

Respuesta Terapéutica y Parasitemia en pacientes con Malaria por *Plasmodium falciparum* en diferentes comunidades del estado Amazonas, Venezuela

Gabriela Certad*¹, Albina Wide^{2,3}, Irma Rodríguez⁴, Jacinta Capaldo², Marithe Zárate⁵, Neuro Galbán⁴, Carlos Vásquez⁵, Leonor Pocaterra¹, Flavia Riggione² & Oscar Noya^{2,3}

Se realizó una evaluación *in vivo* de acuerdo al Protocolo de la OMS/OPS (1998) de pacientes con malaria por *Plasmodium falciparum* tratados con cloroquina (CQ), en dos municipios del Estado Amazonas venezolano: Manapiare, zona con reciente endemidad para malaria por esta especie, y Alto Orinoco, área históricamente conocida con alta transmisión malárica. En la primera evaluación realizada en la comunidad de San Juan de Manapiare a 18 pacientes se les completó el seguimiento, estos tuvieron una media de edad de 9,6 años ($p=0,046$), y una media de parasitemia de 1409,4 par/mL ($p=0,001$), la más baja y la más alta respectivamente en relación con las otras comunidades estudiadas. Después del tratamiento con CQ, 33% presentó falla terapéutica (FT) a la droga. En el segundo seguimiento en esta misma región realizado al año siguiente, de un total de 15 pacientes evaluados hasta el final, 73% tuvo < 500 par/mL y 93% presentó respuesta clínica (RCA) a la CQ ($p=0,007$). En el tercer estudio realizado en el Alto Orinoco, de un total de 22 pacientes evaluados por 14 días, 68% tuvo < 500 par/ml y 55% presentó falla terapéutica a la CQ. En estos resultados se encontró que en zonas de alta transmisión la falla terapéutica a la CQ, se presentó aún con parasitemias muy bajas, mientras que en otras regiones como San Juan de Manapiare donde la epidemia por *P. falciparum* fue reciente, a bajas cargas parasitarias la droga pareciera ser efectiva. Por otro lado, la presencia de bajas parasitemias encontradas en Platanal, Mavaca o en San Juan de Manapiare (en el segundo seguimiento), sugiere que la exposición previa a la infección puede favorecer una inmunidad protectora frente al parásito por parte del hospedador, que se manifiesta con bajas cargas parasitarias.

Palabras claves: *P. falciparum*, parasitemia, cloroquina, respuesta clínica, falla terapéutica.

INTRODUCCIÓN

Las drogas antimaláricas han sido hasta ahora uno de los pilares fundamentales para el control de la transmisión de esta infección a nivel mundial. Sin embargo, el desarrollo de resistencia de *Plasmodium falciparum* a algunos de estos medicamentos antimaláricos como la cloroquina (CQ), ha constituido uno de los principales obstáculos para el control de esta infección (Slater, 1993). El primer reporte a nivel

mundial sobre la resistencia de *P. falciparum* a las drogas antimaláricas fue realizado en Venezuela por Maberti en 1960. Posteriormente en años sucesivos diferentes investigadores también reportaron casos de resistencia en diferentes localidades del país: en el estado Bolívar (Godoy *et al*, 1975, Aché *et al*, 2002), en el municipio Atures (Maynadie *et al*, 1989) y en Ocamo, Estado Amazonas (Riggione *et al*, 1998).

Por otro lado, es importante destacar que la presentación de la malaria por *P. falciparum* en el Estado Amazonas tiene características particulares dependiendo de las diferentes regiones afectadas. En el caso de las poblaciones del Alto Orinoco constituidas en su mayoría por indígenas de la etnia Yanomami se ha encontrado que la transmisión de esta infección es hiperendémica y estable, con un predominio de bajas parasitemias entre los pobladores (Marcano *et al*, 2004). Por el contrario, en la región de San Juan de Manapiare la endemidad de malaria por *P. falciparum* era reciente

¹ Escuela de Medicina J.M. Vargas Universidad Central de Venezuela.

² Escuela de Medicina Luis Razetti Universidad Central de Venezuela.

³ Laboratorio para Estudios sobre Malaria-Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" - Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" - Universidad Central de Venezuela.

⁴ Centro Amazónico para Investigación y Control de Enfermedades Tropicales "Simón Bolívar" (CAICET).

⁵ Ambulatorio San Juan de Manapiare MSDS.

*Autor de correspondencia: gfombo@cantv.net

para el momento del estudio, y más frecuentemente se encontraron parasitemias más elevadas causando la enfermedad en la población. En vista de lo planteado anteriormente, el objetivo de esta investigación fue evaluar la quimiosusceptibilidad in vivo de *P. falciparum* a la CQ en función de la parasitemia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada

Se incorporaron al estudio pacientes con malaria por *P. falciparum*, según los criterios de inclusión estipulados en el protocolo estandarizado de la OMS/OPS para la evaluación in vivo de la eficacia de las drogas antimaláricas (1998). Este protocolo contempla para la determinación del tamaño de la muestra, el uso del método de doble calidad de lotes (double lot quality assurance method) para facilitar la evaluación de pequeños grupos poblacionales. Cada paciente dio su consentimiento informado previamente a su participación en el estudio.

En el caso de los niños, el consentimiento se le solicitó al padre o tutor. El estudio fue aprobado por el Ministerio de Salud y Desarrollo Social a través de la Dirección Regional de Salud del Estado Amazonas.

Área de estudio

La investigación fue realizada en 2 municipios del Estado Amazonas, Venezuela, con situaciones diferentes en relación a la endemia para malaria: 1. Manapiare: En esta región el estudio se llevó a cabo en la población de San Juan de Manapiare, donde el predominio de la endemicidad de malaria por *P. falciparum* era reciente. En esta localidad se hicieron dos seguimientos, el primero en marzo de 2001 al comienzo de una situación de epidemia por *P. falciparum*.

El segundo se realizó 10 meses después, luego de que fueran instauradas las medidas de control antivectorial (fumigaciones periódicas). 2. Alto Orinoco: En las poblaciones del Alto Orinoco constituidas en su mayoría por indígenas de la etnia Yanomami, se ha encontrado a través del tiempo que la transmisión de la malaria es hiperendémica y estable, con un predominio de bajas parasitemias (Marcano *et al*, 2004). En esta región se evaluaron pacientes tanto en la comunidad de Platanal en Julio de 2001, como en Mavaca en agosto de 2002.

Esquema terapéutico

Se aplicó el protocolo estándar internacional para la evaluación de la eficacia terapéutica de las drogas antimaláricas para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* (OMS/OPS, 1998). Este protocolo consistió en: 1. Evaluación de los pacientes febriles tanto clínica como parasitológicamente a través de los métodos de gota gruesa y extendido, en el día 0 antes de iniciar el tratamiento, para determinar los casos de infección por *P. falciparum*. 2. Administración de la dosis de CQ (droga de primera elección en el tratamiento de la malaria en Venezuela hasta diciembre de 2002) bajo supervisión médica. Todos aquellos pacientes que resultaron positivos para la infección por *P. falciparum* recibieron 25 mg/Kg para las comunidades de San Juan de Manapiare y Platanal de acuerdo a lo sugerido por el protocolo de la OMS/OPS, y la dosis reforzada de 40 mg/Kg para Mavaca de acuerdo al esquema propuesto por el Ministerio de Salud y Desarrollo Social (2000). En los casos en que se empleó 25mg/Kg, el tratamiento consistió en un curso de tres días con las siguientes dosis: 10 mg/Kg de peso el primer día, 10 mg/Kg de peso el segundo día y 5 mg/Kg de peso el tercer día. La dosis de 40 mg/Kg se distribuyó en tomas diarias de 10 mg/Kg durante 4 días. 3. Seguimiento supervisado por el médico, tanto clínico como parasitológico los días 2, 3, 7 y 14 de los pacientes infectados en el Alto Orinoco, y hasta el día 28 en el caso de los pacientes incorporados a este estudio provenientes de San Juan de Manapiare. Los pacientes que presentaron vómitos posterior a la toma de la droga recibieron una segunda dosis. La evaluación durante dos semanas en el Alto Orinoco se fundamentó en el protocolo de la OMS/OPS, que sugiere seguimientos hasta de 14 días para zonas de alta transmisión en las cuales existen altas tasas de reinfección y/o en las que no siempre es posible completar el estudio de los pacientes debido a las dificultades logísticas. 4. La respuesta terapéutica se clasificó en 2 categorías según el protocolo de la OMS/OPS (1998): a) Respuesta Clínica Adecuada (RCA), b) Fracaso del tratamiento o Falla Terapéutica (FT). Los pacientes con FT tanto temprana (FTT) como tardía (FTT) fueron tratados inmediatamente con quinina y clindamicina x 7 días. No se evaluó en este último grupo la eficacia de dicho esquema terapéutico.

Diagnóstico de laboratorio y control de calidad

Se examinaron microscópicamente al menos 2 láminas con gota gruesa y extendido teñidos con

Giemsa de todos los pacientes para detectar infección por *P. falciparum*. Luego se continuaron realizando 2 láminas durante los días de seguimiento a todos los que resultaron positivos en el día 0 y fueron incluidos en el estudio, de modo de poder realizar los controles de calidad estipulados en el protocolo. Al menos 100 campos fueron examinados antes de considerar una lámina negativa. Microscopistas expertos en el diagnóstico de malaria participaron en el estudio.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, utilizando medidas de tendencia central para datos continuos como edad y valores de parasitemia y tablas de contingencia para variables dicotómicas evaluando su significancia estadística con las pruebas de χ^2 o Fisher exacto. Además, se realizó un análisis univariado utilizando la prueba de Mantel-Haenszel para obtener OR. El análisis fue realizado con el programa STATA 7. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS

Un total de 92 pacientes con malaria no complicada por *P. falciparum* fueron tratados con cloroquina y se pudieron seguir hasta el final 55 pacientes. La media geométrica de edad de los pacientes incluidos por comunidad se muestra en la Tabla I. Los pacientes de Manapiare 2001 tuvieron la media de edad más baja con una asociación estadísticamente significativa aunque limítrofe ($p = 0,046$). En el primer estudio en San Juan de Manapiare en marzo de 2.001, se completó el seguimiento de 18 pacientes, 100% de estos presentó recuentos parasitarios > 500 parásitos/ml, con una media de parasitemia en el primer día de inclusión en el estudio de 1.409 parásitos/ml (95% IC: 926,6-2.144, 6), 33% tuvo FT (FTP: 11%, FTT: 22%). En el segundo seguimiento en esta misma región en enero

de 2002, 15 pacientes pudieron ser evaluados, encontrándose que 73% tenía cargas < 500 parásitos/ml, con una media de parasitemia en el día 0 de 475,3 parásitos/ml (95% IC: 248,9-907,7). De éstos, 93 % presentó RCA a la droga ($p = 0,007$). En el caso de las evaluaciones realizadas en el Alto Orinoco tanto en Platanal como en Mavaca, se encontró que de un total de 22 pacientes que fueron seguidos por 14 días, 68% tenía cargas parasitarias < 500 parásitos/ml y 54,6% presentó FT (FTP: 45,45%, FTT: 9,09 %). Al hacer el análisis univariado se encontró que los pacientes de Manapiare 2002 tuvieron 16,8 veces más chance de responder al tratamiento que los del Alto Orinoco (OR= 16,8; 95% IC: 1,3-217; $p = 0,003$).

En Manapiare 2001 la mayoría de los pacientes tuvo una parasitemia mayor de 600 parásitos/ml y esta asociación tuvo una significancia estadística cuando se comparó con tal situación tanto en el Alto Orinoco como en Manapiare 2002 (81,8 % y 73,3 % respectivamente) ($p = 0,011$). Así mismo, la media de parasitemia fue significativamente mayor en aquellas personas evaluadas en Manapiare 2001 ($p = 0,001$) (Tabla II). Al hacer el análisis univariado se encontró que los pacientes de Manapiare 2001 tuvieron 7,2 veces más chance de tener una mayor parasitemia que los del segundo seguimiento en Manapiare 2002 (OR= 7,2; IC 95%= 1,2-41,4; $p = 0,010$). Así mismo, tuvieron 11,7 veces más riesgo de tener mayores parasitemias en comparación con los del Alto Orinoco (OR= 11,7; IC 95%= 1,9-71,2; $p = 0,001$). Del total de pacientes evaluados en todas las comunidades, sólo uno proveniente de San Juan de Manapiare presentó fiebre como única manifestación clínica a consecuencia de la falla terapéutica a la droga, en el resto de los casos la falta de susceptibilidad se corroboró con el hallazgo de parasitemias persistentes demostradas en las láminas positivas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evidenció falla terapéutica a la cloroquina en dos áreas de diferente transmisión malarica del Estado Amazonas. Esta falla terapéutica sobrepasó el límite permitido según el protocolo de la OMS/OPS (1998), el cual establece que con fallas superiores a 25%, los esquemas terapéuticos nacionales empleados deben ser revisados por las autoridades sanitarias. En países vecinos de la región amazónica también se ha encontrado falla terapéutica luego de la aplicación del protocolo. Por ejemplo, en Colombia se ha reportado una prevalencia de 67% de

Tabla I. Comparación de las localidades estudiadas según edad.

	Edad \bar{x} geom.	95% Intervalo de Confianza	Valor de p*
Manapiare 2001	9,6	5,5 – 16,8	0,046
Manapiare 2002	10,2	4,5 – 20,7	0,395
Alto Orinoco	17,4	12,3 – 24,8	

*Valores de p obtenidos comparando las medias de Manapiare 2001 y 2002 con las del Alto Orinoco

Tabla II. Comparación de las localidades estudiadas de acuerdo a la falla terapéutica y a las parasitemias por Plasmodium falciparum.

	Falla Terapéutica N (%)	Parasitemia \bar{x} geom. (parásitos/ml)	95% Intervalo de Confianza	Valor de p*
Manapiare 2001	6/18 (33,3%)	1409,4	962,2 – 2144,6	0,001
Manapiare 2002	1/15 (6,6%)	465,3	248,8 – 907,7	0,181
Alto Orinoco	12/22 (54,54%)	269,1	171,6 – 421,8	

*Valores de p obtenidos comparando las medias de parasitemia de Manapiare 2001 y 2002 con las del Alto Orinoco

falla terapéutica a la cloroquina (Blair-Trujillo *et al*, 2002) y en Perú se ha encontrado una ausencia de respuesta al mismo tratamiento superior al 50% (Marquino *et al*, 2003).

Por otro lado, es importante destacar que en San Juan de Manapiare, zona de reciente endemidad para *P. falciparum*, se observaron dos tipos de resultados dependiendo de los niveles de parásitos en la sangre de los pacientes: a) Cuando las cargas parasitarias fueron mayores (período epidémico), se evidenció una importante FT a este medicamento. b) Cuando los pacientes presentaron bajas cargas parasitarias (< 500 parásitos/ml), la droga todavía pareció ser efectiva sobre la mayoría de los infectados. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores, los cuales señalan que en los casos de infecciones con altas parasitemias es más probable que ocurra FT, en comparación con los efectos de la droga aplicada a personas con bajas parasitemias (White, 2004, Dorsey *et al*, 2004). Sin embargo, los resultados de este estudio demuestran que en las zonas evaluadas de intensa transmisión malárica como es el caso del Alto Orinoco, la presencia de FT a la CQ se presentó aún con parasitemias bajas. Es importante destacar que se ha descrito previamente que entre los pobladores de las comunidades Yanomami del Alto Orinoco, 90% presenta altos títulos de anticuerpos antimaláricos y bajas parasitemias debido a que esta zona se ha caracterizado por una transmisión de tipo hiperendémica a lo largo del tiempo (Marcano *et al*, 2004). Probablemente, la presión constante a la cual ha estado sometido el parásito por el frecuente uso de la droga, en algunos casos sin control, influye en la obtención de estos resultados. Wernsdorfer (1994) reporta que la presión con drogas es un requisito indispensable para el desarrollo de resistencia por parte de los parásitos, lo cual puede favorecer cambios a nivel molecular. No obstante, la rapidez con que se desarrolla dicha

resistencia y la intensidad dependerán también de otros factores inherentes al propio parásito, a la droga en sí misma o al hombre. Está descrito que en zonas endémicas que no cuentan con posibilidades de seguimiento médico constante, el riesgo de FT se incrementa (Yeung & White, 2005).

Así mismo, la exposición previa a la infección puede favorecer una respuesta inmunitaria hacia el parásito por parte del hospedador lo cual podría explicar las bajas parasitemias encontradas en Platanal, Mavaca, o en San Juan de Manapiare durante el segundo seguimiento del año 2002. White *et al*, (2004) han propuesto que los mecanismos inmunológicos del hospedador pueden tener un mayor efecto antiparasitario, sobre todo en zonas de alta transmisión malárica, ya que la exposición repetida y continua conlleva al desarrollo de una inmunidad antiparasitaria que reduce la parasitemia y concomitantemente el nivel de estimulación antigénica (Basco *et al*, 2002; Artavanis-Tsakonas *et al*, 2003). Por otro lado, esta presión inmunológica podría estimular mecanismos de evasión, como la variabilidad genética y por ende fenotípica, en un parásito que exhibe una gran plasticidad en su genoma.

También se ha descrito que en estas zonas de alta transmisión la inmunidad adquirida, puede contribuir con la respuesta terapéutica (Mayxay *et al*, 2001). Algunos estudios han propuesto que en zonas donde la exposición a la infección malárica es crónica, tal como ocurre en el Alto Orinoco, se genera especialmente en adultos, un tipo de respuesta inmunológica que podría afectar el patrón de respuesta celular ya que comienza a predominar un patrón Th-2 dependiente de IL-4 que conlleva al mantenimiento de bajas densidades parasitarias (Baird, 1998). Adicionalmente, se ha encontrado que pacientes con fracaso al tratamiento antimalárico presentan niveles

más bajos de anticuerpos (Mayxay *et al*, 2001). De hecho, los pacientes del primer seguimiento en Manapiare fueron los que presentaron medias de edad más bajas con una significancia estadística, lo cual está en concordancia con estudios previos que han descrito una asociación entre mayor edad de las personas y mayor protección a la infección por *P. falciparum* (Hudson Keenihan *et al*, 2003) o menor edad y mayor parasitemia (Sowunmi *et al*, 2004). Cabe destacar que en Mavaca (Alto Orinoco), el tratamiento con CQ fue calculado a la dosis reforzada de 40 mg/Kg de acuerdo a las especificaciones del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (2000). Sin embargo, experiencias de algunos investigadores han demostrado que el incremento de dosis de una determinada droga antimalárica, luego de una comprobada disminución de su eficacia trae como consecuencia un rápido aumento de la FT a la nueva concentración de dicha droga (Wernsdorfer, 1994).

Una hipótesis que también puede explicar los resultados obtenidos en las zonas conocidas históricamente como áreas de alta transmisión, se basa en que hay mayor posibilidad de que estén circulando simultáneamente diferentes y numerosas poblaciones del parásito donde diversos aislados de *P. falciparum* pueden presentar diferentes susceptibilidades al tratamiento favoreciendo así la manifestación de la quimioresistencia (Wernsdorfer, 1994) en contraposición a zonas de reciente introducción malárica donde el número de variantes genotípicas y fenotípicas es limitado. Esta hipótesis pareciera también explicar los resultados obtenidos después de la aplicación de la vacuna antimalárica SPf66 cuando se compararon los focos de transmisión más reciente en Latinoamérica con respecto a los africanos (Noya *et al*, 1994, Tanner *et al*, 1995, Graves *et al*, 1998).

Es importante mencionar que la FT al tratamiento antimalárico es multifactorial, depende de: las características biológicas del parásito, presencia de genes de resistencia, estacionalidad de la transmisión, metabolismo de la droga, antecedentes maláricos, estado nutricional, edad, embarazo, constitución genética y de la respuesta inmunitaria de la población (Wellems *et al*, 2001). Por otro lado, la respuesta exitosa al tratamiento depende no sólo de la respuesta inmunitaria humoral sino de mecanismos que involucran al TNF, óxido nítrico y otros radicales libres que pueden coadyuvar en la eliminación del parásito intracelular (Hommel & Gilles, 1998).

THERAPEUTIC RESPONSE AND PARASITAEMIA IN PATIENTS WITH *Plasmodium falciparum* MALARIA FROM VARIOUS COMMUNITIES IN AMAZONAS STATE, VENEZUELA

SUMMARY

We tested the efficacy of chloroquine (CQ) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in two areas of the Venezuelan Amazonas State: Manapiare, in which the transmission of *P. falciparum* malaria had begun recently, and in Alto Orinoco, in which the transmission was known as endemic. Patients were evaluated using the WHO *in vivo* antimalarial testing guidelines. In the first evaluation at San Juan de Manapiare, 18 patients had follow up completed until the end and 100% had parasitaemia > 500 par/ml. After treatment with chloroquine, 33 % presented therapeutic failure. In a second study in the same town one year later, out of 15 patients 73% had < 500 par/ml and 93% responded to treatment (p=0.007). The third evaluation was carried out in 2 different villages of Alto Orinoco during 14 days. We found that 68% of the patients had parasitaemia < 500 par/ml, and 55% presented therapeutic failure. In fact, in this study it was observed that in *P. falciparum* highly endemic areas, therapeutic failure to CQ occurred even in those patients with low parasitaemia at enrolment. However, in areas of recent transmission such as San Juan de Manapiare, therapeutic failure occurred mainly in persons with high parasitaemia.

Key words: *P. falciparum*, parasitaemia, chloroquine, clinical response, therapeutic failure.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los microscopistas Aníbal Carrasquel, Margarita Rodríguez (CAICET), Leonel Díaz y Jhon Camico (Zona de Malariología, San Juan de Manapiare). Esta investigación fue subvencionada por la Gerencia de Investigación Orientada, Agenda Salud, FONACIT. Proyecto N° 98003203.

REFERENCIAS

Aché A., Escorihuela M., Páez E., Miranda L., Matos A., Pérez W., Díaz O. & Izarra E. (2002). *In vivo* drug resistance of *falciparum* malaria in mining areas of Venezuela. *Trop. Med. Int. Health.* 7: 1-7.

- Artavanis-Tsakonas K., Tongren J.E. & Riley E.M. (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.* **133**: 145-152.
- Baird J. K. (1998). Age dependent characteristics of protection vs. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92**: 367-390.
- Basco L., Ndonga M., Keundjian A. & Ringwald P. (2002). Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. Characteristics of recrudescence and persistent *Plasmodium falciparum* infections after chloroquine or amodiaquine treatment in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 117-123.
- Blair-Trujillo S., Lacharme-Lora L. & Carmona-Fonseca J. (2002). Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Zaragoza (Antioquia, Colombia), 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 401-406.
- Dorsey G., Gasasira A., Machekano R., Kanya M., Staedke S. & Hubbard A. (2004). The impact of age, temperature, and parasite density on treatment outcomes from antimalarial clinical trials in Kampala, Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 531-536.
- Godoy G.A., Volcán G.S., Guevara R., Medrano C., Castro J. & Texeira A. (1977). Venezuelan strains of *P. falciparum* resistant to Sulfa and Pirimetamina by *in vitro* test. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **19**: 229-231.
- Graves P., Gelband H., Garner P. (1998). The SPf66 Malaria Vaccine; What is the evidence for Efficacy?. *Parasitol. Today.* **14**: 218-220.
- Hommel M. & Gilles H. M. (1998). Malaria En: *Microbiology and microbial infection*. Tapley and Wilson Ed. 9th edition. Cox F. E., Kreeier J. P., Wakelin T., London. 361-409 pp.
- Hudson Keenihan S.N., Ratiwayanto S., Soebianto S., Krisin, Marwoto H., Krishnegowda G. *et al*, (2003). Age-dependent impairment of IgG responses to glycosylphosphatidylinositol with equal exposure to *Plasmodium falciparum* among Javanese migrants to Papua, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**: 36-41.
- Maberti S. (1960). Desarrollo de resistencia a la pirimetamina. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol.* *Médica.* **3**: 239-259.
- Marcano T.J., Morgado A., Tosta C.E. & Rodrigues Coura J. (2004). Cross-sectional study defines differences in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 369-376.
- Marquino W., MacArthur J.R., Barat L.M., Oblitas F.E., Arrunategui M., Garavito G. *et al*, (2003). Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria on the north coast of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**: 102-123-923.
- Maynadié M., Peceño C., Noriega P. L. & Yarzabal L. (1989). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* strains to chloroquine and mefloquine en the Amazonas Federal Territory of Venezuela. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**: 586-588.
- Mayxay M., Chotivanich K., Pukrittayakamee S., Newton P., Looareesuwan S. & White N. (2001). Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 918-923.
- McGuinness D., Koram K., Bennet S., Wagner G., Krumah F., Riley E. (1998). Clinical case definitions for malaria: clinical malaria associated with very low parasite densities in African infants. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 527-531.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Dirección General de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria. Malaria o Paludismo. *Pautas de tratamiento*. Caracas, Venezuela, 2000.
- Noya O., Gabaldon I., Alarcón de Noya B., Borges R., Zerpa N., Urbaz J. *et al*, (1994). A Population-Based Clinical Trial with the SPf66 Synthetic *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccine in Venezuela. *J. Infect. Dis.* **70**: 396-402.
- OMS/OPS (1998). *Evaluación de la eficacia terapéutica de los medicamentos para el tratamiento del paludismo por Plasmodium falciparum sin complicaciones en las Américas*. OPS/HCP/HCT/113/98.
- Riggione F., Magris M., Serafin L.M., Mijares G., Charris

- J., Domínguez J. & Urbina J. (1998). La quimiosensibilidad de *Plasmodium falciparum* de Venezuela. *Bol. Mal. San. Amb.* **38**: 1-14.
- Slater A. F. (1993). Chloroquine: mechanisms of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* **57**: 203-267.
- Sowunmi A., Adedeji A.A., Fateye B.A. & Babalola C.P. (2004). *Plasmodium falciparum* hyperparasitaemia in children. Risk factors, treatment outcomes, and gametocytaemia following treatment. *Parasite.* **11**: 317-23.
- Tanner M., Teuscher T., Alonso P. (1995). SPf66- The First Malaria Vaccine. *Parasitol. Today.* **11**: 10-13.
- Yeung S. & White N. (2005). How do patients use antimalarial drugs? A review of the evidence. *Trop. Med. Int. Health.* **10**: 121-138.
- Wellems T.E. & Plowe C.V. (2001). Chloroquine resistant malaria. *J. Infect. Dis.* **184**: 770-776.
- Wernsdorfer W. (1994). Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Trop.* **56**: 143-156.
- White N. (2004). Antimalarial drug resistance (review). *J. Clin. Invest.* **113**: 1084-1092.
- White N. J. & Pongtavornpinyo W. (2003). The novo selection of drug resistance in malaria parasites. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **270**: 545-554.
-