

## Capacidad inhibitoria del crecimiento intraeritrocítico del *Plasmodium falciparum* en sueros de áreas maláricas.<sup>1</sup>

Sócrates Herrera, M.D.<sup>2</sup>, Blanca Liliana Perlaza, Bact.<sup>3</sup>, Myriam de Herrera, Bact.<sup>4</sup>, Consuelo Clavijo, Bact.<sup>5</sup> y Alberto Alzate, M.D.<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se describe el fenómeno de inhibición del crecimiento intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* *in vitro* producido por factores solubles de tipo no anticuerpo presentes en el suero de individuos de áreas maláricas de la costa pacífica colombiana, fenómeno denominado "crisis".

Se determinaron en sueros de 80 individuos, los títulos de anticuerpos antimaláricos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y la capacidad inhibitoria del crecimiento intraeritrocítico del

parásito por el método de incorporación de hipoxantina radiomarcada.

Los resultados confirman que el fenómeno es por completo independiente de los títulos de anticuerpos y de la parasitemia. Algunos sujetos paradójicamente presentaron altas parasitemias y niveles severos de inhibición *in vitro* lo cual sugiere que el fenómeno se podría producir sobre ciertas poblaciones de parásitos y no en otras. Estos resultados contrastan con los de estudios en Africa y Asia, en los cuales el fenómeno se consideró como asociado con inmunidad clínica contra *P. falciparum*.

La malaria es una enfermedad causada por protozoarios del género *Plasmodium* transmitidos a un huésped vertebrado por mosquitos del género *Anopheles* luego de desarrollar en ellos un ciclo de vida sexual. En el hombre se producen los ciclos asexuales de crecimiento a nivel hepático y sanguíneo<sup>1</sup>. La enfermedad se caracteriza por presentar muy diversas

manifestaciones clínicas y patológicas que pueden variar desde fiebre, escalofrío, sudoración y dolor muscular hasta complicaciones severas como falla renal aguda, insuficiencia respiratoria, manifestaciones neurológicas y muerte<sup>2</sup>.

La respuesta del huésped contra el parásito involucra una gran cantidad de mecanismos inmunológicos específicos e inespecíficos, tanto de tipo humoral como de tipo celular que confieren niveles adecuados de protección sólo después de varios años de exposición continua al protozoario<sup>3</sup>, probablemente debido a la gran variabilidad antigénica del parásito en condiciones naturales<sup>4</sup>. Los anticuerpos juegan un papel importante en la protección del huésped, mediante el bloqueo de la invasión de los merozoitos a los glóbulos rojos<sup>5</sup>, mientras la respuesta inmune de tipo celular puede actuar mediante la producción de linfocinas por parte de las células T, las cuales pueden estimular en los macrófagos la elaboración de factores solubles, con capacidad para causar la muerte intraeritrocítica del parásito<sup>6</sup> o a través de células asesinas naturales (células "natural killer" NK) inducir citotoxicidad de los glóbulos rojos infectados<sup>7</sup>.

1. Investigación financiada en parte por el Programa Especial para la Investigación y el Entrenamiento en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud, el Banco Mundial y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (TDR/WHO/WB/UNDP), por el Comité de Investigaciones de la Universidad del Valle y por el Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesor Auxiliar, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Bacterióloga, Investigadora Asociada, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Profesora Auxiliar, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
5. Bacterióloga, Estudiante de Postgrado, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
6. Profesor Asistente, Jefe, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Se demostró que diversos factores solubles liberados por estas células, como el factor de necrosis tumoral (FNT)<sup>8</sup>, el gamma interferón<sup>9</sup>, y el factor (es) formador (es) de crisis (FFC)<sup>10</sup>, pueden inducir la degeneración y muerte intracelular del parásito.

Recientemente Jensen y col<sup>11</sup> han demostrado la capacidad que tienen los sueros de pacientes de áreas endémicas maláricas del Sudán para producir esta inhibición sobre cultivos *in vitro* de *P. falciparum*, en contraste con los sueros de Indonesia, que carecen de esta actividad.

El presente estudio se orientó a determinar si los sueros de individuos de áreas maláricas de la costa pacífica colombiana tenían la capacidad de inhibir el crecimiento del parásito y si existía la correlación clínica hallada por Jensen y col<sup>12</sup> entre la presencia del fenómeno y la ausencia de manifestaciones clínicas de malaria en un mismo paciente.

## MATERIALES Y METODOS

**Sujetos experimentales.** Para el presente estudio se seleccionó una muestra de 80 individuos: 10 que residían en Cali, mestizos, con edades entre 18 y 50 años, sin antecedentes maláricos y cuyos sueros se utilizaron como controles del crecimiento *in vitro* del *P. falciparum* y 70 de la costa pacífica colombiana, de raza negra y con las mismas edades. De ellos, 40 padecían malaria por *P. falciparum* en el momento del estudio y los 30 restantes eran individuos sanos, trabajadores de una compañía maderera (Aprovechamientos Forestales Limitada, AFOR Ltda), altamente expuestos a la malaria por razón de su trabajo, pero quienes manifestaron no haber sufrido ningún episodio malárico reciente.

**Serología.** A cada persona se le tomó una muestra de 10 ml de sangre y se separó el suero luego de un proceso de coagulación de una hora a temperatura ambiente. El suero inactivado a 56° C por 30 minutos, se fraccionó y se almacenó a -20° C.

La presencia de anticuerpos específicos se determinó por una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), según el método de Voller<sup>13</sup> utilizando como antígeno el aislado de origen colombiano de *P. falciparum* FCB-1 (facilitado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, INS).

**Parasitemia.** A cada individuo se le hizo un cuadro hemático y se cuantificó la parasitemia con base en el leucograma y en muestras de gota gruesa coloreadas por el método de Field<sup>14</sup>.

**Cultivos continuos y ensayo de inhibición.** El aislado FCB-1 de *P. falciparum* se cultivó *in vitro* de acuerdo con el método de Trager y Jensen<sup>15</sup>. El medio de cultivo que se utilizó, RPMI 1640 (Laboratorios Gibco) contenía como suplemento amortiguador HEPES 25 mM, bicarbonato de sodio al 5%, L-glutamina al 1%, glutatión al 5%, hipoxantina 1 mg/ml, gentamicina 40 µg/ml y 15% de una mezcla de sueros humanos normales.

Antes del ensayo de inhibición se sincronizó el parásito en el estadio de anillos con la técnica de Jensen<sup>16</sup> que, brevemente, consiste en realizar una concentración del parásito mediante el uso de gelatina a una concentración de 3% (g/dl) en medio RPMI 1640 completo y luego producir una lisis de sus estadios maduros con manitol al 5%. En seguida en placas

estériles de microtitulación (Linbro), se establecieron microcultivos que se mantuvieron según las condiciones de cultivo ya expuestas. El medio RPMI 1640 en esta fase del experimento no contenía hipoxantina y su suplemento de suero consistía en 15% del suero problema, previamente dializado contra el medio RPMI 1640 diluido 1:100 y suplementado con amortiguador HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio al 0.21%.

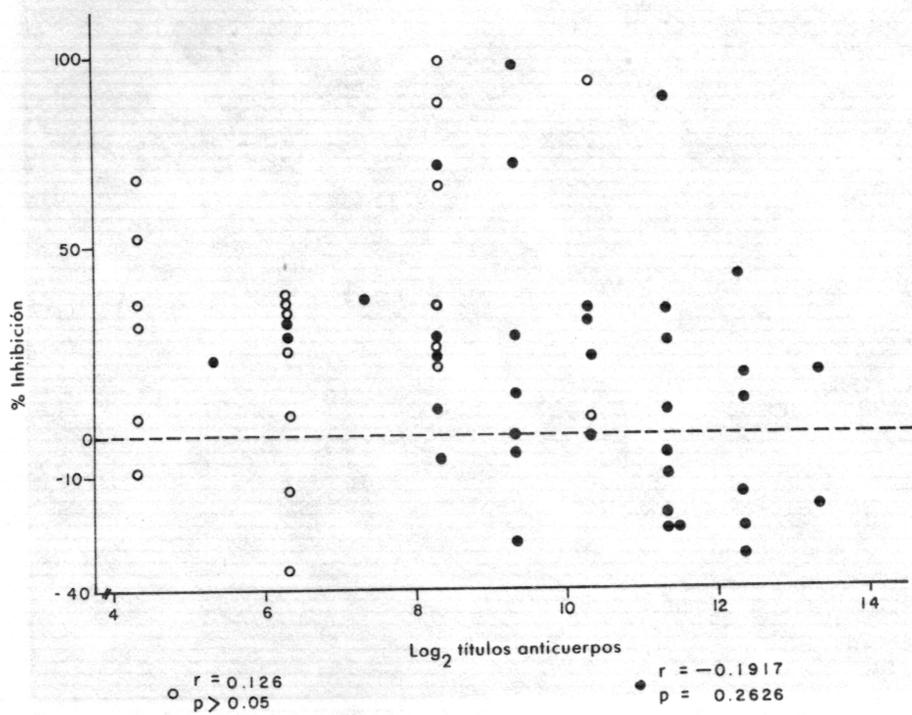
Luego de un período de 24 horas, el sobrenadante de los cultivos se reemplazó por medio fresco que contenía los mismos sueros problema y se inició un pulso con hipoxantina tritiada (<sup>3</sup>H-Hx) (New England Nuclear)<sup>17</sup> diluida en RPMI 1640 a una concentración de 1 µCi por pozo de cultivo. Después de un período de 16 horas de pulso, los microcultivos que se efectuaron por cuadruplicado para cada suero, se cosecharon en un colector de células (Mini-Mash, Microbiological Associates) sobre papel de fibra de vidrio (Mini-Mash, Glass Fiber Filter, Wittaker, M.A. Bioproducts) y la incorporación de <sup>3</sup>H-Hx al ADN parasitario se determinó por centelleo líquido en un contador de radioactividad beta (Beckman Instruments) utilizando como diluyente una mezcla de 15 g de omnifluor (New England Nuclear) en 3.8 litros de tolueno (J.T. Baker Chemical Co.).

Además, se evaluó cualitativamente el ensayo de inhibición mediante extendidos sanguíneos del cultivo a las 24 y 40 horas coloreados con Giemsa.

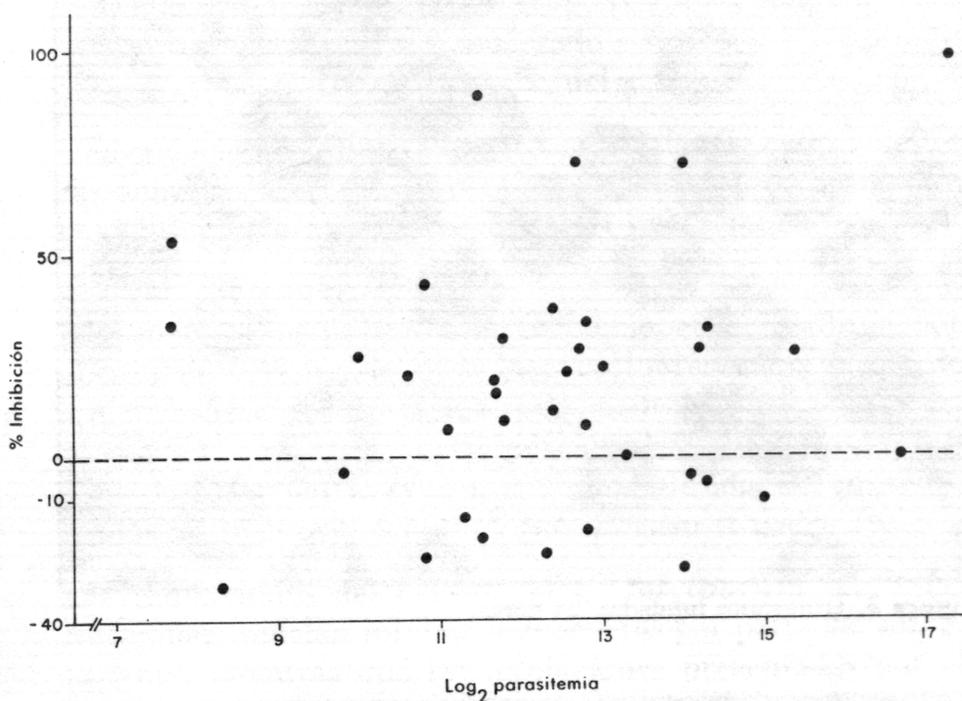
**Fraccionamiento de los sueros.** Los sueros que mostraron actividades inhibitorias del cultivo por encima de 60%, se precipitaron durante 8 horas a 4° C, utilizando sulfato de amonio concentrado con un porcentaje de saturación de 35% (vol/vol)<sup>18</sup>, con el fin de purificar la fracción de inmunoglobulinas (Ig). Cada una de las fracciones obtenidas, sobrenadante y precipitado se dializaron por un período de 48 horas, inicialmente contra un amortiguador de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02 M, pH 8.00) y, después, contra medio de cultivo RPMI 1640 en dilución 1:100, con suplemento de amortiguador HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio al 0.21%.

Los precipitados de esta separación se diluyeron al 5% en medio RPMI 1640 completo, con suplemento de suero humano normal al 5% y de nuevo se emplearon para realizar las pruebas de inhibición de acuerdo con el método descrito antes, y determinar si estos anticuerpos ejercían algún grado de inhibición en el desarrollo intracelular del parásito. De otro lado, los sobrenadantes se pasaron a través de una columna de cromatografía de afinidad<sup>19</sup> con una matriz constituida por sefarosa Cl-4B con proteína A de *Staphylococcus aureus* (Pharmacia) con el fin de absorber los anticuerpos principalmente de la clase IgG que pudieran aún estar presentes en el sobrenadante. Una vez más los sobrenadantes se probaron en los ensayos de inhibición, utilizando los microcultivos de *P. falciparum* con el sobrenadante a una concentración de 10% en RPMI 1640, suplementado con suero humano normal al 5%.

**Análisis estadístico.** Con el fin de conocer qué asociación existía entre el grado de inhibición y los títulos de anticuerpos, la parasitemia y la edad, el análisis de los datos se hizo con las técnicas estadísticas de correlación en variables continuas y regresión simple<sup>20</sup>.



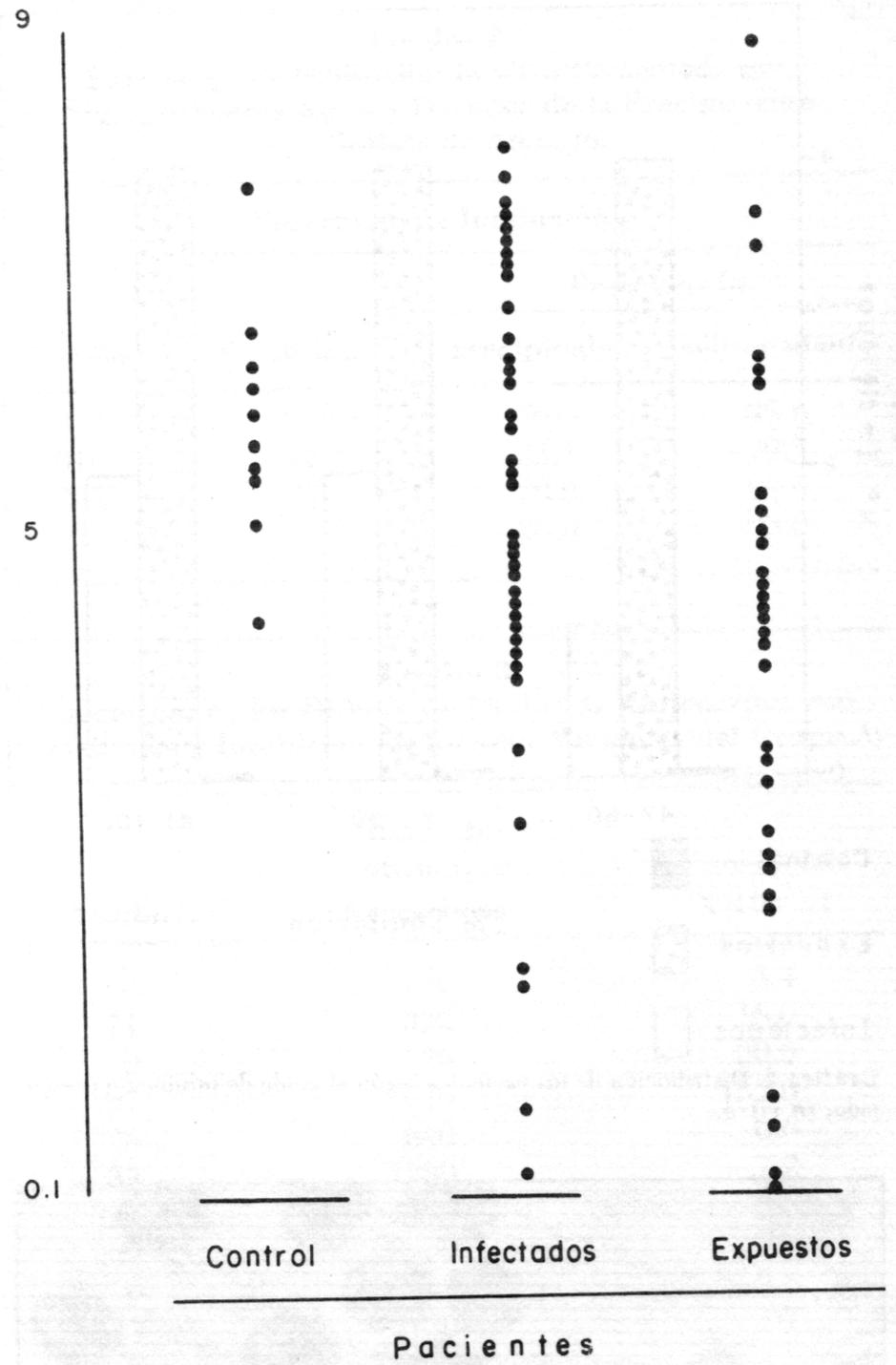
Gráfica 1. Distribución de los anticuerpos de los grupos infectado (●) y expuesto (○) y sus grados de inhibición.



Gráfica 2. Asociación del grado de inhibición del crecimiento del parásito *in vitro* con la parasitemia de los pacientes del grupo A.

## RESULTADOS

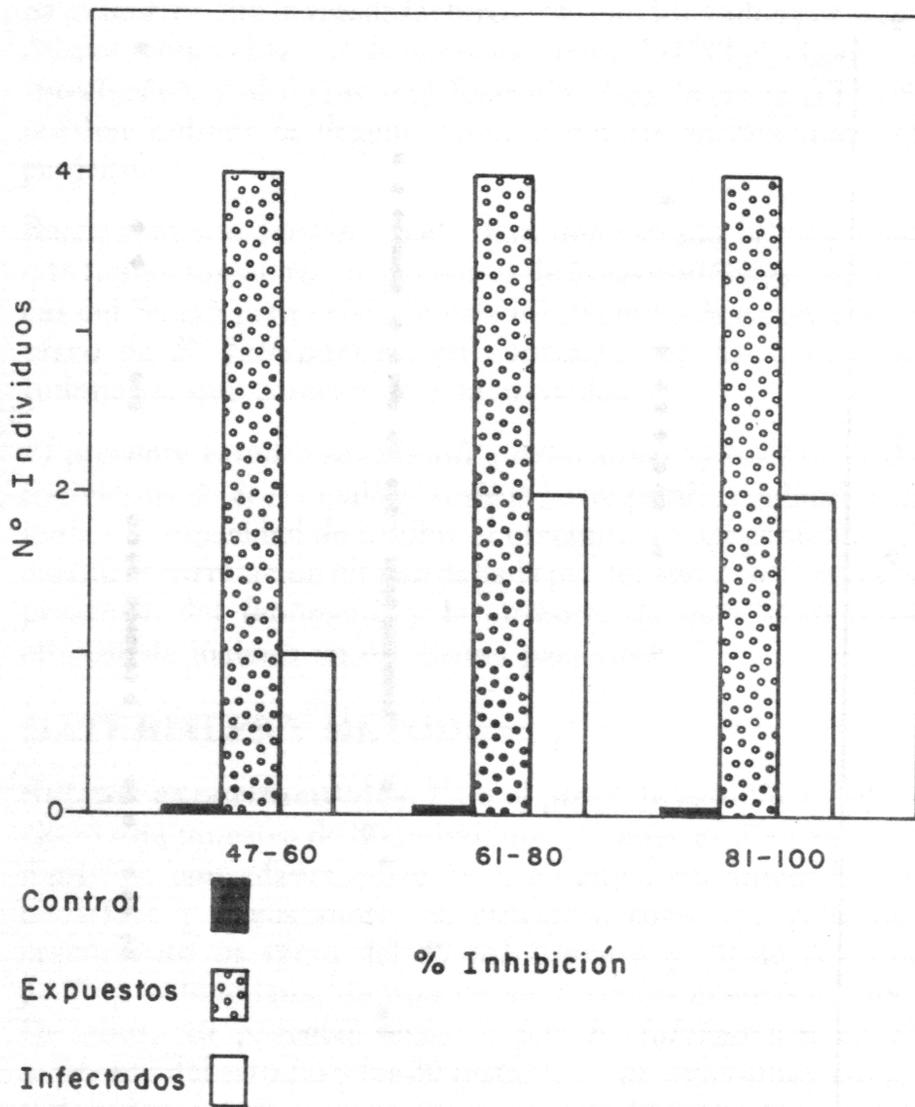
**Serología.** El análisis de los sueros de pacientes con episodios maláricos en el momento del estudio (grupo A), señaló títulos positivos en los anticuerpos de la IgG contra las formas sanguíneas del parásito entre 1:40 y 1:10240 ( $\bar{x}$  = 1:2111), aunque 8% de ellos no presentaron títulos. Los sueros de individuos sanos, pero que habían estado permanentemente expuestos a malaria por razón de su trabajo en el bosque (grupo B), mostraron títulos entre 1:20 y 1:1280 ( $\bar{x}$  = 1:172) y 30% de ellos no presentaron títulos. Todos los sueros utilizados como controles de la prueba de inhibición no tenían títulos de anticuerpos (Gráfica 1).



Gráfica 3. Ensayo de inhibición: incorporación de <sup>3</sup>H-Hipoxantina por *P. falciparum* cepa FCB<sub>1</sub> en medio RPMI 1640 que contenía suero control, suero de pacientes infectados y suero de pacientes expuestos.

**Análisis parasitológico.** Las parasitemias de los pacientes del grupo A oscilaron entre 0.2 y 152 x 10<sup>3</sup> parásitos por  $\mu$ l, mientras que ninguno de los miembros del grupo B, presentó parasitemia demostrable por el método de gota gruesa (Gráfica 2).

**Prueba de inhibición.** En el ensayo de inhibición del *P. falciparum*, el nivel de incorporación de hipoxantina tritiada (<sup>3</sup>H-Hx) por los cultivos enriquecidos con los sueros controles correspondió a 6000 cpm en promedio, que se consideraron como patrones normales de crecimiento *in vitro* del parásito. Los sueros de los pacientes parasitados y de quienes estaban expuestos a la infección malárica mostraron rangos muy variables de activación metabólica del parásito, desde prácticamente una inhibición completa (55 cpm que corresponden a 99% de inhibición) hasta estimulaciones superiores



Gráfica 4. Distribución de los pacientes según el grado de inhibición presentado, *in vitro*.

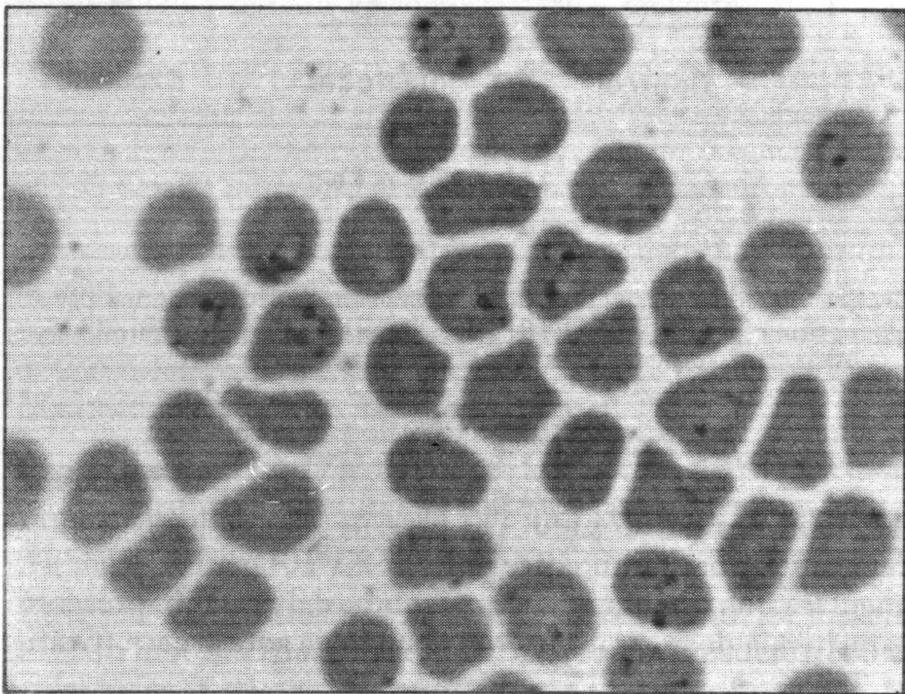


Figura 1. Parásito normal, 5% estadio de anillo, cero horas.

a las encontradas con los sueros controles (8900 cpm correspondientes a un crecimiento de 48% sobre el promedio normal) (Gráfica 3).

Con un nivel de significancia de 99.7% ( $\pm 3DE$ ) en la prueba se establecieron arbitrariamente 3 niveles de inhibición: 1) leve, entre 47% y 60%; 2) moderada, entre 61% y 80% y 3) severa, entre 81% y 100% (Gráfica 4). Con esta base se pudo observar que para cada uno de ellos, hubo un mayor número

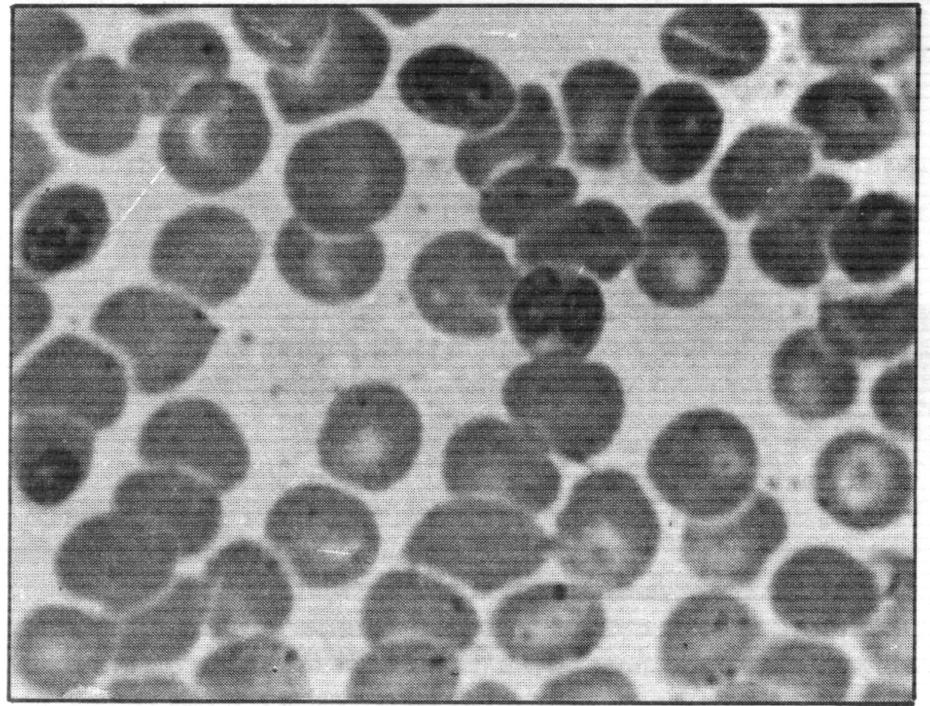


Figura 2. Trofozoitos normales, 24 horas.

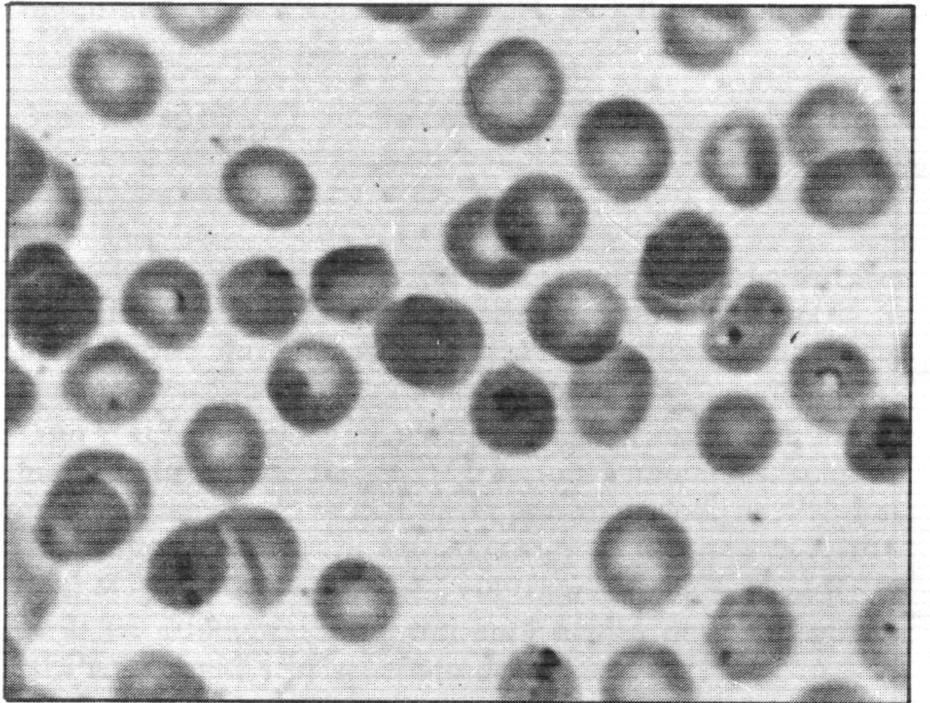


Figura 3. Trofozoitos inhibidos, 24 horas.

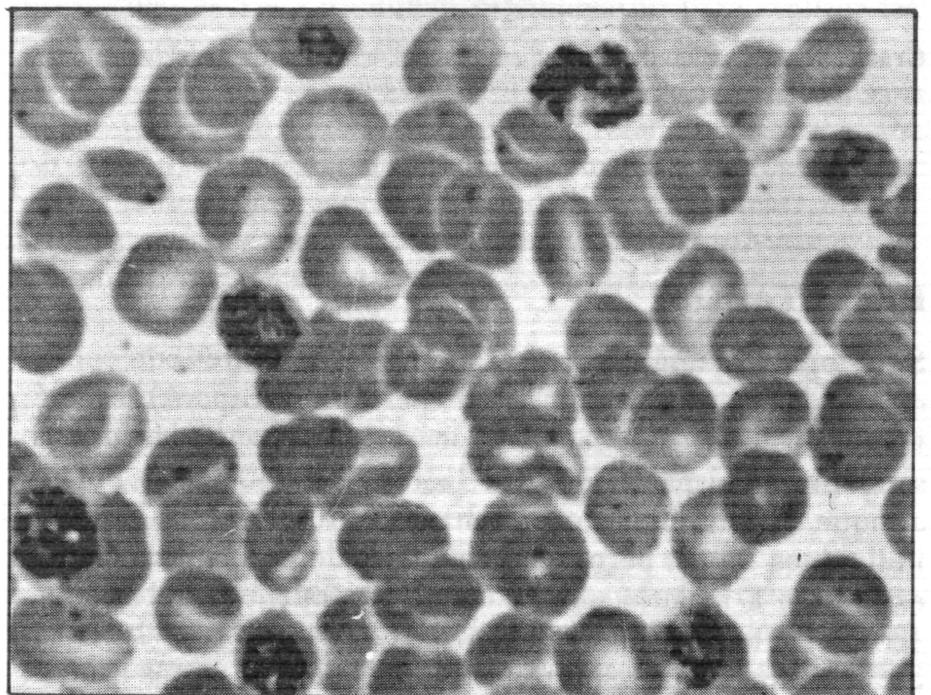


Figura 4. Esquizontes normales, 40 horas.

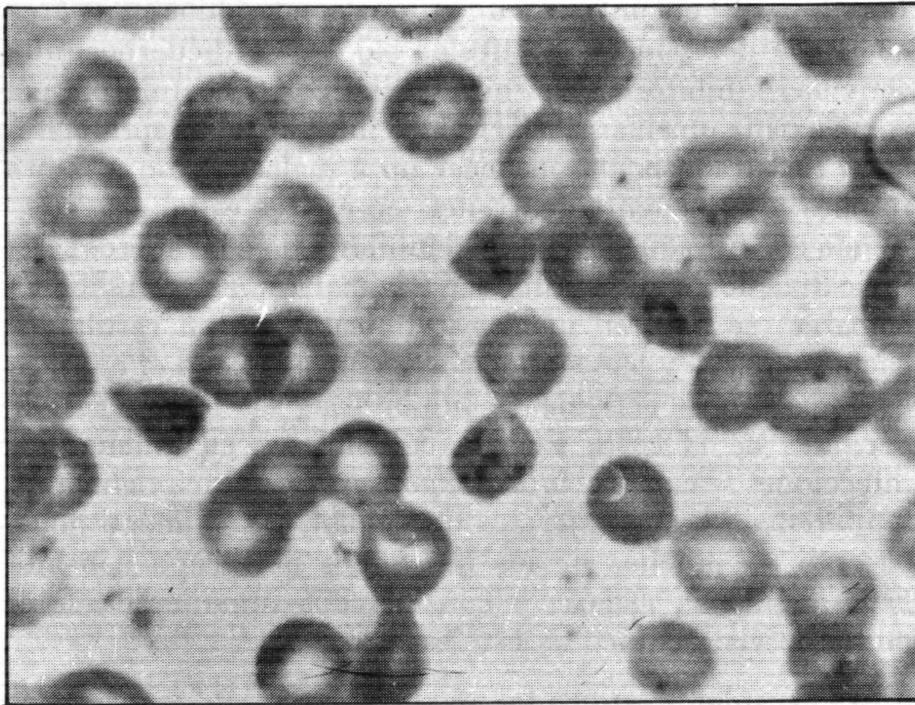


Figura 5. Esquizontes inhibidos, 40 horas.

de sueros inhibidores en el grupo B que en el grupo A. De los miembros del grupo A, 2.5% estuvieron dentro del nivel leve de inhibición mientras que del grupo B, 13.3% ocuparon esta categoría. Para los niveles moderado y severo la relación fue 5% del grupo A, frente a 13.3%, del grupo B.

La evaluación cualitativa mostró concordancia entre las alteraciones morfológicas del parásito y los niveles de inhibición medidos por la prueba metabólica (ilustraciones fotográficas).

Los sueros que presentaron inhibiciones del cultivo por encima de 60% tenían en la inmunofluorescencia títulos de anticuerpos similares a los que mostraba la fracción del precipitado, mientras que la porción del sobrenadante después de pasar por la cromatografía de afinidad no presentó títulos de anticuerpos anti-*P. falciparum* (Cuadro 1).

Las inhibiciones del cultivo de *P. falciparum* por estas fracciones, señalan inhibiciones severas por parte del sobrenadante, mientras que las inhibiciones presentadas por el precipitado caen dentro de los niveles normales de crecimiento del parásito (Cuadro 2).

**Cuadro 1**  
**Títulos de Anticuerpos Anti-*P. falciparum* de Algunos Sueros Antes y Después de la Precipitación con Sulfato de Amonio.**

Código	Suero total	Fraccionado	
		precipitado	sobrenadante
011	1:640	1:1280	0
016	1:640	1:640	0
022	1:320	1:640	0
033	1:2560	1:2560	0

**Cuadro 2**  
**Porcentaje de Inhibición in vitro Presentada por Algunos Sueros Antes y Después de la Precipitación con Sulfato de Amonio.**

Código	Suero total	Fraccionado	
		precipitado	sobrenadante
011	97	26	95.6
016	72	23.5	79.5
022	71	28.0	84.0
033	89	20.0	93.0

**Cuadro 3**  
**Asociación de los Diferentes Títulos de Anticuerpos con Parasitemia e Inhibición en Algunos Pacientes del Grupo A.**

% Inhibición	Títulos de Anticuerpos Específicos	Parasitemia X 10 <sup>3</sup> /μl
0	160	5.4
71	320	16.0
0	320	20.0
97	640	152.0
76	640	6.6
33	1280	7.2
21	1280	6.0
89	2560	2.9
0	2560	2.8
43	5120	1.7
0	5120	4.8
16	10240	3.3
0	10240	6.7

El Cuadro 3 muestra los resultados de algunos de los casos del grupo A. La no asociación entre el porcentaje de inhibición y los títulos de anticuerpos es evidente y muestra que, tanto individuos con títulos de anticuerpos bajos (1:160) como sujetos con títulos altos (1:10240) no ofrecían inhibiciones del parásito. De otro lado, personas con títulos moderados de 1:320 y títulos altos de 1:2560, presentaron inhibiciones marcadas de 71% y 89%, respectivamente.

Por último, aunque en el grupo de infectados no hubo correlación entre el grado de inhibición y la parasitemia, el enfermo que mostró el grado más severo de inhibición de este grupo paradójicamente presentó la parasitemia más alta del estudio. Las asociaciones entre las variables grado de inhibición y títulos de anticuerpos utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (coef correlación = -0.1917, p=0.2626) indica que ésta no es estadísticamente significativa. Asimismo, un coeficiente de correlación de 0.2852 y p= 0.0917 entre las variables inhibición y parasitemia muestra una correlación no significativa entre ellas.

## DISCUSION

En este estudio se demuestra la capacidad que poseen algunos sueros de individuos residentes en la costa pacífica colombiana para inducir el fenómeno denominado crisis en cultivos de *P. falciparum*. Los resultados obtenidos concuerdan con varios de los hallazgos de Jensen y col<sup>11, 12</sup> en Sudán e Indonesia en aspectos como: a) el fenómeno se puede demostrar con sueros de enfermos maláricos y no maláricos provenientes de áreas endémicas; b) no hay una correlación significativa entre la aparición del fenómeno y los títulos de anticuerpos antimaláricos; c) algunos sueros pueden presentar dos actividades, inhibición del crecimiento intraeritrocítico, anticuerpo independiente (crisis) y el bloqueo en la invasión al glóbulo rojo por parte de anticuerpos específicos; d) algunos sueros pueden tener un efecto estimulador de los cultivos y e) el factor responsable del fenómeno es no dializable y diferente de los anticuerpos.

El mayor porcentaje de sueros con capacidad inhibitoria correspondió al grupo de los obreros madereros, continuamente expuestos al bosque. Balderrama y Santander<sup>21</sup>, demostraron que el riesgo de infección malárica en este tipo de actividad, comparada con el riesgo de la misma a nivel intradomiciliar era 4.7 veces mayor. Estos individuos tenían títulos de anticuerpos entre bajos y moderados y en la historia clínica manifestaron no haber padecido nunca episodios maláricos o sólo raramente.

Estos hallazgos permiten sugerir el desarrollo de grados variables de inmunidad clínica a la malaria por *P. falciparum*, debidos a la presencia no sólo de anticuerpos específicos, sino quizás a factores solubles de tipo no anticuerpo con actividad antiparasítica, como lo sugiere la capacidad inhibitoria que estos sueros presentan al cultivo de *P. falciparum*.

Los pacientes infectados en el momento del estudio mostraban títulos de anticuerpos desde moderados hasta altos, con un porcentaje de sueros inhibidores menor que el de los individuos expuestos; sin embargo, en este grupo también hubo algunos sueros con capacidad inhibitoria marcada, lo cual refuerza la observación que el fenómeno de crisis es independiente por completo de los títulos de anticuerpos. Como los títulos de anticuerpos en este grupo fueron en general más altos que en el grupo de expuestos, se puede interpretar entonces que los niveles altos de anticuerpos son más un indicativo del contacto reciente o actual del individuo con el parásito que un índice de inmunidad clínica.

Además, como los títulos de anticuerpos en los grupos de parasitados y expuestos fueron significativamente menores a los descritos por Jensen y col<sup>11</sup>, los resultados obtenidos en esta población colombiana parecen indicar un tercer grupo con características intermedias entre los dos extremos descritos por ellos. Según sus resultados, en los enfermos de Indonesia que presentaban manifestaciones clínicas de malaria, títulos altos de anticuerpos contra el *Plasmodium* y actividad inhibitoria nula de los cultivos, la inmunidad sería exclusivamente mediada por anticuerpos, a nivel de la invasión de los merozoitos a los glóbulos rojos; mientras que en los pacientes de Sudán, con títulos bajos de anticuerpos y marcada actividad inhibitoria, la inmunidad sería mediada sobre todo por factores solubles celulares.

Jensen y col<sup>11</sup> encontraron un grupo de individuos en un área endémica del Sudán con títulos bajos de anticuerpos, alta actividad inhibitoria y síntomas maláricos, y postularon que como existía una marcada actividad inhibitoria, la sintomatología registrada podía obedecer no a malaria, sino a fiebre tifoidea, de frecuente ocurrencia en el área estudiada, sugiriendo con esto que la actividad inhibitoria en los sueros sería indicativa de no susceptibilidad a la malaria. Ese estudio, sin embargo, se basa en historias clínicas y no en resultados bacteriológicos y parasitológicos y contrasta con el hallazgo de importantes actividades inhibitorias en los sueros de personas de la costa pacífica colombiana, en quienes las infecciones se comprobaron por gota gruesa. Adicionalmente, a diferencia de los enfermos del Sudán, el fenómeno no se observó en muchos de los individuos del grupo con alta exposición a la malaria y considerados inmunes desde el punto de vista clínico en este estudio.

Entre los sujetos estudiados en el presente trabajo se encontraron individuos con alta actividad inhibitoria y parasitemias variables; más aún, el paciente con la más alta actividad inhibitoria del estudio (97%) mostró en forma paradójica la parasitemia más alta (152,000 parásitos/ $\mu$ l). Otros hombres, sin resultados tan espectaculares, presentaban infecciones maláricas importantes y por ende estuvieron en desacuerdo con lo propuesto por Jensen y col<sup>11</sup>. Estos resultados que se consideran como el aporte más importante del presente estudio, podrían obedecer a que durante la estimulación de la respuesta inmune por el parásito, se activen las células inmunocompetentes como los linfocitos T, los macrófagos o los neutrófilos, para elaborar factores inmunes no específicos como el "factor de crisis" que tendrían la capacidad de inhibir algunas poblaciones o clones de parásitos, que no necesariamente sean los que desencadenaron su producción.

Si esta hipótesis es valedera, es probable entonces que el "factor de crisis" que se determina *in vitro* con un aislado de parásito quizá distinto al que el enfermo portaba en su infección, logre inhibir el crecimiento intraeritrocítico de sólo algunos clones o de todos los que puedan estar presentes en el aislado de laboratorio, mientras que el efecto *in vivo* sobre sus parásitos sea distinto.

McBride y col<sup>22</sup> utilizando parásitos de distintas áreas geográficas del mundo, y Clavijo y col<sup>23</sup> en la costa pacífica colombiana demostraron ampliamente que en las infecciones causadas por *P. falciparum* se puede encontrar una mezcla de parásitos con gran diversidad a nivel de sus antígenos de superficie. Del mismo modo, Thaithong y col<sup>24</sup> han logrado comprobar esa diversidad no sólo a nivel de antígenos de superficie sino también a nivel de isoenzimas, resistencia a la cloroquina y a la pirimetamina. Adicionalmente, se podría pensar que así como durante la respuesta inmune humoral contra el *Plasmodium*, se produce una activación policlonal de los linfocitos B, que lleva a la producción de una cantidad abundante de anticuerpos contra variados componentes del huésped sin ninguna asociación aparente con la defensa contra el parásito, durante la respuesta de tipo celular se desencadena la producción de factores con efectos paradójicos como los descritos, que pudieran ser en ambos casos la traducción de mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte del parásito.

Para finalizar, es de importancia tener en cuenta que este es probablemente el primer informe sobre la determinación de la capacidad de inducción del fenómeno de crisis en personas del continente americano, el cual indica tener un comportamiento distinto al descrito para áreas maláricas endémicas de Africa y Asia.

### SUMMARY

The crisis phenomenon induced *in vitro* using sera of 80 patients from a malarious area of the Colombian Pacific Coast is described. Specific anti-*P. falciparum* blood forms antibodies were determined by an immunofluorescence assay and the intraerythrocytic development of the parasite quantified by the incorporation of Tritium labelled hypoxanthine. The crisis phenomenon was independent of the antimalarial antibodies and did not correlate with parasitemia of the patients.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su gratitud a la doctora Nancy Saravia del Centro Internacional de Investigaciones Médicas, CIDEIM, a la compañía AFOR Ltda, y al Instituto Nacional de Salud por la colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

### REFERENCIAS

- World Health Organization. Terminology of malaria eradication. Monograph series No. 13, 1963 Geneva.
- Miescher, P.A. & Mueller-Eberhard, H.J.: Immunopathology of parasitic diseases. Springer seminars in immunopathology, 1980, **2**: 359-371.
- Taylor, D.W. & Siddiqui, W.A.: Recent advances in malarial immunity. *Annu Rev Med*, 1982, **33**: 69-96.
- McBride, J.S., Walliker, D. & Morgan, G.: Antigenic diversity in the human malaria parasite. *P. falciparum*. *Science*, 1982, **217**: 254-257.
- Perrin, L.H., Ramírez, E., Lambert, P.H. & Miescher, P.A.: Inhibition of *P. falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. *Nature*, 1981, **289**: 301-303.
- Allison, A.C. & Clark, I.A.: Specific and non specific immunity to haemoprotozoa. *Am J Trop Med Hyg*, 1977, **26**: 216-222.
- Wanpen, Ch., Arunsti, Ch., Jintana, P. & Sornchai, L.: Effects of human natural killer (NK) cells on *Plasmodium falciparum* infected red cells. *Asian Pac J Allerg Immunol*, 1983, **1**: 135-139.
- Tubbs, H.: Endotoxin in human and murine malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1980, **74**: 121.
- Ferreira, A., Schofield, L., Enea, V. et al.: Gamma interferon inhibits the development of exoerythrocytic forms of malaria parasites. *Science*, 1986, **232**: 881-884.
- Ockenhouse, C.F., Spitalny, G. & Hannah, L.S.: Regulation of macrophage activation by gamma interferon in lethal and nonlethal malaria infections. Depart Med Mol Parasit New York University. Submitted.
- Jensen, J.B., Hoffman, S.L., Boland, M.T. et al.: Comparison of immunity to malaria in Sudan and Indonesia: crisis forms versus merozoite invasion inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 922-925.
- Jensen, J.B., Boland, M.T., Allan, J.S. et al.: Association between human serum-induced crisis forms in cultured *Plasmodium falciparum* and clinical immunity. *Infect Immun*, 1983, **41**: 1302-1311.
- Voller, A. & Bray, R.S.: Fluorescent antibody staining a measure of malarial antibody. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1962, **110**: 907.
- World Health Organization. Malaria. Eighth report of the experts committee. Technical Report Series No. 205, 1961. Geneva.
- Trager, W. & Jensen, J.B.: Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1976, **193**: 673-675.
- Jensen, J.B.: Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *P. falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1978, **27**: 1274-1276.
- Chulay J.D., Haynes, J.D. & Digg, C.L.: *Plasmodium falciparum*: Assessment of *in vitro* growth by (<sup>3</sup>H) hypoxanthine incorporation. *Exp Parasitol*, 1983, **55**: 138-146.
- Heide, K. & Schwick, H.G.: Salt fractionation of immunoglobulins. pp. 7.1-7.11 en Weir, D.M. *Handbook of experimental immunology*. Vol. 1, Oxford, London Blackwell Scientific Publication, 1978.
- Hudson, L. & Hay, F.C.: Practical immunology. Affinity chromatography. Pp. 203-225 en *Practical immunology* 2a. ed, Oxford, London, Blackwell Scientific Publication, 1981.
- Glantz, S.A.: *Primer of biostatistics*, New York, Mc Graw Hill Book, Co. 1981, 180-228.
- Balderrama, F. & Santander, A.: **Riesgo de infección extradomiciliar de la malaria en diferentes ámbitos ecológicos ocupacionales en Bajo Calima, Buenaventura.** Tesis de grado, Departamento de Medicina Social, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, 1985.
- McBride, J.S., Welsby, P.D. & Walliker, D.: Serotyping *Plasmodium falciparum* from acute human infections using monoclonal antibody. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984, **78**: 32-34.
- Clavijo, C., Herrera, M. de & Herrera, S.: Diversidad antigénica del *P. falciparum* en Colombia. IX Congreso Latinoamericano de Alergia e Inmunología, Bogotá, 1987.
- Thaithong, S., Beale, G.H., Fenton, B. et al.: Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984, **78**: 242-245.

UNIVERSIDAD DEL VALLE  
DEPTO. DE BIBLIOTECAS