

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS COLOMBIANAS DE PLASMODIUM FALCIPARUM

CARLOS ESPINAL T.,* EDITH MORENO,** PATRICIA GUERRA,** PATRICIA DE LA VEGA.***

Las cepas de *P. falciparum* necesarias para los estudios de vacunas antimaláricas requieren de una completa caracterización que incluye la historia clínica del paciente, el sitio de origen y de aislamiento de la infección, la adaptación al sistema de cultivo continuo, la sensibilidad a los antimaláricos, la presencia de nodulaciones (K⁺) en los eritrocitos infectados y la disponibilidad de las poblaciones originales de parásitos, además de su infectividad en primates del género *Aotus*.

Basados en estos criterios se aislaron y caracterizaron 8 cepas colombianas de *P. falciparum* obtenidas en cuatro de las principales áreas maláricas del país. Una de ellas, la cepa FCB-1, ha sido adaptada en *Aotus*, en el cual desarrolla infecciones de alta virulencia. Las cepas cloroquina-resistentes parecen crecer en mejor forma que las sensibles, durante la fase de adaptación al cultivo continuo, representando una de las hipótesis para la rápida dispersión de las poblaciones de parásitos resistentes a la cloroquina.

El cultivo continuo del *P. falciparum* ha permitido el avance de los estudios en inmunología y quimioterapia de la malaria, ya que es posible tener una fuente constante de parásitos para este tipo de investigaciones.

Con la disponibilidad de cepas de *P. falciparum* de diferentes áreas geográficas mantenidas por este sistema, la identificación de las proteínas del parásito que están involucradas en la inducción de una adecuada respuesta inmune, es un paso indispensable para la producción de una vacuna antimalárica de amplia cobertura. En la quimioterapia los estudios genéticos sobre la resistencia del *P. falciparum* a las

drogas, así como el desarrollo de nuevas técnicas de sensibilidad *in-vitro*, únicamente pueden ser realizados con cepas adaptadas al cultivo continuo y con diferentes grados de susceptibilidad a los antimaláricos.

Una cepa de *P. falciparum* ha sido definida tradicionalmente como una línea de parásitos establecida en cultivo continuo o en primates del género *Aotus*, en la cual se han determinado algunas de sus características de crecimiento *in-vitro*, grado de infectividad en *Aotus* y sensibilidad a algunas drogas. Durante el cultivo continuo los parásitos pueden tener alteraciones en su estructura y cambios en su sensibilidad a los antimaláricos. Ha sido comunicada la

* Médico, Jefe de la Unidad de Inmunología de Malaria, Grupo de Microbiología e Inmunología, Instituto Nacional de Salud, Apartado aéreo 80080, Bogotá.

** Bacteriólogas, Unidad de Inmunología de Malaria.

*** Bióloga, Unidad de Inmunología de Malaria.

pérdida de antígenos de superficie en las formas maduras de algunas cepas de *P. falciparum* (1, 2), así como también se ha informado el incremento de la resistencia de los parásitos a la cloroquina después de un tiempo prolongado en cultivo (3). Debido a estos cambios durante las fases de adaptación y mantenimiento del *P. falciparum* al sistema *in-vitro*, es esencial conocer la historia clínica de los pacientes de los cuales se efectuó el aislamiento, y/o disponer de muestras originales de parásitos obtenidos del paciente mismo o de los pases preliminares en cultivo o en primates.

Este artículo describe la caracterización de 8 cepas de *P. falciparum* aisladas en algunas de las principales zonas maláricas del país y establecidas en cultivo siguiendo el método de Trager y Jensen (4).

MATERIALES Y METODOS

Nomenclatura de las cepas

La nomenclatura seguida en la denominación de las cepas de *P. falciparum* aisladas en el Instituto Nacional de Salud está basada en la propuesta por Jensen y Trager (5), en la cual debe incluirse la especie del parásito, el país de origen y el sitio de adaptación al cultivo, además de un número que indique las secuencias de los aislamientos. En nuestro caso, las letras F (*P. falciparum*), C (Colombia), B (Bogotá) y los números 1, 2, etc., seguidos por la letra inicial del departamento de procedencia de la infección, identificarán las cepas aisladas en nuestro laboratorio.

Obtención y aislamiento de las cepas

Las 8 cepas fueron aisladas de pacientes con diagnóstico certero de infección por *P. falciparum*. Cuatro de ellas se aislaron de pacientes vistos en la Unidad de Inmunología de Malaria, a los cuales, luego de confirmar el diagnóstico de especie, se les hizo una determinación de parásitos por microlitro de sangre. Posteriormente y antes de iniciar el tratamiento indicado según la severidad de la infección (6), se tomaron de 10 a 15 cc de sangre en EDTA y con 1-2 cc se realizaron las pruebas de susceptibilidad *in-vitro* a los

antimaláricos y se colocaron los parásitos en cultivo. El resto de la sangre infectada fue dividida en alíquotas y congelada por el método modificado de Rowe (7), conservándose así la población original de parásitos. Los pacientes fueron seguidos diariamente mediante un examen de gota gruesa y extendido de sangre periférica por un período máximo de 30 días, con el fin de determinar la respuesta *in-vivo* a los tratamientos administrados. Las otras cuatro cepas fueron remitidas a Bogotá a temperatura ambiente. La sangre infectada de un paciente proveniente de Tarazá, Antioquia, fue enviada al laboratorio de la Unidad de Inmunología de Malaria por el Dr. Alberto Restrepo del Hospital San Vicente de Paul de Medellín. Tres muestras del Valle del Cauca, obtenidas de pacientes provenientes de Juanchaco, Mojarra y Buenaventura, fueron enviadas por el Dr. Guillermo Sarmiento, Jefe del Servicio de Erradicación de la Malaria en Cali. Una vez recibidas las muestras de sangre, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para las infecciones obtenidas en el laboratorio.

Para el establecimiento de los parásitos en el sistema de cultivo se determinó el grupo sanguíneo, el factor Rh y el porcentaje de parasitemia de las sangres infectadas y de los pacientes observados en el laboratorio. El plasma se retiró después de una centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. Luego de dos lavados con medio RPMI-1640 y bicarbonato de sodio al 5%, se procedió a hacer la dilución de la sangre infectada mediante la adición de glóbulos rojos normales compatibles con los del paciente. Estos eritrocitos normales estaban suspendidos en medio de cultivo compuesto de RPMI-1640, Hepes como tampón además de bicarbonato de sodio al 5%, 50Ug/ml de sulfato de gentamicina y 15% de suero humano normal compatible con los glóbulos rojos en cultivo. Posteriormente, los parásitos fueron colocados en cajas de petri de 35 mm e incubados a 37-38°C en un ambiente de 3-5% de CO₂, de acuerdo con la descripción original de la técnica de Trager y Jensen (4). Cada 24 horas se hizo cambio del medio de cultivo y cada 72 o 96 horas, después de determinar la parasitemia, se diluyeron los glóbulos rojos infectados con eritrocitos

normales. La concentración de suero humano normal se redujo a un 10% luego del primer mes de cultivo, cuando los parásitos crecieron con regularidad en el sistema *in-vitro*.

Se realizó congelación periódica de la sangre infectada durante la etapa inicial del cultivo, considerándose, en forma conjunta con los parásitos derivados del paciente, como la población original de la cepa de *P. falciparum*. Durante la fase de adaptación se prestó especial atención a la capacidad de las cepas para producir gametocitos, con el fin de seleccionar posteriormente los parásitos con mayor gametocitogénesis.

Susceptibilidad in-vitro a los antimaláricos

La respuesta de las cepas a la cloroquina fue establecida mediante la microtécnica descrita por Rieckmann y col (8). Brevemente, microplacas de fondo plano (Microtest II), fueron predosificadas con concentraciones crecientes de difosfato de cloroquina desde 1 hasta 64 pmoles de la droga. Cinco microlitros de sangre infectada fueron colocados en cada una de las concentraciones de la droga y en los controles sin cloroquina; posteriormente se adicionaron 50 microlitros del medio de cultivo (sin suero humano normal), a los mismos orificios de la microplaca. Luego de una ligera agitación, la microplaca fue colocada en un desecador de vidrio con una vela encendida para darle el ambiente necesario de CO₂ y oxígeno y se llevó a incubación por 24-38 horas, a 37-38°C.

Al concluir el período de incubación se hicieron gotas gruesas y se determinó el número de esquizontes (parásitos maduros) en los controles sin droga y en cada una de las concentraciones de la cloroquina. El recuento de esquizontes se hizo contra 300 leucocitos, o preferencialmente contra 200 parásitos. La susceptibilidad al sulfato de quinina se determinó mediante la misma técnica adaptada en nuestro laboratorio para este medicamento. Concentraciones crecientes de quinina desde 1 hasta 100 pmoles fueron colocados en los orificios de las microplacas, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para la cloroquina.

Microscopía Electrónica

Los estudios de microscopía electrónica realizados con el fin de determinar la presencia o ausencia de nodulaciones en la membrana de los glóbulos rojos infectados, han sido parcialmente desarrollados. Para la cepa FCB-1, el análisis fue realizado por la doctora Susan Langreth del Uniformed Services University of the Health Sciences, U.S.A. Siete cepas están en proceso de estudio en el Instituto Nacional de Salud.

RESULTADOS

La distribución geográfica de las cepas de *P. falciparum* establecidas en cultivo, está representada en la Fig. No. 1, incluyendo así 4 de las principales áreas maláricas del país con distintas características geográficas.

Los pacientes donantes de las 4 cepas obtenidas en Bogotá, FCB-1, FCB-2 y 3M y FCB-5V, tenían cuadros clínicos diferentes, y su tratamiento fue establecido de acuerdo a la severidad de la infección (Fig. No. 2). La cepa FCB-1, proveniente del Caquetá, fue obtenida del paciente identificado con la historia clínica No. 195, el cual tenía una infección aguda con un recuento de parásitos de 50.000 por microlitro de sangre, cuando se tomó la muestra para su establecimiento en cultivo. La infección respondió bien al tratamiento con sulfadoxina-pirimetamina. Posteriormente, el paciente regresó con otro tipo de infección, clasificada como una reinfección en período crónico debido al bajo recuento de parásitos y a la presencia de gametocitos en sangre periférica. Esta reinfección cedió nuevamente a la combinación de sulfadoxina-pirimetamina, permaneciendo negativo por 30 días.

Las infecciones de los pacientes H-200 y 203, donantes de las cepas FCB-2 y 3M provenían del Departamento del Meta y de los Municipios de San Martín y Vista Hermosa, respectivamente. Estas eran infecciones agudas, con alto recuento de parásitos y con algunas complicaciones clínicas, especialmente en el paciente H-200, quien presentó una insuficiencia renal aguda. Este cuadro cedió con el tratamiento con dicloro-

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS COLOMBIANAS....



Fig. No. 1. Distribución geográfica de las cepas de *P. falciparum*. Unidad Inmunología de Malaria, I. N. S.

hidrato de quinina I.V. y sulfadoxina-pirimetamina, además de una adecuada hidratación y medidas de soporte.

La infección de la paciente H-203 se trató inicialmente con cloroquina parenteral (I.M.), 200 mg cada 6 horas por 1 día, debido a la no disponibilidad de camas para hospitalización, impidiendo el tratamiento con el diclorohidrato de quinina. La infección cedió dramáticamente a la medicación elegida, mostrando una gran sensibilidad *in-vivo* a la cloroquina, la cual fue corroborada mediante las pruebas *in-vitro*, 28 horas después de iniciado el tratamiento (Cuadro No. 1). La gametocitemia, como es lo normal en el curso de una infección aguda, apareció en ambos casos durante la segunda semana de infección.

CUADRO Nº 1
CEPAS DE *P. falciparum* AISLADAS EN COLOMBIA

CEPAS	ORIGEN	FECHA DE OBTENCIÓN	SUSCEPTIBILIDAD IN-VITRO A DROGAS (pmol / 5 ul DE SANGRE)		
			CLOROQUINA		QUININA
FCB-1	RIONEGRO (CAQUETA)	II - 23 - 80	20	R*	70 S**
FCB-2M	SAN MARTIN (META)	V - 20 - 80	32	R	60 S
FCB-3M	VISTA HERMOSA (META)	IX - 2 - 80	2	S	60 S
FCB-4A	TARAZA (ANTIOQUIA)	X - 3 - 80	32	R	50 S
FCB-5V	JUANCHACO (VALLE DEL CAUCA)	V - 4 - 80	16	R	50 S
FCB-6V	JUANCHACO (VALLE DEL CAUCA)	IX - 1 - 80	16	R	30 S
FCB-7V	MOJARRA (VALLE DEL CAUCA)	IX - 1 - 80	40	R	70 S
FCB-8V	B/VENTURA (VALLE DEL CAUCA)	IX - 1 - 80	1	S	N.D.***

* R. Resistente en la microtécnica
** S. Sensible en la microtécnica
*** N.D. No determinada.

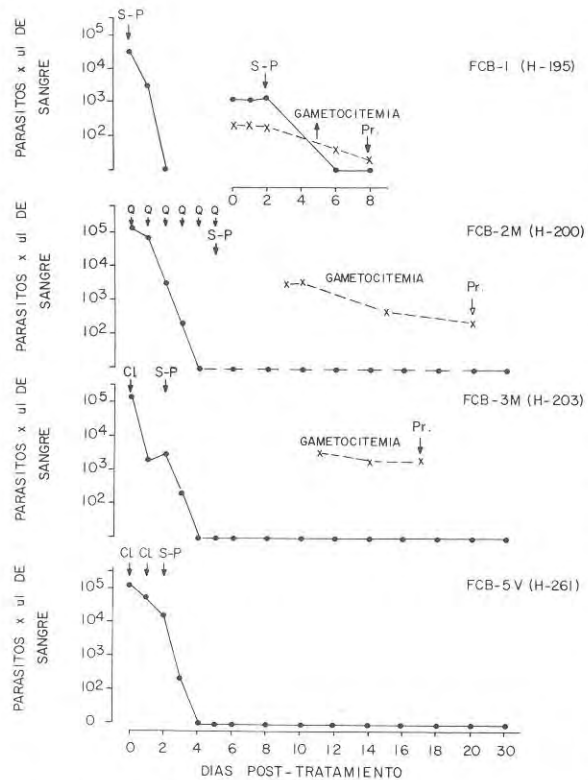


Fig. No 2. Evolución post tratamiento en los pacientes donantes de las cepas FCB-1, 2, 3 y 5 de *P. falciparum*

S-P: Tx con Sulfadoxina, 1.500 mg - Pirimetamina 75 mg
Pr: Tx con Primaquina 45 mg
Q: Tx con Diclorohidrato de Quinina, 10 mg/kg cada 8 horas, IV
CL: Tx con Cloroquina, 200 mg cada 6 horas, I.M.

La cepa FCB-5V, proveniente del área de Juanchaco, Valle, fue aislada de la paciente H261 la cual tenía una infección aguda, con alto recuento de parásitos pero sin manifestaciones importantes diferentes a la fiebre, malestar general y escalofríos. Tratada con 200 mg de cloroquina I.M. cada 6 horas, la parasitemia no presentó un descenso rápido, ya que aún en el tercer día de tratamiento tenía un recuento de 22.000 parásitos por microlitro de sangre. Por este motivo y en vista de la aparición de ictericia en piel y mucosas y del descenso en su hematocrito, se cambió su medicación inicial por la asociación de sulfadoxina-pirimetamina, respondiendo bien tanto clínica como parasitológicamente. Las pruebas *in-vitro* mostraron una resistencia a la cloroquina de grado moderado (Cuadro No. 1).

Susceptibilidad a los antimaláricos

La sensibilidad *in-vivo* de las cepas FCB-1, 2, 3 y 5 a los tratamientos establecidos durante el curso de la infección puede observarse en la Figura No. 2, siendo las 4 infecciones sensibles a la combinación sulfadoxina-pirimetamina, asociada a la quinina en la FCB-2M, y a la cloroquina en la FCB-3M.

El *P. falciparum* es sensible *in-vitro* cuando se inhibe su maduración entre 1 y 6 pmoles de cloroquina. La microtécnica demostró un grado variable de resistencia en 6 de las 8 cepas evaluadas y únicamente 2, provenientes una de Vista Hermosa, Meta y otra de Buenaventura, Valle, mostraron una gran sensibilidad a la droga (Cuadro No. 1).

La respuesta a la quinina también fue variable en las cepas de diferentes áreas geográficas, e incluso entre las de una misma región como es el caso de las infecciones aisladas en el Valle del Cauca; sin embargo, todas fueron sensibles a la droga *in-vitro*. (Cuadro No. 1).

Adaptación de las cepas al sistema de cultivo continuo

El crecimiento del *P. falciparum* en cultivo parece estar directamente relacionado con la resistencia a los antimaláricos. Durante la fase de adaptación de las cepas al sistema del cultivo continuo se observó un mejor crecimiento de las cepas resistentes (Fig. No. 3); las parasitemias fueron más elevadas en los primeros 30 días de crecimiento, pero una vez adaptadas al cultivo, la multiplicación *in-vitro* fue similar en las sensibles y en las resistentes a la cloroquina (Figs. Nos. 4 y 5). Se observó gametocitogénesis en todas las cepas en tiempos diferentes durante la fase de adaptación y aún en la fase de

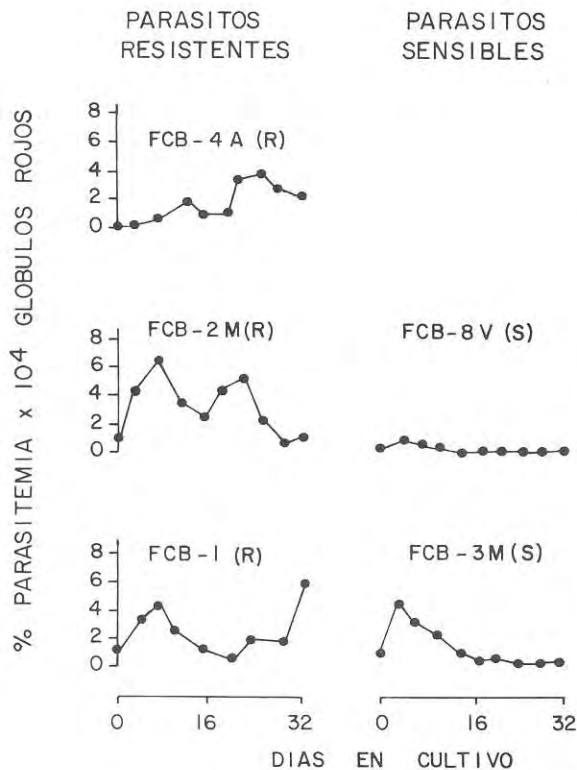


Fig. No. 3. Crecimiento *in-vitro* de parásitos de *P. falciparum* sensibles y resistentes a la cloroquina.

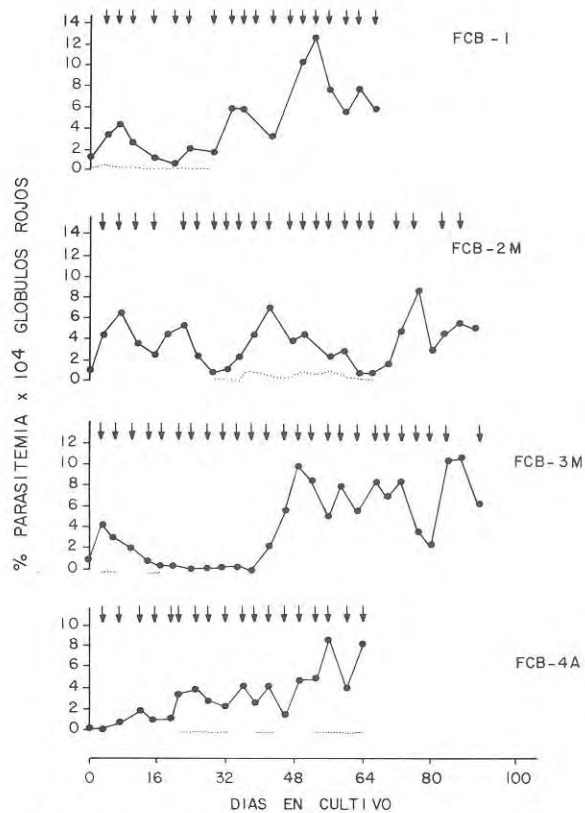


Fig. No. 4. Crecimiento de varias cepas de *P. falciparum* en cultivo continuo.
 ↓ Adición de glóbulos rojos.
 Gametocitemia

mantenimiento, con una buena maduración de los gametocitos en cultivo.

Estudios de Microscopía Electrónica

Los eritrocitos infectados con parásitos maduros de la cepa FCB-1 mostraron nodulaciones de superficie (knobs), que permiten clasificar la cepa como K⁺ (Microfotografías 1 y 2).

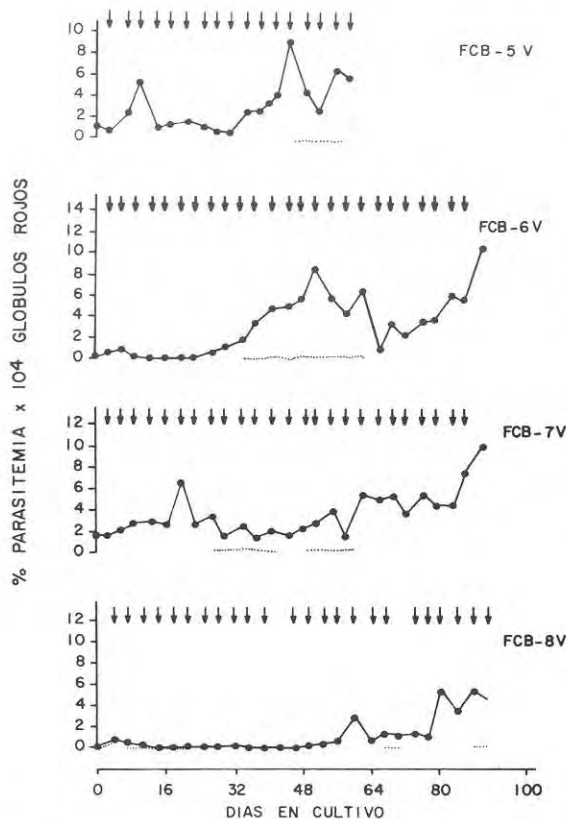


Fig. Nº 5. Crecimiento de varias cepas de *P. falciparum* en cultivo continuo

↓ Adición de glóbulos rojos
..... Gametocitemia

DISCUSION

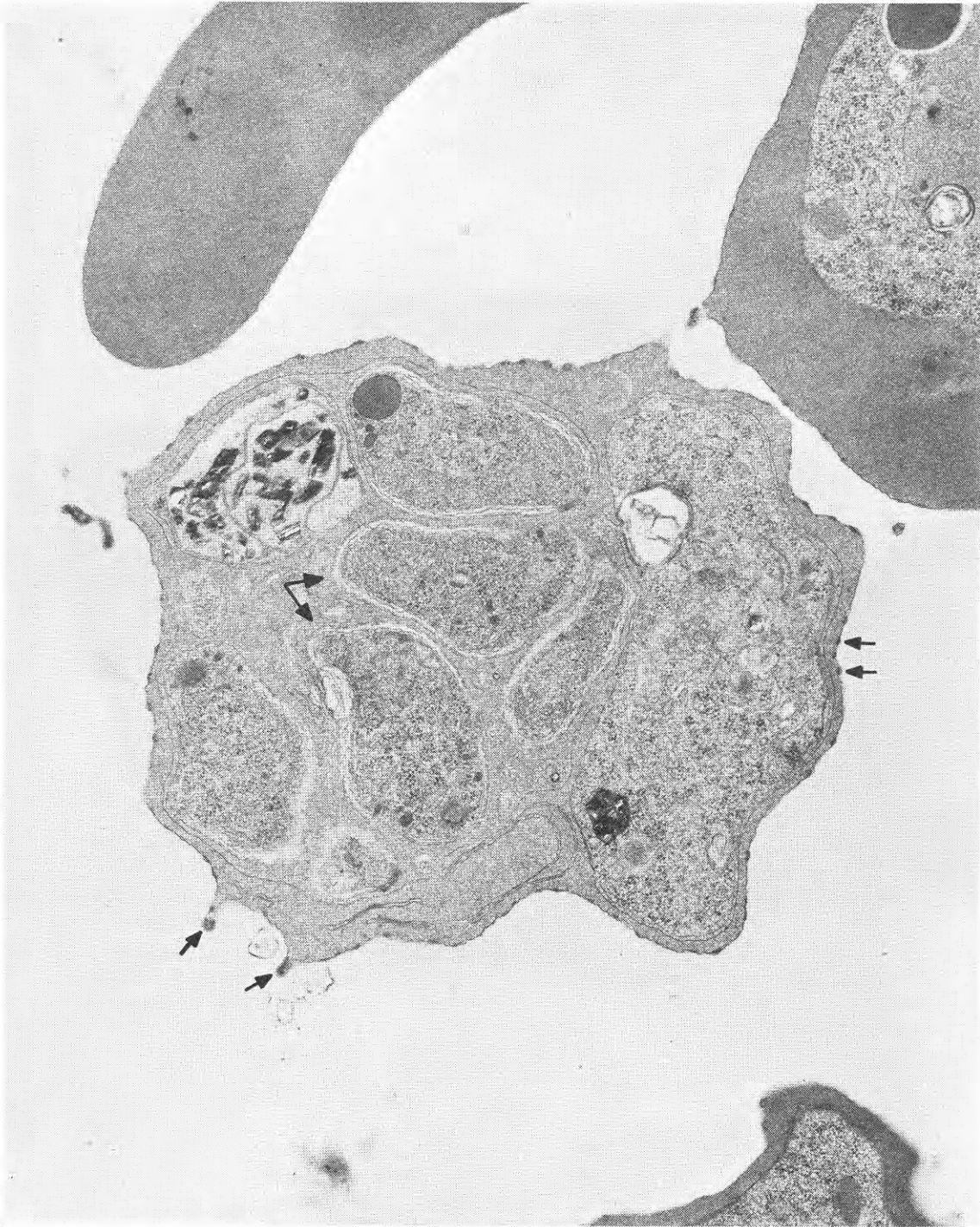
La investigación en malaria ha sido desarrollada principalmente con cepas de *P. falciparum* obtenidas en Africa y en el Asia. Estas líneas de parásitos fueron adaptadas y



mantenidas en primates del género *Aotus* antes de ser establecidas en el sistema de cultivo continuo y han sido ampliamente distribuidas a los laboratorios de investigación, sin conservarse la población original de los parásitos.

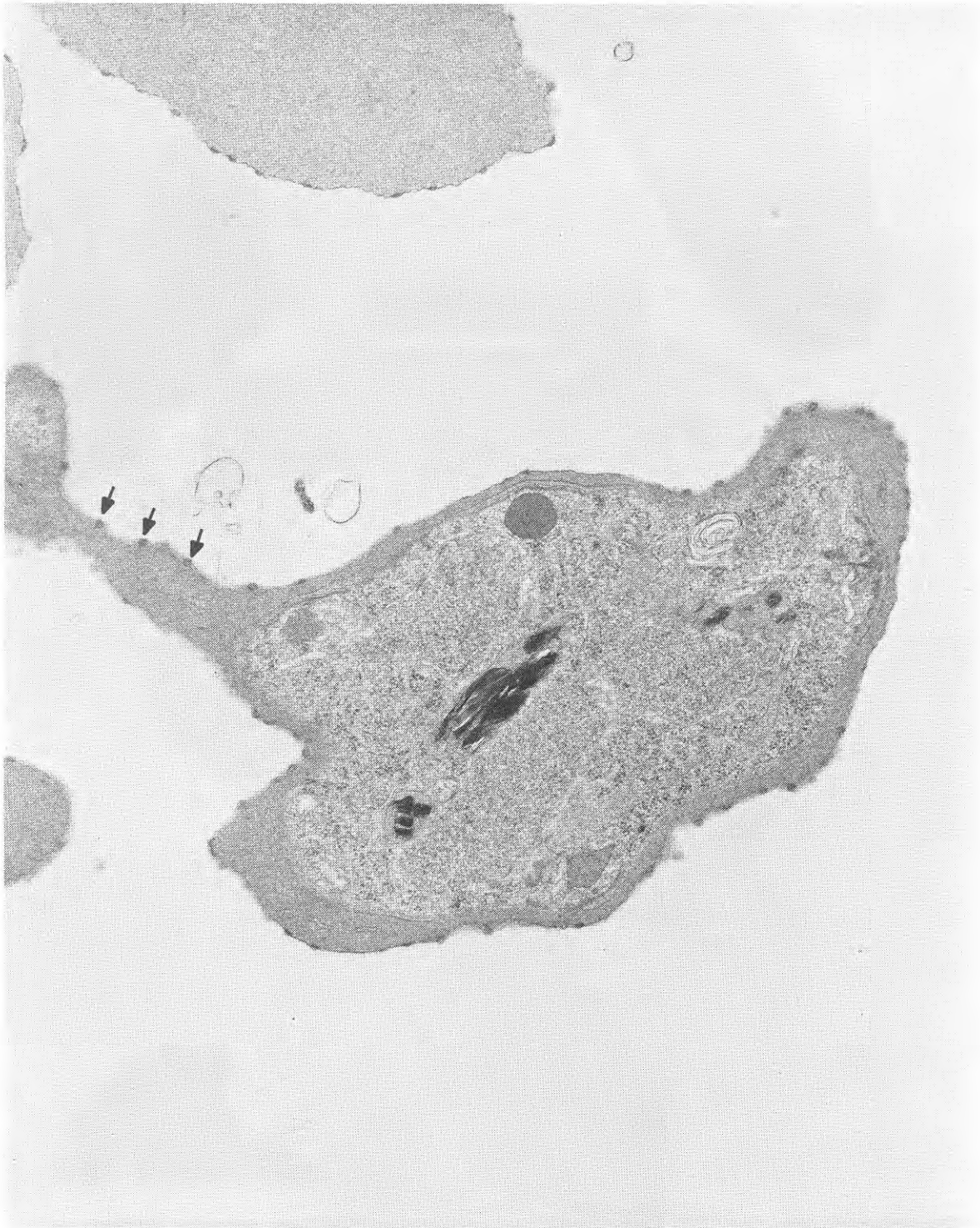
La necesidad de establecer nuevas cepas con una historia conocida tanto sobre el paciente donante como sobre su adaptación *in-vitro* y en *Aotus*, representa un objetivo prioritario en la red de laboratorios que realizan investigaciones sobre inmunología de la malaria. Únicamente 5 cepas de *P. falciparum* de diferentes áreas geográficas del mundo incluyendo la FCB-1 de Colombia, han sido seleccionadas como las cepas de referencia, debido a las características anteriormente señaladas (9). La FCB-1, además de su historia en cultivo, sensibilidad a los antimaláricos y presencia de prominencias (K⁺) en la superficie de los eritrocitos infectados, tiene un alto grado de virulencia y desarrolla elevadas parasitemias en los *Aotus* (10), criterios necesarios para su utilización en las pruebas de protección.

La reducida sensibilidad de las 8 cepas colombianas a la cloroquina, revela la amplia distribución de este fenómeno y corrobora los estudios *in-vivo* e *in-vitro* realizados en Colombia (11,12). La respuesta *in-vitro* a la quinina es adecuada aunque aún es necesario definir los grados de resistencia en la microtécnica. La concentración inhibitoria de la maduración de los parásitos está directamente relacionada con la dosis de 7-10 mg/kg empleada para el tratamiento de la infección aguda por *P. falciparum*. Hasta el presente ninguna de las infecciones evaluadas para su sensibilidad a la quinina *in-vitro* ha mostrado valores en picomoles que superen la concentración requerida *in-vivo* para el tratamiento de la infección.

El hecho de que aparentemente las cepas resistentes tienen un mejor crecimiento en cultivo durante la fase de adaptación puede tener un importante significado, dada la rápida y amplia distribución de las cepas resistentes en nuestro país. Es posible que en una infección de un paciente que tenga



Microfotografía No. 1.  Nodulaciones (K⁺) en la superficie de un eritrocito infectado con las formas segmentarias del *P. falciparum*, cepa FCB-1 (x 30.000).
 Merozoitos intracelulares.



Microfotografía No. 2. —> Nodulaciones (K⁺) en la superficie de un eritrocito infectado con un esquizonte joven de *P. falciparum*, cepa FCB-1 (x 30.000).

poblaciones sensibles y resistentes de parásitos, el crecimiento *in-vivo* de los resistentes sea superior y elimine los parásitos sensibles.

Ha sido demostrado que existen poblaciones de parásitos sensibles y resistentes a la droga en una misma infección, ya que tanto en nuestro laboratorio como en otros sitios, algunas cepas han disminuído su grado de sensibilidad o se han vuelto resistentes después de un tiempo de cultivo prolongado (3). Debido a estos cambios en la susceptibilidad a las drogas y a la desaparición de antígenos de superficie durante el mantenimiento *in-vitro*, es necesario efectuar congelaciones periódicas de las cepas, reduciendo el tiempo de cultivo continuo a 4-6 meses, con controles frecuentes de la formación de nodulaciones y de sensibilidad a los antimaláricos.

Dos de las 8 cepas con gametocitogénesis espontánea, la FCB-2M y la FCB-8V, han demostrado una gran producción de gametocitos siguiendo varias de las técnicas descritas para el desarrollo de estas formas en cultivo (13). Este es un paso indispensable para una continua producción de esporozoitos de *P. falciparum* en el laboratorio. Mediante los métodos de alimentación artificial a través de membranas, es posible infectar los mosquitos del género *Anopheles* con el cultivo que contiene las formas sexuales maduras del parásito (4), reduciendo el número de primates infectados que son necesarios para el desarrollo del ciclo esporogónico del *Plasmodium*.

Las cepas de *P. falciparum* obtenidas en distintas regiones de Colombia, pueden representar el patrón de referencia necesario para el análisis comparativo del comportamiento del *P. falciparum* en diferentes áreas maláricas.

SUMMARY

The selection of strains of *P. falciparum* which are to be used in antigenic analysis and immunization studies, requires a complete characterization that includes the following criteria: The clinical history of the patient

and the history of the isolate, the adaptability in culture, the spectrum of drug sensitivity, the normal morphology including knobs formation (K-), the availability of samples of original infected blood and the adaptability in *Aotus* monkeys.

On this basis eight isolates of *P. falciparum* from Colombia have been partially characterized. To date, one strain, the FCB-1, fulfills most of the above criteria and is well adapted to intact *Aotus* monkeys, producing very virulent infections.

Chloroquine-resistant strains appear to develop higher parasitemias during the adaptation to continuous culture. This may be an important fact due to the rapid spread of population of parasites resistant to chloroquine.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a la Doctora Susan Langreth del Uniformed Services University of the Health Sciences, U.S.A., por su trabajo en microscopía electrónica de la cepa FCB-1. Asimismo, agradecemos al personal técnico de la Unidad de Inmunología de Malaria por su cooperación en el desarrollo de este trabajo y a las señoritas Angela Quintero y Elizabeth Rojas R. por su colaboración en la preparación de este manuscrito.

Este trabajo ha sido realizado con fondos del subcontrato AID/DSP-E-D-0036 con la Universidad de New Mexico, U.S.A. y el Instituto Nacional de Salud, Bogotá.

BIBLIOGRAFIA

1. Langreth S et al. *Plasmodium falciparum*: Loss of knobs on the infected erythrocyte surface after long-term cultivation. *Exp. Parasitol.*, 1979, 48, 213.
2. Langreth S, Reese R. Antigenicity of the infected-erythrocyte and merozoite surface in *falciparum* malaria. *J. Exp. Med.*, 1979, 150, 1241.
3. Jensen J B, Capps TC, Carlin J. Clinical drug-resistant *falciparum* malaria acquired from cultured parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 30, 523.

CARLOS ESPINAL T. EDITH MORENO. PATRICIA GUERRA. PATRICIA DE LA VEGA

4. Trager W, Jensen J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Sciences*, 1976, 139, 673.
5. Jensen J.B, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture: Establishment of additional strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 1978, 27(4), 743.
6. Espinal C A. Drogas antimaláricas. Serie de Notas Técnicas, Instituto Nacional de Salud 1982, No. 7.
7. Rowe A W et al. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. A low glycerol-rapid freeze procedure. *Cryobiology*, 1968, 5, 119.
8. Rieckman K H et al. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An in-vitro, Microtechnique. *Lancet*, 1978, January 7,22.
9. US/AID Research Network on Malaria Vaccine. Guidelines for experimental Malaria vaccine trials in *Aotus* monkeys. Washington, D.C. November, 1981.
10. Espinal C A, Moreno E, de la Vega P, Guerra P Umaña J. Adaptation of a Colombian strain of *Plasmodium falciparum* (FCB-1) to continuous culture and *Aotus* monkeys. En preparación.
11. Restrepo A, Alvarez L, Restrepo M. Estudio in-vivo de la resistencia del *P. falciparum* a la cloroquina en Colombia. Descripción de la resistencia R III. *Acta Médica Colombia*, 1980, 5(2), 367.
12. Espinal C A, Uribe L M, Estava A, Rodríguez M E. Resistencia del *Plasmodium falciparum* a la combinación sulfa-pirimetamina. Descripción de los tres primeros casos en Colombia. *Biomédica*, 1981, 1(4), 213.
13. Ponnudural J H et al. The production on mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1982, 76 (2), 242.
14. ——— ——— Mosquito transmission of cultured *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*, 1982, 76 (2), 278.