inmunidad inhibiría la invasión y multiplicación del parásito y conduciría a la destrucción del mismo. Además, se produciría la reducción global de los exoantígenos circulantes liberados en la esquizogonia (125).

Sin embargo, en la infección natural por *P. falciparum* no se han encontrado aún suficientes evidencias que relacionen la inmunidad con la producción de anticuerpos específicos. Por lo general, la producción de anticuerpos es baja y la protección incompleta. Así mismo, no está claro en qué grado la respuesta inmune contra los antígenos que han sido descritos contribuye a la protección adquirida de manera natural.

Una abundante pero incompleta evidencia indica que la respuesta inmunológica en la malaria está regulada genéticamente. Por lo menos una parte de ella opera a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y otra parte por fuera de éste. En este último caso se sugiere que la respuesta es independiente de las células T y opera directamente a nivel de las células B a través, por ejemplo, de los genes de las inmunoglobulinas.

El reconocimiento de los dominios de la CSP de *P. falciparum* en sujetos inmunizados con esporozoítos irradiados se centra en la NANP, mientras que en sujetos infectados de manera natural en una región endémica se dirige de manera significativa contra las regiones no repetitivas de la proteína. Es decir, la respuesta inmunológica natural puede ser muy diferente a la inducida por este tipo de vacunas.

5. Evasión inmunológica

De manera general se han postulado los siguientes mecanismos principales de evasión inmunológica del parásito (134-137):

- polimorfismo, diversidad, variación genética y antigénica;
- restricción del complejo mayor de histocompatibilidad;
- interferencia en el funcionamiento del sistema inmunológico;
- inmunosupresión;
- tolerancia inmunológica;
- memoria inmunológica pobre; y
- equilibrio inmunológico huésped-parásito

El control de la malaria

1. De la erradicación al control

Desde la década de los 50 a la fecha, el enfoque sobre la malaria pasó de la erradicación al control. Este último se ha desarrollado y se ha enriquecido en estrategias y métodos, y numerosas experiencias muestran sus alcances y limitaciones.

En la segunda mitad de este siglo, la malaria ha desaparecido en numerosos países como consecuencia del desarrollo social y económico. Si estos países se suman a aquéllos que no han tenido malaria, representan una población de 1.292 millones. En otras áreas, las campañas de erradicación y control han tenido éxito, de tal manera que la malaria endémica y el riesgo de infección aparentemente se han eliminado. Esto cubre a cerca de 800 millones de habitantes. En un tercer grupo de áreas, la infección malárica se ha logrado mantener a bajos niveles, pero se presentan frecuentes incrementos del problema. La mayoría de países maláricos de América y de Asia

se incluyen en este grupo, con una población de 2.118 millones.

Por último, se encuentran las áreas en las que la situación malárica permanece sin cambios y los programas de control son muy débiles o no existen. Los países africanos, situados al sur del Sahara, se ubican en este grupo, con una población de 365 millones.

2. Instrumentos y métodos de control

El control de la malaria puede ser realizado a nivel individual, familiar y comunitario.

A continuación presentamos sucintamente los principales métodos de control hasta hoy utilizados. La percepción del alcance que éstos tienen, resume más de 30 años de experiencias en las diferentes regiones del mundo (138-142).

En forma general, las medidas de prevención y control de la malaria, pueden ser agrupadas de la siguiente manera:

1. Medidas diseñadas para prevenir que el mosquito pique al hombre.
2. Medidas diseñadas para prevenir o reducir los criaderos de mosquitos por la eliminación de las colecciones de agua o por el manejo del medio ambiente (saneamiento ambiental).
3. Medidas diseñadas para destruir las larvas de los mosquitos o los mosquitos adultos.
4. Medidas diseñadas para eliminar los parásitos de la malaria en el huésped humano.

Entre las principales medidas para evitar que el mosquito pique al hombre se encuentra el uso de toldillos, impregnados con insecticidas o sin éstos. Un reciente y amplio estudio realizado en Gambia mostró que los toldillos impregnados de insecticidas tienen una eficacia protectora cercana al 40% y pueden reducir la mortalidad infantil (143). Se utilizan también ropas protectoras, repelentes, aneo para las casacas, y la ubicación de estas últimas en sitios estratégicos.

Además, estas medidas pueden complementar los efectos parciales de la quimioterapia, reduciendo la dependencia con respecto a los medicamentos antimaláricos actualmente disponibles, lo cual es clave en las áreas selváticas y de alta exfoliación.

Aunque los métodos son simples, baratos y predictivamente útiles, tienen efectos limitados en la reducción de la prevalencia.

La reducción de los criaderos de mosquitos por el manejo del medio ambiente (saneamiento ambiental) involucra muchos métodos como los drenajes, rellenos, cambios en los niveles de agua, nivelaciones de terreno, cambios de la salinidad del agua, desecación por árboles, irrigaciones intermitentes, embalses, zoonofilaxis y control biológico. Estas medidas son más útiles en las áreas de la costa y en la malaria urbana, y donde se realizan grandes proyectos agroindustriales. En zonas rurales y deprimidas, la aplicación de estas medidas presenta numerosas dificultades y obstáculos que reducen notablemente su efecto.

El control químico consiste en rociado intradomiciliario con insecticidas residuales (principalmente DDT) y fumigación aérea o nebulizaciones locales de ultrabajo volumen (imagocidas). Antes del DDT se utilizaron el aceite mineral, el petróleo y el verde de París. Hoy los insecticidas se clasifican en hidrocarburos clorinados, compuestos organofosforados, carbamatos, piretrinas y piretroides.

Dentro de estos métodos, el más relevante ha sido el uso del DDT aunque demostró su utilidad sólo en las primeros ciclos de las campañas de erradicación, interrumpiendo la transmisión en lugares donde las condiciones socioeconómicas y la vigilancia eran óptimas. Hoy podemos afirmar que en zonas de transmisión persistente (zonas económicamente deprimidas) los métodos químicos son sólo un coadyuvante dentro del control de la transmisión y plantean, además el problema de la resistencia de los anofelinos a los insecticidas cuando se usan por largos períodos.

Los medicamentos antimaláricos apuntan a eliminar los parásitos del hospedero humano. Son muy útiles en la quimioprofilaxis, en la malaria de las áreas selváticas y periselváticas, márgenes de tierras altas y desérticas y en la malaria urbana. Junto con el diagnóstico oportuno son un método que disminuye el impacto de la enfermedad y reduce la mortalidad, pero no interrumpe la transmisión. Su uso indiscriminado ha traído como consecuencia la resistencia de los parásitos a los medicamentos (144-146).

Todos los métodos anteriormente descritos deben hacer parte de programas de control que incluyen el análisis de la situación epidemiológica y la vigilancia de la misma, una vez que se emprende el respectivo programa. Así mismo, una amplia experiencia muestra que los programas de control tienen mayor probabilidad de éxito cuando se organizan contando con una amplia base de participación comunitaria y educación en salud.

El cambio en la situación de malaria puede expresarse de manera diversa, entre dos extremos. En uno de ellos, la prevalencia de la infección persiste alta o se reduce poco, a pesar de grandes cambios naturales o de intervenciones del hombre sobre los factores que afectan la transmisión (por ejemplo, la densidad del vector). En el otro extremo, pequeños cambios naturales o pequeñas intervenciones del hombre en los factores de la transmisión producen variaciones amplias en la prevalencia de la infección. La estabilidad de la malaria aumenta con los niveles de endemidad.

Como se indica adelante, la complejidad de los factores que determinan la malaria, impone a los programas de control un apreciable grado de amplitud e integralidad. Es recomendable articular una diversidad de métodos de acuerdo con las condiciones ambientales, sociales y culturales de las localidades. Cuando se seleccionan los métodos de control para utilizar en un programa, es necesario tener en cuenta, por lo menos, los parámetros de cantidad, calidad, intensidad y continuidad. Las medidas dispersas o desarticuladas reducen la eficacia que tiene cada uno de los métodos y facilitan la aparición de la resistencia del vector y del parásito. Las medidas de control pueden ser útiles y lograr resultados positivos si se utilizan reconociendo sus indicaciones, alcances, precauciones y limitaciones.

3. Vacunas

Los métodos de control señalados atrás han sido larga y extensamente probados, y se conoce su alcance. Las vacunas se consideran un método de control potencial que ha despertado un creciente interés por las posibilidades que les son inherentes.

El desarrollo de las vacunas ha sido un proceso lento pues requiere una abundante acumulación de evidencias independientes para llegar a resultados

aceptables. Los principales desarrollos se han logrado con respecto a *P. falciparum* al que se refieren los comentarios que siguen.

Formas preeritrocíticas

Las vacunas de este tipo, si son efectivas, impedirían el desarrollo de las formas sexual y asexual del parásito y las manifestaciones clínicas de la enfermedad e interrumpirían la transmisión natural de la enfermedad. Sin embargo, un sujeto inmunizado con este tipo de vacunas permanecería susceptible a las formas asexuales del parásito y sus posteriores desarrollos, si las recibe por transfusión.

La racionalidad de estas vacunas se basa en que la mayoría de los anticuerpos que neutralizan los esporozoítos parecen dirigirse contra los epítopes de la región repetitiva de la CSP que estimulan las células B. Gran parte de estas vacunas tienen como blanco la CSP y, en especial, el epítipo NANP. Se han utilizado vacunas de tipo recombinante, como la R32tet₃₂, expresada en *Escherichia coli* (147) y moléculas sintéticas ligadas al toxoide tetánico, como la (NANP)₃-TT (148).

En los estudios se ha encontrado que estos candidatos a vacunas generan una buena respuesta de anticuerpos, pero una protección baja. Más de 15 péptidos sintéticos y proteínas purificadas producidas por medio del ADN recombinante, se han ensayado como vacunas contra las proteínas de superficie del esporozoíto. Estos productos han mostrado un variado nivel de inmunogenicidad y algunos de ellos han alcanzado de 15 a 25% de protección en los estudios experimentales (149). Parece ser que aunque la secuencia NANP es un epítipo que activa las células T, las proteínas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad la presentan de una manera deficiente.

Los esfuerzos posteriores se han orientado a incorporar epítipes que mejoren la respuesta de las células T y B (150). También se han utilizado diseños que apuntan a resolver los problemas de restricción genética en la respuesta a la CSP ocasionados por el uso de proteínas bacterianas como portadoras de péptidos. Se han incorporado en las vacunas regiones no repetidas de la CSP y se han utilizado péptidos sintéticos basados en las regiones repetidas y no repetidas (151-157). Así mismo, se han dedicado esfuerzos a mejorar la respuesta

inmune humoral a los epítipes repetidos, por medio de adyuvantes, en combinación con potentes inmunomoduladores (151, 158). Además, se han utilizado toxinas bacterianas y proteínas de membrana externa del meningococo, como moléculas portadoras de la NANP o de proteínas recombinantes. La prueba de la vacuna R32Tox A (compuesta por la proteína recombinante R32LR conjugada a la toxina Adetoxicada de *Pseudomonas aeruginosa* produjo una adecuada respuesta de anticuerpos, pero una protección pobre (159). Otras vacunas semejantes, como la recombinante basada en la NANP, fusionada al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (R₆HBsAg-HBsAG), se encuentran en diferentes fases de prueba (160).

Se ha ensayado también una vacuna contra la proteína 2 de la superficie del esporozoíto (SSP2) de *Plasmodium yoelii*, mezclada con la proteína del circunsporozoíto (161-162). Se inmunizaron 18 monos que fueron completamente protegidos al recibir el respectivo agente infectante.

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre la fase hepática del parásito y una parte importante de los mecanismos inmunológicos comienzan a ser claros. Se encuentra en estudio un candidato a vacuna, diseñado para inducir anticuerpos protectores y respuesta de células T contra las proteínas del parásito expresadas en los hepatocitos y realizada por medios recombinantes con base en la CSP, SSP2, LSA-1 y cuatro antígenos de las formas sanguíneas (149).

Formas asexuales sanguíneas

Este tipo de vacunas podría restringir la replicación de las formas asexuales sanguíneas sin evitar la parasitemia. Podrían reducir la enfermedad y la muerte por malaria, pero el sujeto vacunado permanecería susceptible a los esporozoítos y el parásito podría desarrollarse en el hígado. Las formas sexuales del parásito también podrían desarrollarse e infectar los mosquitos. Por tanto, este tipo de vacunas usadas solas no logran interrumpir la transmisión de la malaria en las áreas endémicas.

Algunos productos candidatos a vacuna se han dirigido contra los antígenos MSA1 y RESA (163).

Numerosos estudios se han realizado y hasta el presente se han obtenido resultados similares, tanto

con antígenos purificados como con los productos recombinantes y sintéticos, con pocas excepciones: producción de anticuerpos específicos, pero una limitada o incompleta protección.

Se ha medido la respuesta de anticuerpos a la glicoproteína precursora del antígeno de superficie del merozoíto, así como a la proteína glicoforina de unión, GBP-130, recombinante (164). Esta última no mostró utilidad.

Se ha probado una vacuna recombinante contra la proteína SERA de *Plasmodium falciparum* (antígeno deserrina repetida), la cual no impidió la parasitemia en los monos, pero la redujo de nivel.

Otro candidato a vacuna es un polímero (SPf66) que consiste de tres péptidos sintéticos correspondientes a proteínas del merozoíto de *P. falciparum*, unidas por la NANP (165-166). Uno de estos péptidos es similar a la MSA-1 y los otros dos no han sido caracterizados (2).

Ensayos de campo mostraron un grado de protección diverso (167). En 1993, los autores reportaron una eficacia protectora de 33,6% contra *P. falciparum*. En los niños menores de 5 años, la eficacia fue de 77,2%, pero, en los grupos de mayor riesgo (5 a 44 años) la eficacia protectora osciló alrededor del 20% (168). Estudios realizados en Venezuela y Ecuador, con diferentes diseños, se estimó una eficacia protectora entre 55 y 66% (169-170). La variabilidad e imprecisión entre los resultados de varios estudios de fase III se puede explicar en parte por problemas de diseño y conducción de los estudios, entre los cuales pueden ser destacados: ausencia de precisión en la línea de base de la incidencia anterior a los ensayos, áreas de estudio con baja incidencia, gran variabilidad entre la incidencia esperada y la observada, baja adherencia de los participantes a las tres dosis, tamaño de la muestra insuficiente, evaluación de la respuesta inmune no uniforme, ausencia de un plan de análisis preciso, control de automedicación insuficiente, asignación al tratamiento irregular y sistema de codificación vacuna/placebo inadecuado (171).

De otra parte, dos estudios independientes no encontraron diferencias entre monos vacunados y controles (172, 173). En otro estudio con humanos, se encontró que la respuesta de anticuerpos y de

células T no se correlacionaron con la eliminación de la parasitemia y que la SPf66 genera una pobre respuesta de células B, una respuesta contra ella misma pero débil contra el parásito (174).

Otros estudios independientes han mostrado que la SPf66 es inmunogénica y su eficacia protectora puede situarse alrededor del 31% en niños de 1 a 5 años en zonas de alta transmisión de malaria (175-177). Así mismo, se encontró que este producto no reduce la infección por *P. falciparum*, no induce una efectiva inmunidad contra los esporozoítos, ni reduce la parasitemia, sino que puede reducir los episodios clínicos de malaria, aparentemente porque genera anticuerpos que pueden reconocer algunos epítopes nativos de los merozoítos de *P. falciparum*. Sin embargo, este estudio ha sido criticado debido a que el método de detección pasiva de casos utilizado identifica un número pequeño de casos clínicos con respecto a lo esperado en una zona de alta transmisión, e introduce un factor de acceso en el grupo vacunado en el cual deben producirse más casos leves y moderados que no acuden al centro diagnóstico. Este aspecto podría sobrevalorar la eficacia protectora (178). Estos resultados llevaron a la OMS a plantear que «...no se justifica en este estado una amplia utilización de la vacuna...» (179).

Hasta la fecha presente, ninguno de los estudios ha descrito la relación entre la protección y la respuesta inmune celular y humoral, ni la duración de la protección. Otros estudios evaluativos se encuentran en curso (180, 181).

Formas sexuales

Las vacunas contra las formas sexuales pueden interrumpir la transmisión al impedir la fertilización de los gametos dentro del intestino del mosquito, o inactivar los cigotos o los ooquistos. Por consiguiente, no protegerían contra los esporozoítos, las formas hepáticas, las formas hemáticas asexuales, ni impedirían la manifestación de la enfermedad.

Los estudios se han dirigido contra las proteínas de superficie de los cigotos y los ooquistos, en especial la Pfs25, Pfs230 y Pfs48/45. El gen que codifica la Pfs25 se ha clonado y secuenciado y el antígeno se ha expresado por medios recombinantes. Se han realizado pruebas con animales y una prueba

clínica (182-183) que dió lugar a la producción de una segunda generación de este candidato a vacuna (184).

Con respecto a *P. vivax*, el estudio y desarrollo de vacunas se encuentra en un estado incipiente (185-187).

En consecuencia, no se cuenta aún con una vacuna efectiva contra la malaria. Sin embargo, el campo de diseño, producción y ensayo de vacunas contra la malaria se encuentra en expansión. La propia OMS ha anunciado que seis a ocho nuevos candidatos a vacuna contra *P. falciparum* serán objeto de ensayos clínicos en los próximos dos a cuatro años (179).

Ubicación de las vacunas como herramientas de control

Se estima que la utilización de vacunas para los estadíos sanguíneos asexuales en individuos residentes en las áreas endémicas no serían útiles para desencadenar una inmunidad que impida la infección de los eritrocitos, sino para evitar que se ponga en peligro la vida mientras se desarrolla la inmunidad natural por medio de infecciones repetidas. Se esperaría que la vacunación de aquellos individuos que no tienen inmunidad natural y se exponen transitoriamente, prevenga completamente la infección de formas asexuales (188-198). De otra parte, numerosos analistas opinan que en el futuro las mejores vacunas serían útiles como herramientas a utilizar con un conjunto de medidas de diversa naturaleza, del tipo de la fumigación, los medicamentos, la educación, la participación comunitaria y el desarrollo económico social.

Son numerosos los argumentos que limitan el papel de las vacunas en la malaria. A continuación se intenta agrupar los más importantes desde el punto de vista de su contenido.

1. Como problema de salud pública, la malaria es ocasionada por diversas especies de *Plasmodium*, cada una con ciclos de vida compuesto por varias fases. En consecuencia, el blanco es heterogéneo y la perspectiva de una vacuna múltiple es de gran complejidad.

2. El parásito presenta una gran capacidad de variación, polimorfismo y diversidad, tanto genética como antigénica. Esto explica parcialmente la diversidad de la respuesta inmune y el alto porcentaje de no respondedores en zonas endémicas a todos los antígenos que hasta hoy se han utilizado como vacunas. Sin embargo, esto no se considera un problema del todo insuperable.

3. Los antígenos de la malaria contienen un número limitado de epítopes dirigidos contra las células T inmunodominantes y, por ello, las vacunas basadas en inmunógenos de péptidos sintéticos cortos no son inmunogénicos en una proporción sustancial de la población objetivo.

4. En malaria, la respuesta inmune es débil y de largo plazo. El parásito cuenta con un menú de mecanismos para evadir la respuesta inmunológica, tanto la natural como la inducida por inmunización. La utilización de vacunas que generan una respuesta inmunológica débil o insuficiente puede conducir a situaciones epidemiológicas adversas. Es previsible que, por un proceso senescente al de «presión inmunológica», se estimule la variación del parásito y se acreciente su adaptabilidad, al tiempo que una parte de la población queda expuesta a los parásitos más virulentos.

5. Cuando a la respuesta inmunológica descrita se suma la exposición crónica a la infección, una parte significativa de la población se hace no respondedora, característica que se considera adquirida. Al parecer los complejos antígeno-anticuerpo inhiben o modifican el procesamiento y la presentación de los antígenos, de tal manera que regiones de la molécula normalmente inmunogénicas no son reconocidas por las células T.

6. La respuesta a un determinado epítipo puede también presentar variación. Esto se atribuye a las restricciones y polimorfismo del HLA clase II, los cuales, a su vez, implican una seria limitación a las vacunas de subunidades.

7. La utilización de vacunas como estrategia de control de la malaria aún tiene numerosos vacíos por esclarecer. Los estudios que permiten establecer la eficacia protectora, aún los de tipo aleatorio, doble ciego y con placebo, presentan problemas importantes de diseño y de conducción, relacionados con la caracterización de la línea de base, la muestra a utilizar, la detección de los casos clínicos y otros problemas, que mantienen la enorme distancia existente entre los resultados obtenidos en un estudio controlado y los que podrían obtenerse en un programa real de vacunación en términos de cobertura, continuidad, etc. (199-201). Los productos actuales no alcanzan a cumplir de manera adecuada la combinación de requisitos que se utilizan para implantar estrategias de vacunación, o sea: seguridad, eficacia, estabilidad, facilidad de administración y costo beneficio. Los productos actuales aún no sustituyen ventajosamente las otras estrategias y no hay evidencias siquiera de que puedan agregar mejoras sustanciales a otros esquemas, en términos de costo beneficio.

Un punto crucial es la baja eficacia protectora hasta ahora obtenida (181). Baste recordar que las vacunas contra el cólera han mostrado una eficacia protectora mucho más alta y aún así no son todavía atractivas como aspecto central de la estrategia de control.

Otro gran problema tiene que ver con las dificultades de tipo administrativo, organizacional y operacional para llegar a la población objetivo de manera oportuna y con la cobertura indispensable. Probablemente la mejor vacuna del mundo es la que se utiliza contra la fiebre amarilla, pero, en los países tropicales esta enfermedad continúa afectando a grandes núcleos de población, debido a este tipo de problemas.

Por último, la vacuna contra la malaria es poco atractiva para los laboratorios que producen medicamentos, en términos del margen de ganancia y por los problemas legales que tiene su aplicación en los países tropicales. Esto agrega

dificultades de inversión, equipamiento y experiencia.

4. Los determinantes de la malaria y su control

La malaria es un problema de salud pública que está determinado de manera compleja por varios grupos de factores. Cambios en estos últimos, en las condiciones que los gobiernan o en las relaciones que tienen establecidas, pueden dar lugar a que se modifique la frecuencia de la malaria, la intensidad de transmisión, sus formas de manifestación, su morfología epidemiológica y su perfil clínico (139, 202-204).

Además de las características del parásito y los vectores, los factores que regulan la malaria en su forma epidémica y endémica pueden ser agrupados de la manera siguiente:

1. Factores naturales y ambientales: climáticos, geográficos, ecológicos, agrológicos, etc.
2. La organización económica y social, en especial las formas y procesos de urbanización y los modelos de industrialización.
3. La situación social, económica y cultural de la población.
4. Los sistemas productivos (agrícolas, ganaderos, mineros, etc.) y sus caminos o formas de desarrollo.
5. Los patrones poblacionales y las tendencias demográficas. Especial importancia tienen las dinámicas migratorias internas y sus formas de colonización o de ampliación de la frontera agrícola.
6. El grado y los tipos de la participación comunitaria y social.
7. El papel y el alcance de los servicios de salud.
8. Los factores de riesgo próximos, que operan en los ambientes locales, municipales y productivos.

Como se ha dicho, la relación de estos factores es compleja y la interacción entre ellos se da a diferentes niveles. De este panorama se colige que el control de la malaria

debe operar tanto a nivel de los determinantes próximos, en los microambientes locales, como sobre los factores que condicionan a nivel más general. De otra parte, se requiere que las medidas de control estén articuladas en alto grado y posean la intensidad y la continuidad suficiente para que sus acciones se potencien y se eviten efectos adversos.

Aunque es ampliamente aceptado que para comprender la situación y la dinámica de la malaria es necesario considerar los factores sociales, ambientales, demográficos, laborales, etc., es frecuente que los programas de control se diseñen sin tener en cuenta estos aspectos específicos.

Los éxitos transitorios, la escasa utilidad o el fracaso de muchos programas de control se deben en gran parte a su carácter aislado o desarticulado con respecto a los factores que regulan la situación malárica.

Esto mismo puede llevar a que la intensidad de la transmisión supere el nivel de la fase previa al programa de control, o puede generar en breve tiempo resistencia del parásito o del vector.

En su larga evolución, la malaria ha llegado a articularse, en condiciones de equilibrio inestable, con los elementos que componen los sistemas sociales y naturales y cambia con ellos, en la medida en que estos últimos son sistemas dinámicos en constante transformación.

El estudio de los factores específicos que en numerosos países convergen o determinan la malaria en localidades o áreas definidas, ha permitido identificar modelos o prototipos maláricos. A manera de ejemplo, cabe citar, de un lado, los modelos asociados con condiciones ecológicas específicas, y de otro lado, con algunos sistemas sociales y productivos, o con dinámicas de grupos poblacionales.

En el primer grupo cabe citar los prototipos maláricos de sabanas, planicies y valles; áreas selváticas y marginales; límites de tierra alta; límites de desierto; costas y zonas urbanas.

En el segundo grupo destacan las zonas de colonización de áreas selváticas, la minería de oro y de piedras preciosas, las zonas con población agrícola migrante o con desplazamiento de poblaciones.

Para cada uno de estos modelos se han generado programas de control en los cuales las medidas de intervención se articulan de una manera diferente y particular.

Es necesario insistir que estos modelos y prototipos, y sus correspondientes programas de control, deben interpretarse ante todo como guías útiles para orientar los programas de control. Pero, no son el programa de control aplicable en todo el planeta o siquiera en todo un país. Muchas de las características que definen estos modelos pueden ser compartidos por localidades o regiones similares en diferentes países, pero cada realidad tiene su especificidad en la manera como articula los factores determinantes y la dinámica particular en que se expresa la malaria. Se requiere examinar de manera concreta las características de cada región para que un programa de control sea apropiado. En otros términos, un programa de control puede tener éxito cuando se diseña a partir de modelos «propios», en el sentido que su diseño se basa en la comprensión realista y profunda de las condiciones particulares e incorpora la experiencia internacional.

De allí la gran importancia que tiene la caracterización de las situaciones maláricas concretas, por medio de estudios de línea de base, y la definición de los métodos e instrumentos para evaluar el impacto de las medidas de control.

Prioridades de investigación según la OMS

La Oficina de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud (TDR) ha establecido un sistema de prioridades de investigación en malaria (139). Propone estudios de campo y de laboratorio en:

1. farmacoterapia;
 2. control de vectores;
 3. vacunas, y
 4. epidemiología
1. En cuanto a la terapia farmacológica el TDR ha puesto el énfasis en trabajos expe-

rimentales, en los siguientes campos:

- Compuestos que revierten la resistencia del parásito a la cloroquina.
- Prueba de resistencia de los parásitos a diferentes fármacos (cloroquina, mefloquina y amodiaquina, entre otras).
- Ensayos clínicos con terapia combinada en caso de cepas reportadas como resistentes.
- Ensayos de compuestos hasta el momento inexplorados en occidente, como son los derivados de la artemisina.

De acuerdo con ello plantea como líneas a profundizar:

- Exploración de compuestos calcioantagonistas como revertidores de resistencia.
 - Ensayos clínicos con compuestos derivados de la artemisina en casos de malaria cerebral.
 - Ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales, antifactor de necrosis tumoral en casos de malaria cerebral.
2. El control del vector continúa siendo línea prioritaria para la OMS, por medio de:
- Uso de toldillos impregnados con piretroides.
 - Experimentación en ingeniería genética con el insecto vector.
- Además, el TDR recomienda corroborar los resultados obtenidos en Gambia con los toldillos impregnados.
3. La OMS recomienda continuar con los ensayos de los diferentes tipos de vacunas candidatas que actúan en los estadios preeritrocíticos, los estadios asexuales sanguíneos y los estadios sexuales.
4. En cuanto a la investigación epidemiológica, la OMS recomienda concentrar los esfuerzos en los siguientes aspectos:
- Perfil epidemiológico de la malaria severa, complicada y fatal.
 - Caracterización de factores de riesgo de la malaria severa, complicada y fatal.

- Investigación en epidemiología clínica, tratamiento y cuidados de pacientes con aquellos cuadros.
- Estudios de correlación de las características del huésped y el polimorfismo del parásito, asociado a los cuadros clínico mencionados.

La malaria en Colombia

1. Antecedentes

En el año de 1951 se estimó que había anualmente en el país 700.000 casos y un promedio de 4.000 defunciones; las pérdidas para la economía se valoraron entonces en \$58 millones por año.

Durante 1956-57 se llevó a cabo una investigación que permitió identificar por primera vez la situación de la malaria en el país. Se encontró que los territorios maláricos tenían una extensión aproximada de 1,026.433 km², en los cuales se encontraban 28.700 localidades situadas a una altura de 0 a 1.600 mts y con una población de 9,304.397 habitantes. El territorio considerado como malárico era el 90,2 % del total del país y la población sometida al riesgo de malaria, equivalía al 60% de toda la población.

En 1962, el 84% de la positividad estaba localizada en las siguientes regiones: municipio de Buenaventura, valle medio del río Magdalena, región de Urabá y río de Oro, hoyas del alto San Jorge, alto Sinú, Catatumbo, Sardinata y río Ariari.

En estas regiones se caracterizaron las siguientes condiciones que favorecían la transmisión:

- Selvas húmedas o superhúmedas, con temperaturas superiores a los 25° C°, humedad relativa superior al 70% y precipitación pluvial superior a 2.000 mm (zonas climáticas de malaria ecuatorial).
- Vivienda poco o nada protectora, sin paredes o con paredes incompletas.
- Pobre situación socioeconómica, con vías de comunicación escasas y rudimentarias; industria agropecuaria familiar y pesquera en formación; deforestación y colonización espontánea, con constantes movimientos migratorios.

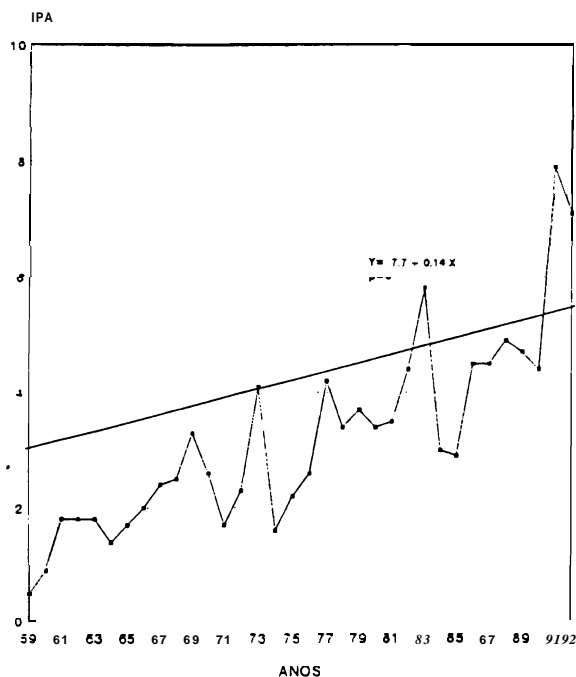
- Cobertura incompleta de rociamientos debido a dificultades operacionales de diverso orden.
- Presencia de especies vectoras cuya bionomía es poco favorable a los métodos de control aplicados, como el *A. nuñeztovari* y el *A. (k)neivai*.
- Comportamiento anormal de infecciones por *P. falciparum*, a las dosis usuales de la cloroquina.
- Una fauna de anofelinos variada y abundante, tanto de vectores primarios como secundarios.

2. Situación actual

Prevalencia

La prevalencia, medida por el índice parasitario anual (IPA), ha presentado una tendencia creciente como se indica en la figura 1. Aunque el índice parasitario por *P. falciparum* predominó sobre el

Figura 1. Índices de prevalencia de malaria Colombia 1959 - 1992



POBLACION DE AREA MALARICA
IPA INDICE PARASITARIO ANUAL

índice por *P. vivax* de los años de 1959 a 1974, de allí en adelante estadísticamente se invierte, pasando al primer lugar *P. vivax*.

Durante 1992, los 10 departamentos con mayor índice parasitario anual fueron: Guaviare, 187,1; Chocó, 55,4; Vaupés, 51,4; Nariño, 44; Putumayo, 40,4; Caquetá, 35; Vichada, 30; Arauca, 21,1; Meta, 17,6 y Córdoba, 17,2. En el mismo año, estos 10 departamentos produjeron el 41% de todos los casos de malaria de la región malarica del país.

Las zonas de alto riesgo, en las cuales persiste la malaria, son:

- Bajo Cauca, con 14 municipios, 797.911 habitantes y 70.895 casos de los cuales 25.556 fueron por *P. falciparum*.
- Pacífico, con 23 municipios, 772.190 habitantes, 37.805 casos y 26.646 casos por *P. falciparum*.
- Amazonia, con 51 municipios, 713.680 habitantes, 36.895 casos y 8.918 casos por *P. falciparum*.
- Urabá, con 13 municipios, 387.857 habitantes, 19.669 casos y 6.759 casos por *P. falciparum*.

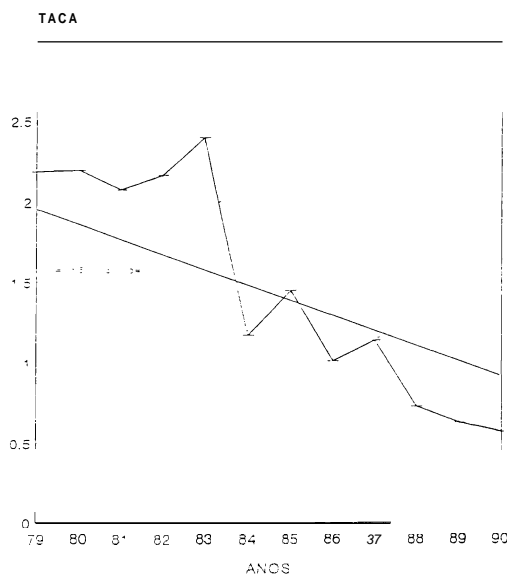
Mortalidad

La tendencia de la mortalidad por malaria es decreciente como lo indica la figura 2.

Posibles factores explicativos

Estas tendencias indican que la malaria-infección se ha extendido, mientras que la malaria-enfermedad, en especial las formas más severas, tienden a disminuir. Es probable que este fenómeno sea resultado de la confluencia de, por lo menos, dos tipos de procesos. De un lado, en muchas zonas persisten las condiciones de desarrollo económico y social inadecuadas y los factores que favorecen de manera directa la transmisión, como la expansión de la frontera agrícola, las tendencias migratorias, la colonización y los sistemas productivos de tipo extractivo. De otro lado, se han extendido las medidas de control que permiten diagnosticar y tratar de manera más oportuna los casos, reduciendo la mortalidad. Puede haber contribuido en esta situación el incremento de la

Figura 2. Mortalidad por malaria, 1979-1990



Tasa por 1 000

población que presenta inmunidad adquirida de manera natural, tras una larga experiencia de exposición al parásito.

3. Especies anofelinas y su distribución

En el país hay más de 40 especies de anofelinos de las cuales 10 se han incriminado como transmisoras. Varias de ellas pueden coexistir en una misma localidad malárica. En orden de importancia estas especies son: *An. darlingi*, *An. albimanus*, *An. nuñez-tovari*, *An. punctimaculata*, *An. lepidotus* y *An. alopha*. Algunas especies vectoras tienen una biología poco favorable a los métodos de control aplicados, como *A. nuñez-tovari* y *A. (k) neivai*.

De manera general, la distribución de los vectores es la siguiente: *An. albimanus* predomina en los litorales; *An. darlingi* en la Orinoquia, Amazonas y en los trechos medios de los ríos Cauca y Magdalena; *An. nuñez-tovari* en Norte de Santander, Aruca y Casanare, en la frontera con Venezuela. Sin embargo, debe recordarse que existen numerosas zonas en las que los vectores comparten el territorio.

La resistencia fisiológica a los insecticidas organoclorados (DDT) se ha presentado en áreas reducidas; *An. albimanus* en el municipio de Acandí (Chocó), *An. darlingi* en la parte media del río

Atrato, *An. alopha* en el piedemonte oriental y *An. nuñez-tovari* en Tibú (N. Santander) y Pore (Casanare).

4. Especies de *Plasmodium*

Hoy, en Colombia, es menor la prevalencia de *P. falciparum* (de 30 a 40%), pero de mayor virulencia. Esta especie es la causante del impacto a nivel hospitalario y de las defunciones por malaria. Es importante anotar que en algunas regiones de la costa pacífica produce hasta un 20% de malaria infección. Algunas cepas han demostrado resistencia a las drogas antimaláricas, especialmente a la cloroquina.

P. vivax se presenta con mayor prevalencia (de 54% a 69%) y cronicidad pero de menor virulencia.

P. malariae se presenta sólo en la costa pacífica con una prevalencia de menos del 1%.

5. Programa de control de la malaria

El Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SEM) fue creado en 1956, como una dependencia del Ministerio de Salud. En el primer plan de erradicación se programaron 8 ciclos semestrales de aplicación de DDT a las viviendas de las áreas maláricas y, terminado el séptimo ciclo en 1962, se encontró que las localidades positivas se habían reducido en un 59,9% en relación con las cifras de 1959.

En las zonas definidas como de bajo riesgo, la campaña de erradicación ha contribuido a interrumpir la transmisión de la malaria, en medio de las condiciones favorables creadas por complejas tendencias históricas. Entre estas tendencias cabe mencionar el desarrollo social, el cambio de los sistemas productivos de pequeña propiedad campesina en fincas de producción para el mercado, la adecuación y tecnificación de tierras, la estabilización de la población y la deforestación, entre otras. Todos estos factores permitieron erradicar la malaria en estas zonas. Sólo persiste un anofelismo sin malaria.

Sin embargo, en la actualidad, después de 34 años de campaña antimalárica, basada principalmente en el rociado intradomiciliario de DDT y en el reparto masivo de medicamento a los pacientes febriles, la

transmisión persiste en algún grado en 363 municipios. Como ya se ha mencionado, se manifiesta una tendencia al descenso de la mortalidad y al incremento de la prevalencia, la cual se concentra en las áreas donde persisten las condiciones favorables al parásito y al vector (205, 206).

Algunos estudios realizados en el Valle del Cauca y Antioquia permiten entender la importancia que tienen los factores determinantes de la malaria en las políticas de control. Desafortunadamente, estos estudios se han limitado al ámbito académico y no han sido tenidos en cuenta por los programas de control.

Las actividades de control realizadas actualmente por la división de Campañas Directas, por medio de programaciones zonales apoyadas por el nivel central, son:

- Rociamientos intradomiciliarios con DDT y fenitrotión donde se ha detectado resistencia.
- Aplicaciones espaciales ULV.
- Atención a los sintomáticos febriles, por medio de 6.500 puestos de información.
- Diagnóstico, por medio de 440 microscopios utilizados por voluntarios o funcionarios de salud.

Sólo a manera de pequeñas investigaciones aisladas se han ensayado otros métodos de control, como la capacitación de las comunidades y de los funcionarios de salud, la exploración de factores de riesgo y de técnicas administrativas gerenciales a nivel departamental y municipal. En la actualidad se estudian las modalidades para adecuar el programa de control de la malaria al proceso de descentralización y municipalización de los servicios de salud.

Además de la falta de continuidad y escasez de los recursos oficiales, es necesario destacar la ausencia de caracterización de las diferentes modalidades maláricas, la debilidad de las herramientas epidemiológicas para la investigación, la vigilancia y el control, así como el bajo grado de participación de la sociedad civil.

Panorama de prioridades de investigación en Colombia

Desde un punto de vista general, la investigación en malaria se concentra en cinco campos principales: farmacoterapia, vectores, diagnóstico, biología molecular/vacunas y epidemiología.

En cada uno de estos campos de investigación se encuentran aspectos de gran importancia. Las opciones de un país en particular se determinan al seleccionar aquellos aspectos que le permitan generar conocimientos en el campo de la ciencia y la tecnología, y manejar el problema concreto. Esto supone una relación estrecha entre ambos aspectos, sobre la base de un conocimiento preciso de la situación, de las tendencias maláricas, y del costo-efecto de las diferentes alternativas disponibles. Son siempre necesarias las investigaciones básicas y las orientadas a mejorar los programas de control, definidas unas y otras de acuerdo con la naturaleza y la situación del problema.

En Colombia, el aspecto más débil es, quizás, el conocimiento de la situación y de las tendencias de la malaria. El país cuenta con un servicio y un programa de control que ha contribuido a mantener el problema dentro de unos límites laxos, que periódicamente se ve desbordado por los brotes epidémicos y por las nuevas modalidades de malaria en las zonas de colonización, de cultivos de la hoja de coca, de intensa migración poblacional y en las zonas urbanas. Sin embargo, no se ha logrado caracterizar de manera adecuada la situación y las tendencias de la malaria, y se carece del conocimiento suficiente para implantar un efectivo sistema de vigilancia epidemiológica y de información. Colombia tiene varios de los denominados «modelos»: malaria de selva, de frontera, de extracción de metales y piedras preciosas, de colonización, de cultivos prohibidos, de costa, urbanos, etc., pero éstos no han sido caracterizados de manera suficiente desde el punto de vista de la prevalencia y la mortalidad, de los vectores, ni en cuanto a los factores de índole geográficos, poblacionales, sociales, culturales, etc. Así mismo, no se ha logrado establecer la combinación adecuada de medidas que permitiría controlar el problema en cada una de estas áreas específicas. Es por esto que los programas de control se implantan de manera desarticulada y luego no es posible evaluar su resultado, o son aplicados

de una zona a otra sin atender a las diferencias que existen entre ellas. La ausencia de estos conocimientos ha tenido ya un costo social y humano demasiado alto.

Quizás en este sentido debe entenderse el significado del paradigma epidemiológico al que convoca la OPS, aparentemente restringido en su forma: "la rápida categorización del problema de malaria de un país, en un pequeño número de escenarios discretos, descrito en un grupo de variables y determinantes básicos, que sirve como una guía para ajustar herramientas apropiadas a situaciones específicas".

De primera importancia son en nuestro país los estudios de línea de base, de los factores de riesgo de la malaria y sus formas complicadas, de los perfiles de la resistencia del mosquito y del parásito y la caracterización de los modelos maláricos.

Referencias

- Hough-Evans BR and Howard J. Genome size and DNA complexity of *Plasmodium falciparum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982;698:56-61.
- Pollack Y, Katzen AL, Spira DT and Golenser J. The genome of *Plasmodium falciparum*. I- DNA base composition. *Nucl. Acids. Res.* 1983;10:539-546.
- Prensier G and Slomianny Ch. The karyotype of *Plasmodium falciparum* determined by ultrastructural serial sectioning and 3D reconstruction. *J. Parasitol.* 1986;17:731-736
- Welless TE, Walliker D, Smith CL, Do Rosario VE, Maloy WL, Howard RJ, Carter R and McCutchan TF. A histidine-rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic cross of *Plasmodium falciparum*. *Cell.* 1987;49:633-642.
- Kemp DJ, Thompson JK, Walliker D and Corcoran LM. Molecular karyotype of *Plasmodium falciparum*: conserved linkage groups and expendable histidine-rich protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84:7672-7676.
- Sheppard M, Thompson JK, Cowman AF and Kemp DJ. Molecular karyotyping of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989;34:45-54.
- Kemp DJ, Corcoran LM, Coppel RL, Stahl HD, Bianco AE, Brown GV and Anders RF. Size variation in chromosomes from independent cultured isolates of *P. falciparum*. *Nature* 1985;315:347-350.
- Janse CJ, Van der Klooster PFJ, Van der Kaay HJ, Van der Ploeg M and Overdulve JP. Rapid repeated DNA replications during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of *Plasmodium berghei*. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med and Higiene.* 1986;80:154-157.
- Janse CJ, Van der Klooster PFJ, Van der Kaay HJ, Van der Ploeg M and Overdulve JP. DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986;20:173-182.
- Peterson MG, Coppel RL, McIntyre P. Variation in the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988; 27: 291-302.
- Newbold CL. Antigens on the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte surface are parasite derived: a reply. *Parasitology Today.* 1990;6(10):320-322.
- Holder AA, Freeman RR. The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *J. Exp. Med.* 1984;156:624.
- Krzych U, White K, Link HT. Role of circumsporozoite protein-specific T-cells in protective immunity against *Plasmodium berghei*. *WHO Bull.* 1990;68(supplement):88-93.
- Del Portillo HA, Gysin J, Mattei DM. *Plasmodium vivax*: cloning and expression of a major blood-stage surface antigen. *Experimental Parasitology.* 1988;67: 346-353.
- Freeman RR, Holder AA. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000-mol.wt. form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Exp. Med.* 1983; 158: 1647.
- Guerin-Marchand C, Druilhe P, Galey B, Londoño A, Patarapotikul J, Beaudoin RL, Dubeaux Ch, Tartar A, Mercereau-Puijalon O, Langsley G. A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature.* 1987; 329:164-167.
- Hedstrom RC, Carnpbell JR, Leef ML, Charoenvit Y. A malaria sporozoite surface antigen distinct from the circumsporozoite protein. *WHO Bull.* 1990;68 (supplement): 152-157.
- Calle JM, Nardin EH, Clavijo P. Recognition of different domains of the *Plasmodium falciparum* CS protein by the sera of naturally infected individuals compared with those of sporozoite-immunized volunteers. *J. Immunol.* 1992; 149(8): 2695-2701.
- Young JF, Hockmeyer WT, Gross M, Ballou WR, Wirtz RA, Trosper JH, Beaudoin RL, Hollingdale MR, Miller LH, Diggs CL, Rosenberg M. Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria vaccine. *Science.* 1985; 228:958-962.
- Anders RF, Coppel RL, Brown GV, Kemp DJ. Antigens with repeated amino acid sequences from the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Prog Allergy.* 1988; 41: 148-172.
- Weiss WR, Houghten RA, Good MF. A CTL epitope on the circumsporozoite protein of *P. yoelii*. *WHO Bull.* 1990; 68(supplement):99-103.

22. Zhu J, Hollingdale MR. Structure of *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991;48: 223-226.
23. Robson KJH, Hall JRS, Jennings MW, Newbold CI, Tate VE, Weatherall DJ. A highly conserved amino acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* 1988;335:79-82.
24. Holder AA, Lockyer MJ, Odink KJ, Sandhu JS, Riveros-Moreno V, Nicholls SC, Hillman Y, Davey LS, Tizard MLV, Schwarz RT, Freeman RR. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature* 1985; 317: 270-273.
25. Barnwell JW. Antigens of *Plasmodium vivax* blood stage parasites identified by monoclonal antibodies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1986; 81(Suppl.II):59-61.
26. Collins WL, Anders RF, Pappaioanou M, Campbell GH, Brown GV, Kemp DJ, Coppel RL, Skinner JC, Andrysiak PM, Favaloro JM, Corcoran LM, Broderick JR, Mitchell GF, Campbell CC. Immunization of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1986; 323: 259-262.
27. Cerami C, Kwakye-Berko F, Nussenzweig V. Binding of malarial CS protein to sulfatides Gal(3-SO4)Cer and cholesterol 3-sulfate: dependency on disulfide bond formation between cysteines in region II. *Mol. Biochem Parasitol* 1992;54:1-12.
28. Collins WE. Testing of *Plasmodium vivax* CS proteins in Saimiri monkeys. *WHO Bull* 1990; 68(supplement):42-46.
29. Hollingdale MR, Aikawa M, Guoxian Chen. Pre-erythrocytic stage malaria parasites: non-circumsporozoite protein antigens. *WHO Bull* 1990; 68(supplement): 178-180.
30. Marchand C, Druilhe P. How to select *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic antigens in an expression library without defined probe. *WHO Bull* 1990;68(supplement): 158-164.
31. Pancake SJ, Holt GD, Mellouk S, Hoffman SL. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol* 1992;117:1351-1357.
32. Sherman IW, Winograd E. Antigens on the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte surface are not parasite derived. *Parasitology Today* 1990; 6(10): 317-320.
33. Thomas AW, Carr DA, Carter JM, Lyon JA. Sequence comparison of allelic forms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA2. *Mol Biochem Parasitol* 1990;43:211-220.
34. Winger L, Suhrbier A, O'Dowd CA, Hoidalva KJ, Sinden RE. A liver-stage specific antigen of *P. berghei* identified by a monoclonal antibody. *WHO Bull* 1990; 68(supplement):172-177.
35. Kaslow DC. Immunogenicity of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens: implications for the design of a transmission blocking vaccine. *Immunol Lett* 1990; 25: 83-86.
36. Barr PJ, Green KM, Gibson HL, Bathurst IC, Quakyi IA, Kaslow DC. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J Exp Med* 1991;174(5):1203-1208.
37. Gibson HL, Tucker JE, Kaslow DC. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50(2):325-333.
38. Holder AA, Freeman RR, Nicholls SC. Immunization against *Plasmodium falciparum* with recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Parasite Immunology* 1988;10:607-617.
39. Nardin EH, Herrington D, Davis J, et al. Conserved repetitive epitope recognized by CD4⁺ clones from a malaria immunized volunteer. *Science* 1989; 246: 1603-1606.
40. Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol* 1992;41(3):321-337.
41. Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, Hui GSN, Yamaga KM, Chang SP, Chan EBT, Kan SC. Merozoite surface coat precursor protein completely protect monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3014-3018.
42. World Health Organization. The biology of malaria parasites. Geneva: 743 WHO Technical Report Series 1987; 7-210.
43. Perlmann H, Berzins K, Patarroyo ME, Carlsson J, Perlmann P, Wahlgren M. Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 1984;159:1686-1704.
44. Jones TR. Low immunogenicity of a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein epitope bound by a protective monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(6): 837-843.
45. Moreno A, Clavijo P, Edelman R, et al. Cytotoxic CD4⁺ T cells from a sporozoite immunized volunteer recognize the *Plasmodium falciparum* CS protein. *Int Immunol* 1991; 3: 997-1003.
46. Riley EM, Olerup O, Troye-Blomberg M. The immune recognition of malaria antigens. *Parasitology Today* 1991; 7(1):5-11.
47. Sim BKL, Orlandi PA, Haynes JD, Klotz FW, Carter JM, Carnus D, Zegans ME, Chulay JD. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite infection. *J Cell Biol* 1990; 111:1877-1884.
48. Weiss WR, Mellouk S, Houghton RA. Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein in malaria-infected hepatocytes. *J Exp Med* 1990;171:763-773.

49. Nardin EH, Nussenzweig RS, Altszuler R. Cellular and humoral immune responses to a recombinant *falciparum* CS protein in sporozoite-immunized rodents and human volunteers. *WHO Bull* 1990;68(supplement):85-87.
50. Romero P, Maryanski JL, Corradin G, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Zavala F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 1989;341:323-326.
51. Aikawa M, Atkinson CT, Beaudoin LM, Sedegah M, Charoenvit Y, Beaudoin RL. Localization of CS and non-CS antigens in the sporogonic stages of *Plasmodium yoelii*. *WHO Bull* 1990;68(supplement):165-171.
52. Brown AE. Characterization of naturally acquired antibodies to the non-repetitive flanking regions of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(4):440-445.
53. Szarfman A, Lyon JA, Walliker D. Mature liver stages of cloned *Plasmodium falciparum* share epitopes with proteins from sporozoites and asexual blood stages. *Parasite Immunol* 1988;10:339-351.
54. Inselburg J, Bzik DJ, Li WB, Green KM, Kansopon J, Hahn BK, Bathurst IC, Barr PJ, Rossan RN. Protective immunity induced in Aotus monkeys by recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 1991;59:1247-1250.
55. Andrasiak PM, Collins WE, Campbell GH. Stage-specific and species-specific antigens of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium novae* defined by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1986;54:609-612.
56. Berzins K. Pfl55/RESA is not a surface antigen of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology Today* 1991;7(8):193-194.
57. Ritu G. Construction of synthetic immunogens: use of T- and B-cell epitopes of CS and RESA proteins of *Plasmodium falciparum*. *Vaccine* 1992;10(11):761-765.
58. Rogers WO. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(19):9176-9180.
59. Schofield L. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitology Today* 1991;7(5):99-105.
60. Scherf A, Kimura E. The major merozoite surface antigen (MSA1) of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* 1990;6(12):391-392.
61. Cerami C, Frevert U, Sinnis P, et al. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptor for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell* 1992;70:1021-1033.
62. Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Enea V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* 1985;230:815-818.
63. Brown AE, Webster HK, Lyon JA, Thomas AW, Permpnich B, Gross M. Characterization of naturally acquired antibody responses to a recombinant fragment from the N-terminus of *Plasmodium* glycoprotein 195. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(5):567-573.
64. Howard RJ, Pasloske BL. Target antigens for asexual malaria vaccine development. *Parasitology Today* 1993;9:369-372.
65. Burkot TR. The population dynamics in mosquitoes and humans of two *Plasmodium vivax* polymorphs distinguished by different circumsporozoite protein repeat regions. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(6):778-786.
66. Enea V, Ellins J, Zavala F, Quakyi I, Nussenzweig RS. DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. *Science* 1984;225:628-629.
67. Kemp DJ, Coppel RL, Anders RF. Repetitive proteins and genes of malaria. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:181-208.
68. Triglia T, Wellems TE, Kemp DJ. Towards a high-resolution map of the *Plasmodium falciparum* genome. *Parasitology Today* 1992;8(7):225-229.
69. Walliker D. Genes, vaccines and variation in malaria. *Parasitology Today* 1986;2(2):43-44.
70. Corcoran LM, Thompson JK, Walliker D and Kemp DJ. homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphism in *P. falciparum* 1988; *Cell* 53:807-813.
71. Langsley G, Patarapotikul J, Handunneti S, Khouri, E, Mendis KN and David PH. *Plasmodium vivax*: karyotype polymorphism of field isolates. *Exp Parasitol* 1988;67:301-306.
72. Pologe LG and Ravetch RV. A chromosomal rearrangement in *P. falciparum* histidine-rich protein gene is associated with the knobless phenotype. *Nature* 1986;322:474-477.
73. Patarapotikul J and Langsley G. Chromosome size polymorphism in *Plasmodium falciparum* can involve deletions of the subtelomeric pPRep20 sequence. *Nucleic Acids Research* 1986;16:4331-4340.
74. Pace T, Ponzi M, Dore E, Janse C, Mons B and Frontali C. Long insertions with telomeres contribute to chromosome size polymorphism in *Plasmodium berghei*. *Mol cell Biol* 1990;10:6759-6764.
75. Ponzi M, Janse CJ, Doze E, Scotti T, Pace T, Reterink FM, Van der Berg FM and Mons B. Generation of chromosome size polymorphism during mitotic multiplication of *P. berghei* involves both loss and addition of subtelomeric repeat sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1990;41:73-82.
76. Kemp DJ. Antigenic diversity and variation in blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Immunol Cell Biol* 1992;70:201-207.
77. Wellems TE. Molecular genetics of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitology Today* 1991;7(5):110-112.
78. Sinigaglia F, Guttinger M, Matile H, Pink JRL. An invariant, "universal" T-cell epitope in the *P. falciparum*

- circumsporozoite protein. *WHO Bull* 1990; 68(supplement): 94-98.
79. Hill AV, Elvin J, Willis AC. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992;360(6403):434-439.
 80. Dye C. Population genetics of nonclonal, nonrandomly mating malaria parasites. *Parasitology Today* 1991;7(9): 236-240.
 81. Forsyth KP, Philip G, Smith T, Kum E, Southwell B, Brown GV. Diversity of antigens expressed on the surface of erythrocytes infected with mature *Plasmodium falciparum* parasites in Papua, New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41(3):259-265.
 82. Abel L, Cot M, Mulder L. Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels in human malaria. *Am J Hum Genet* 1992;50(6):1308-1317.
 83. Walliker D. Malaria parasites: randomly interbreeding or "clonal" populations? *Parasitology Today* 1991;7(9):232-235.
 84. Sim BKL. Sequence conservation of a functional domain of EBA-175 in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;41:293-296.
 85. Wilson RJM, Gardner MJ, Feagin JE, Williamson DH. Have malaria parasites three genomes? *Parasitology Today* 1991;7(6):134-136.
 86. Hill AV. Malaria resistance genes: a natural selection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86(3):225-226.
 87. Shi YP. Diversity in the immunodominant determinants of the circumsporozoite proteins of the *Plasmodium falciparum* parasites from malaria-endemic regions of Papua, New Guinea and Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(6):844-851.
 88. Janse CJ. Chromosome size polymorphism and DNA rearrangements in *Plasmodium*. *Parasitology Today* 1993; 9(1) 19-22.
 89. Englund PT, Sher A. *The Biology of Parasitism*. MBL lectures in biology. Vol. 9. New York, Alan R Liss Inc., 1989.
 90. Marshall VM, Coppel RS, Martin RK, Oduola AMJ, Anders RF, Kemp DJ. A *Plasmodium falciparum* MSA-2 gene apparently generated by intragenic recombination between the two allelic families. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45:349-352.
 91. Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. The phylogeny of malaria: a useful study. *Parasitology Today* 1993; 9(7): 246-250.
 92. Verhave JP, Strickland GT. Delayed-type hypersensitivity and protection in mice following immunization with *Plasmodium berghei* sporozoites. *WHO Bull* 1990; 68(supplement):145-151.
 93. Vanderberg JP, Chew S, Stewart JM. *Plasmodium* sporozoite interactions with macrophages in vitro: a video-microscopic analysis. *J Protozool* 1990;37:528-536.
 94. Stewart MJ, Nawrot R, Shulman S, Vanderberg J. *Plasmodium berghei* sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. *Inf Immun* 1986; 51:859-864.
 95. Weiss WR, Good MF, Hollingdale MR, Miller LH. Genetic restriction of protective immunity to *Plasmodium yoelii* sporozoites. *WHO Bull* 1990;68(supplement):104-108.
 96. Nardin EH, Nussenzweig RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol* 1993;11:687-727.
 97. Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen AS, Demotz Corradin GP, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes; promiscuous binding to human class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 1989; 19:2237-2242.
 98. Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, Sedegah M. T-lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes. *WHO Bull* 1990; 68(supplement):132-137.
 99. Mazier D, Renia L, Nussler A, Pied S, Marussig M, Goma J, Grillo D, Miltgen F, Drapier JC, Corradin G, Guidice GD, Grau GE. Hepatic phase of malaria is the target of cellular mechanisms induced by the previous and the subsequent stages. A crucial role for liver nonparenchymal cell. *Immunol Lett* 1990;25:65-70.
 100. Maheshwari RK. The role of cytokines in malaria infection. *WHO Bull* 1990;68(supplement):138-144.
 101. Mazier D, Goma J, Pied S. Hepatic phase of malaria: a crucial role as "go-between" with other stages. *WHO Bull* 1990;68(supplement):126-131.
 102. Cochrane AH, Uni S, Maracic M, di Giovanni L, Aikawa M, Nussenzweig RS. Presence of a circumsporozoite-like protein in micronemes of blood-stage merozoites of malaria parasites. *Bull WHO* 1990; 68(suppl): 181-183.
 103. Good MF, Maloy WL, Lunde MN, Margalit H, Cornette JL, Smith GL, Moss B, Miller LH, Berzofsky JA. Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 1987;235:1059-1062.
 104. Del Giudice G, Lambert PH, Mendis K, Pessi A, Tanner M. Antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites in areas with stable and unstable malaria. *WHO Bull* 1990;68(supplement):191-194.
 105. Herrero MA, Rosero F, Herrera S, et al. Protection against malaria in Aotus monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a "universal" T-cell epitope: correlation of IFN-gamma serum levels with protection. *Infect Immun* 1992;60:154-158.
 106. Bouharoun-Tayoun H, Attanath Ph, Sabchareon A. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 1990;172:1633-1641.

107. Chougnat C, Lepers JP, Astagneau P, Rason MD, Savel J, Deloron P. Lymphoproliferative responses to synthetic peptides from merozoite ring-infected erythrocyte surface antigen and circumsporozoite protein: a longitudinal study during a falciparum malaria episode. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(5):560-566.
108. Clyde DF. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *WHO Bull* 1990;68(supplement):9-12.
109. Carter R, Schofield L, Mendis KN. HLA effects in malaria: increased parasite-killing immunity or reduced immunopathology?. *Parasitology Today* 1992;8(2):41-42.
110. Sjöberg K, Lepers JP, Rahamarilala L. Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(6):2101-2104.
111. Stürchler D, Zimmer G, Berger R. Interferon-alpha and synthetic peptide malaria sporozoite vaccine in non-immune adults: antibody response after 40 weeks. *WHO Bull* 1990; 68(supplement):38-41.
112. Suhrbier A. Immunity to the liver stage of malaria. *Parasitology Today* 1991;7(7):160-163.
113. Theander TG. Defence mechanisms and immune evasion in the interplay between the human immune system and *Plasmodium falciparum*. *Dan Med Bull* 1992;39(1):49-63.
114. Vanderberg JP, Stewart MJ. Plasmodium sporozoite-host cell interactions during sporozoite invasion. *WHO Bull* 1990;68(supplement):74-79.
115. Malik A, Egan JE, Houghton RA, Sadoff JC, Hoffman SL. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3300-3304.
116. Lussow AR, Del Giudice G, Renia L, et al. Use of a tuberculin purified protein derivative Asn-Ala-Asn-Pro conjugate in bacillus Calmette-Guérin primed mice overcomes H 2 restriction of the antibody response and avoids the need for adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2960-2964.
117. Mellouk S, Berbiguier N, Druilhe P, Sedegah M. Evaluation of an in vitro assay aimed at measuring protective antibodies against sporozoites. *WHO Bull* 1990;68(supplement):52-59.
118. Mendis KN, Naotunne T de S, Karunaweera ND, Del Giudice G, Grau GE, Carter R. Anti-parasite effects of cytokines in malaria. *Immunol Lett* 1990;25:217-220.
119. Good MF, Pombo D, Quakyi IA, et al. Human T cell recognition of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: immunodominant T cell domains map to the polymorphic regions of the molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1199-1203.
120. Greenwood BM. Immune responses to sporozoite antigens and their relationship to naturally acquired immunity to malaria. *WHO Bull* 1990;68(supplement):184-190.
121. Hollingdale MR. Anti-sporozoite antibodies. *WHO Bull* 1990;68(supplement):47-51.
122. Good MF, Kumar S, De Groot AS. Evidence implicating MHC genes in the immunological nonresponsiveness to the *Plasmodium falciparum* CS protein. *WHO Bull* 1990; 68(Supplement):80-84.
123. Riley ER, Jakobsen PH, Allen SJ, Wheeler JG, Bennett S, Jepsen S, Greenwood BM. Immune response to soluble exo-antigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune children. *Eur J Immunol* 1991;21:1019-1025.
124. Boudin C, Chumpitazi B, Dzielg M, Peyron F, Picot S, Hogh B, Arnbroise-Thomas P. Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in hyperendemic area, Burkina Faso. *J Clin Microbiol* 1993; 31:636-641.
125. Luty AJF, Mayonbo J, Lekoulou F, Mshana R. Immunologic responses to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* in Gabonese children exposed to continuous intense infection. *Am J Trop med Hyg* 1994;51(6):720-729.
126. Wahlgren M, Bjorkman A, Perlman H, Berzins K, Perlman P. Anti-*Plasmodium falciparum* antibodies acquired by residents in an area of Liberia during development of clinical immunity. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:22-29.
127. Riley EM, Anderson G, Otoo LN, Jepsen S, Greenwood BM. Cellular immune response to *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children during an acute attack of falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* 1988;73:17-22.
128. Mshana RN, Boulandi J, Mayonbo J, Mendome G. In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of residents of a holoendemic area with perennial malaria transmission. *Parasite Immunol* 1993; 15:35-45.
129. Ho M, Webster HK, Looareesuwan S, Supanaranond W, Phillips RE, Chantbanavich P, Warrell DA. Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 1986;153:763-771.
130. Kremsner PG, Feldmeier H, Zotter G.M., Jansen-Rossek R., Graninger W., Rocha R.M., Bienle U. Immunological alterations between parasitemia and indicators of macrophage activation. *Acta Trop* 1989;46:351-359.
131. Chougnat C, Tallet S, Ringwald P, Deloron P. Kinetics of lymphocyte subsets from peripheral attack. *Clin Exp Immunol* 1992;90:405-408.
132. Bate CAW, Taverne J, Dave A, Playfair JHL. Malaria exoantigens induce T-independent antibody that blocks their ability to induce TNF. *Immunology* 1990;70:315-320.
133. Jakobsen PH, Moon R, Ridley RG, Bote CAW, Taverne J, Hansen MB, Takacs B, Playfair JHL, McBride JS. Tumor necrosis factor and interleukin-6 production induced by components associated with merozoite proteins of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol* 1993;15:229-237.

134. Mendis KN, David PH, Carter R. Antigenic polymorphism in malaria: is it an important mechanism for immune evasion? *Parasitology Today* 1991;7(3): A34-A37.
135. Schofield L. The circumsporozoite protein of *Plasmodium*: a mechanism of immune evasion by the malaria parasite?. *WHO Bull* 1990;68(supplement):66-73.
136. Barker R, Brandling-Bennett, Koech DK, et al. *Plasmodium falciparum*: DNA probe diagnosis of malaria in Kenya. *Experimental Parasitology* 1989;69:226-233.
137. Barker R, Suebsaeng L, Rooney W, Wirth DF. Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human patients: a comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41(3):266-272.
138. Sharma V. Community-based malaria control in India. *Parasitology Today* 1987;3(7):222-226.
139. World Health Organization. Malaria. In: UNDP, WORLD BANK, TDR, eds. Tropical diseases. Progress in research. 1989-1990. Ginebra: 991;29-40.
140. Beier JC. Malaria sporozoites: survival, transmission and disease control. *Parasitology Today* 1993;9(6):210-215.
141. Coluzzi M. Malaria vector analysis and control. *Parasitology Today* 1992;8(4):113-118.
142. Cattani JA. The epidemiology of malaria in a population surrounding Madang, Papua, New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:3-15.
143. Greenwood BM, Baker JR. Large trial of treated bed nets and targeted chemoprophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87(suppl. 2):1-60.
144. Schapira A, Beales FF, Holloran ME. Malaria: living with drug resistance. *Parasitology Today* 1993; 9:168-174.
145. Schuster BG, Milhous WK. Reduced resources applied to antimalarial drug development. *Parasitology Today* 1993; 9(5):167-174.
146. Wernsdorfer WH. The development and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology Today* 1991; 7(11): 297-303.
147. Ballou WR, Hoffnan SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, Gordon DM, Schneider I, Wirtz RA, Young JF, Wasserman GF, Reeve P, Diggs CL, Chulay JD. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* 1987; 8545:1277-1281.
148. Herrington DA, Clyde DF, Davis J. Human studies with synthetic peptide sporozoite vaccine (NANP)₃-TT and immunization with irradiated sporozoites. *WHO Bull* 1990; 68(supplement):33-37.
149. Strickland G T, Hoffman SL. Strategies for the control of malaria. *Scientific American. Science & Medicine* 1994; July-August:24-33.
150. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Development of a sporozoite malaria vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35(4): 678-688.
151. Rickman L, Gordon D, Wistar R, et al. Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoryl lipid A and squalane in malaria circumsporozoite protein vaccine. *Lancet* 1991; 337:998-1001.
152. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Baqar S, Felix AM, Heimer EP, Gillesen D, Nerdin E, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Hollingdale MR, Levine MM. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 1987; 328: 257-259.
153. Herrington DA, Davis J, Nardin E, Beier M. Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am Trop Med Hyg* 1991;45(5): 539-547.
154. Rieckmann KH. Human immunization with attenuated sporozoites. *WHO Bull* 1990;68(supplement):13-16.
155. Satterthwait AC, Lin-Chang Chiang, Arrhenius T. The conformational restriction of synthetic vaccines for malaria. *WHO Bull* 1990;68(supplement):17-25.
156. Sedegah M, Beaudoin RL, Majarian WR. Evaluation of vaccines designed to induce protective cellular immunity against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein: vaccinia, pseudorabies, and salmonella transformed with circumsporozoite gene. *WHO Bull* 1990;68(supplement): 109-114.
157. Herrera S, Herrera MA, Perlaza BL, Burki Y. Immunization of Aotus monkeys with *Plasmodium falciparum* blood-stage recombinant proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4017-4021.
158. Fries L, Gordon D, Richard R, et al. Liposomal malaria vaccine in humans: a novel, safe and potent adjuvant strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:358-362.
159. Fries LF, Gordon DM, Schneider I, Beier JC, Long GW, Gross M, Que JU, Cryz SJ, Sadoff JC. Safety, immunogenicity and efficacy of a *Plasmodium falciparum* vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Infect Immun* 1992;60(5):1834-1839.
160. Vreden SG, Verhave JP, Sauerwein RW, Meuwissen JH. Phase I clinical trial of a recombinant malaria vaccine consisting of the circumsporozoite repeat region of *Plasmodium falciparum* coupled to hepatitis B surface antigen. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(5):533-538.
161. Khusmith S, Charoenvit Y, Kumar S, Sedegah M, Beaudoin RL, Hoffnan SL. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* 1991;252:715-718.
162. Charoenvit Y, Sedegah M, Yuan LF. Active and passive immunization against *Plasmodium yoelii* sporozoites. *WHO Bull* 1990;68(supplement):26-32.
163. Sharma P, Ruebush TK 2d, Campbell GH. Immunogenicity and efficacy trials in Aotus nancymai monkeys with model compounds representing parts of a 75-kd merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46(6):691-707.

164. Aronson NE, Wasserman GF, Vargas G, Hall BT, Esser K. Immunization of owl monkeys with a recombinant protein containing repeated epitopes of *Plasmodium falciparum* glycophorin-binding protein. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(5):548-559.
165. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martínez R, Guzmán F, Cabezas E. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 1987;328: 629-632.
166. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzmán F, Romero P, Tascón R, Franco A, Murillo LA, Potón G, Trujillo G. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 1988; 332:158-161.
167. Amador R, Moreno A, Valero V, Murillo L, Mora AL, Rojas M, Rocha C, Salcedo M, Guzmán f, Espejo F, Nunez F, Patarroyo M. The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine SPf66: safety, immunogenicity and arorectivity. *Vaccine* 1992;10(3):179-184.
168. Valero MV, Amador LR, Galindo C, Figueroa J, Bello MS, Murillo LA, Mora AL, Patarroyo G, Rocha CL, Rojas M, Aponte JJ, Sarmiento LE, Lozada DM, Coronel CG, Ortega NM, Rosas JE, Alonso PL, Patarroyo ME. Vaccination with SPf66, a chemically synthesized vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Jhe Lancet* 1993;341 705-710.
169. Noya O, Gabaldón Y, Noya BA, Borges R, Zerpa N, Urbóez JD, Madonna A, Garrido E, Jimenez MA, Borges RE, García P, Reyes I, Prieto W, Colmenares C, Pabón R, Barraez T, Cáceres LG, Godoy N, Sifontes R. A population-based clinical trial with the SPf66 malaria vaccine in Venezuela. *J Infect Dis* 1994;170:396-402.
170. Sempertegui F, Estrella B, Moscoso F, Piedrahita C, Hernández D, Gaybor J, Naranjo P, Mancero O, Arias S, Bernald R, Espinoza ME, Suarez J, Zicker F. Safety immunogenicity and protective effect of the SPf66 malaria synthetic vaccine against *P. falciparum* infection in a randomized, double blind placebo controlled field trial in an endemic area in Ecuador. *Vaccine* 1994;12:337-342.
171. Organización Panamericana de la Salud. Vacuna antimalárica: del laboratorio al campo. *Boletín Epidemiológico* 1994;15(1):1-8.
172. Ruebush TK, Campbell GH, Moreno A, Patarroyo ME, Collins WE. Immunization of owl monkeys with a combination of *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage synthetic peptide antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 45:355-366.
173. Herrera S, Herrera MA, Corredor A, Rosero F, Clavijo C, Guerrero R. Failure of a synthetic vaccine to protect *Aotus lemurinus* against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47(5):682-690.
174. Millet P, Campbell GH, Sulzer AJ, Grady KK, Pohl J, Aikawa M, Collins W. Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage synthetic peptide vaccine SPf66. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:424-431.
175. Teuscher TA, Armstrong SJRM, Bastos de Azevedo I. SPf66, a chemically synthesized subunit malaria vaccine is safe and immunogenic in Tanzanians exposed to intense malaria transmission. *Vaccine* 1994;12:328-336.
176. Alonso PL, Tanner T, Smith T. A trial of SPf66, a specific malaria vaccine, in Kilombero (Tanzania): rationale and design. *Vaccine* 1994;12:181-186.
177. Alonso PL, Smith T, Armstrong SJRM, Masanja H, Mwakusye S, Urassa H, Bastos de Azevedo I, Chongela J, Kobero S, Menendez C, Hurt N, Thomas MC, Lyimo E, Weiss NA, Hayes R, Kitua AY, Lopez MC, Kilama WL, Teuscher T, Tanner M. Efficacy of the SPf66 vaccine against *P. falciparum* malaria in African children. *The Lancet* 1994;344:1175-1181.
178. Trape JF, Rogier Ch. Efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children. *The Lancet* 1995; 345:134-135.
179. Organisation Mondiale de la Sante. Bureau de l'information. L'efficacite du vaccin antipaludique chez les enfants africains. 28 Octobre 1994.
180. Targett G. SPf66, a candidate synthetic malaria vaccine: immunogenicity versus protection. *Parasitology Today* 1992; 8(11):354-355.
181. Maurice J. Malaria vaccine raises a dilemma. *Science* 1995; 267:320-323.
182. Kaslow DC, Quakyi I, Keister DB. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum* *Mol Biochem Parasitol* 1989; 32:101-104.
183. Kaslow DC, Quakyi IA, Syn C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, McCutchan TF, Miller LH. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 1988;333:74-76.
184. Kaslow DC, Shilooch J. Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Bio/Technology* 1994;12:494-499.
185. David PH, Del Portillo HA, Mendis KN. *Plasmodium vivax* malaria: parasite biology defines potential targets for vaccine development. *Biology of the Cell* 1988;64:251-260.
186. Gordon D, Cosgriff T, Schneider I, et al. Safety and immunogenicity of a *Plasmodium vivax* sporozoite vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:527-531.
187. Herrington D, Nardin E, Losonsky G, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant sporozoite malaria vaccine against *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45:695-701.
188. Ash C. First impressions of the malaria vaccine. *Parasitology Today* 1991;7(4):63-64.
189. Ballou WR. Vaccines and immunotherapy. New York: Pergamon Press 1991;373-380.
190. Cox FEG. Malaria vaccines: while we are waiting. *Parasitology Today* 1991;7(8):189-190.

191. Cox FEG. Malaria vaccines-progress and problems. *Tibtech* 1993;9:389-394.
192. Enders B, Hundt E, Knapp B. Strategies for the development of an antimalarial vaccine. *Vaccine* 1992;10(13): 920-927.
193. Holloran ME, Struchiner CJ. Modeling transmission dynamics of stage-specific malaria vaccines. *Parasitology Today* 1992;8(3):77-85.
194. Miller LH, Howard RJ, Carter R, Good MF, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Research toward malaria vaccines. *Science* 1986;234:1349-1355.
195. Pessi A. Multiple antigen peptides (MAPs) as candidate vaccines against malaria. *Parasitologia* 1991;33(1):79-84.
196. Sinigaglia F, Pink JRL. Away round the "real difficulties" of malaria sporozoite vaccine development? *Parasitology Today* 1990; 6: 17-19.
197. World Health Organization. Malaria vaccine development pre-erythrocytic stages. *WHO Bull.* 1990; 68(supplement).
198. Zavala F, Tam JP, Cochrane AH, Hollingdale MR, Quakyi I, Nussenzweig RS. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*. 1985; 228: 1436-1440.
199. Alonso PL, Molyneux ME, Smith T. Design and methodology of field-based intervention trials of malaria vaccines. *Parasitology Today*. 1995. 11(6):197-200.
200. Jones TR, Kevin JB, Bangs MJ, Annis BA, Purnomo, Basri H, Gunawan S, Harjosuwarno S, McElroy PD, Hoffman SL. Malaria vaccine study site in Irian Jaya, Indonesia: *Plasmodium falciparum* incidence measurements and epidemiologic considerations in sample size estimation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. 50(2): 210-218.
201. Trape JF, Rogier Ch, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Conque B, Legros F, Badji A., Ndiaye G, Ndiaye P, Brahim K, Faye O, Druilhe P, Da Silva LP. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. 51(2):123-137.
202. Molineaux L, Gramiccia G. The Garki Project. Ginebra. World Health Organization, 1980.
203. Cruz Marques A. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitology Today*. 1987; 3(6): 166-170.
204. Nigatu W. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* epidemiology in Gambella, Southwest Ethiopia. *Trop. Med. Parasitol.* 1992; 43(3): 181-185.
205. Rojas W, Peñaranda F, Echavarría M. Strategies for malaria control in Colombia. *Parasitology Today*. 1992; 8(4): 141-144.
206. Vargas G. Evaluación del programa de control de malaria en Antioquia 1985-1989. *Boletín Epidemiológico de Antioquia*. 1990; XV: 291-308.