

Malaria mixta: revisión general

Jaime Carmona-Fonseca*
Eliana Arango**

*MD. MSc en Epidemiología. MSc en Microbiología Médica. Profesor titular. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín. Antioquia. Colombia.

**Microbióloga-Bioanalista. MSc en Ciencias Básicas Biomédicas. Profesora de cátedra. Universidad de Antioquia. Estudiante de doctorado en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia. Medellín. Antioquia. Colombia.

Correspondencia: Dr. Carmona-Fonseca. Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahita. Universidad de Antioquia. Carrera 51D No 62-29, piso 3. Medellín. Colombia. Teléfono: [+57] 2196025. e-mail: jaimecarmonaf@hotmail.com.

RESUMEN

Introducción: los aspectos clínico-epidemiológicos de la infección plasmodial mixta y la malaria mixta se conocen poco; en América es casi nula la información. **Objetivo:** revisar y resumir la información sobre infección plasmodial y malaria mixta. **Metodología:** búsqueda de información en Pubmed y Lilacs con diferentes expresiones. **Resultados y conclusiones:** la información específica recuperada fue escasa, dispersa y difícil de hallar. La infección plasmodial y malaria mixta con frecuencia variable pero relativamente alta, se subestima al usar microscopía de luz. Es frecuente la aparición de una especie plasmodial luego del tratamiento exitoso de la infección por otra especie. Las coinfecciones plasmodiales son mutuamente supresivas, con *P. falciparum* dominando a *P. vivax* y este atenuando la gravedad de la infección por *P. falciparum*. El cuadro clínico y la parasitemia de cada especie en la infección plasmodial y malaria mixta no están suficientemente estudiados y su comportamiento epidemiológico es muy variable en función de la intensidad y la estabilidad de la transmisión, la influencia de los ciclos de lluvia, la edad de las personas y la fauna anofelina. No hay bases suficientes para orientar el tratamiento de la infección plasmodial y malaria mixta, pero se sugiere que debe darse tratamiento simultáneo para las diferentes especies. (MÉD.UIS. 2012;25(1):45-54)

Palabras clave: Malaria. Malaria mixta. Plasmodium. Diagnóstico. Inmunología. Epidemiología. Síntomas.

ABSTRACT

Mixed malaria: overview

Background: clinical and epidemiological aspects of mixed plasmodial infection and mixed malaria are poorly understood; in America this information is almost absent. **Objective:** review information about mixed plasmodial infection and mixed malaria and collect and organize Colombian data. **Methodology:** different expressions were used to find information in PubMed and Lilacs. **Results and conclusions:** information retrieved was little, dispersed and difficult to find. Mixed plasmodial infection and mixed malaria frequency is variable and relatively high but is underestimated by microscopy. New plasmodial species often is detected after successful treatment of other species. Plasmodial coinfections are mutually suppressive; *P. falciparum* dominating on *P. vivax* and *P. vivax* attenuating severity of *P. falciparum*. Clinical and parasitemia of each species in mixed plasmodial infection and mixed malaria are not sufficiently studied; its epidemiological behavior is very variable and depends on transmission intensity and stability, rain cycles, age of patients and anopheline fauna. There is insufficient basis to guide the mixed plasmodial infection and mixed malaria treatment, but it is suggested a simultaneous treatment of the different species. (MÉD.UIS. 2012;25(1):45-54)

Key words: Malaria. Mixed malaria. Plasmodium. Diagnosis. Immunology. Epidemiology. Symptoms.

INTRODUCCIÓN

La Infección Plasmodial Mixta (IPMx) humana es aquella debida a dos o más especies diferentes de *Plasmodium*. Además, si existen síntomas de tipo palúdico, corresponde a Malaria Mixta (MMx). La IPMx/MMx ocurre en muchos sitios de Asia, África y América¹, afecta el resultado clínico, modifica la dinámica intrahospedero de los plasmodios infectantes²⁻³ y altera la potencial transmisión

desde los hospederos humanos⁴. Por todo esto, las interacciones plasmodiales condicionan la epidemiología del paludismo⁵. Las interacciones entre especies, la estacionalidad y la intensidad de transmisión maláricas, afectan la variación epidemiológica y clínica de la IPMx/MMx⁶.

Existen problemas con el diagnóstico de IPMx porque: a) es difícil detectarla cuando la parasitemia por una especie es fuertemente superior a la de las

otras, situación que es predominante⁷; b) no son claros y precisos los criterios para decir cuándo hay IPMx al usar Gota Gruesa (GG), que es la prueba diagnóstica usualmente empleada en Colombia⁸⁻¹⁰.

La clínica, el tratamiento, la inmunología, la epidemiología y otros aspectos de la IPMx/MMx son poco conocidos y difundidos. Esto debido a que relativamente la escasa frecuencia de ellas se pierde en la elevada magnitud de las infecciones por especie única.

El objetivo de esta revisión fue recopilar, analizar y resumir información sobre IPMx relacionada con la inmunidad; la dinámica de la infección plasmodial; la parasitemia presente; la frecuencia observada de IPMx; la frecuencia esperada vs. frecuencia observada de IPMx y la clínica de la IPMx.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este escrito no es una revisión sistemática en sentido técnico, sino una revisión amplia sobre IMPx/MMx, ejecutada buscando información para procurar alcanzar los temas incluidos en el objetivo de la investigación.

Una búsqueda en Pubmed (15 junio 2011) introduciendo “mixed malaria” reveló más de 900 artículos, de los cuales más de 850 se referían al tema únicamente porque en alguna parte mencionaban la expresión “mixed malaria”; 47 de esos artículos fueron revisiones (entre 1980 y septiembre 2010), pero únicamente ocho trataban específicamente el problema de MMx, pues las demás apenas mencionaban la expresión referida. Esas ocho revisiones junto con varias decenas de artículos hallados en diferentes fuentes, especialmente en Pubmed, usando muchos procedimientos de búsqueda, no sistemática, constituyen el soporte de este escrito.

RESULTADOS

PROBLEMAS CON EL DIAGNÓSTICO DE IPMx/MMx

El diagnóstico de IPMx se hace identificando en la muestra de sangre la presencia simultánea de formas parasitarias eritrocíticas asexuales o sexuales de dos o más especies de *Plasmodium*. La morfología de las formas eritrocíticas asexuales como anillos o trofozoítos jóvenes, trofozoítos maduros, esquizontes y sexuales como gametocitos

de las cinco especies de *Plasmodium* que parasitan al humano es muy diferente en el extendido delgado pero no en la GG. Sin embargo, en muchos sitios el diagnóstico rutinario se hace con GG, ya que es 20-30 veces más sensible que el extendido delgado^{7,11}. Es pertinente preguntar cuánta será la influencia del método diagnóstico rutinario (GG) en el subregistro de la IPMx. Los documentos OPS-OMS de 1988 y 2010 para diagnóstico de malaria no mencionan el diagnóstico de la IPMx/MMx^{7,12}.

DINÁMICA DE LA INFECCIÓN PLASMODIAL

Para interpretar las IPMx deben considerarse las características básicas de la infección por cada especie en forma separada. En la mayoría de las zonas de endemicidad mixta, *P. vivax* tiene mayor incidencia de infección que *P. falciparum*^{13,14}. Las especies de *Plasmodium* muestran preferencias por la población de células objetivo. Durante la replicación asexual en eritrocitos, los plasmodios que afectan al humano producen cantidad variable de merozoítos por cada eritrocito infectado. El patrón de la fiebre y la duración del ciclo de desarrollo en eritrocitos varían de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* hasta 72 horas para *P. malariae*¹⁵.

La densidad de parásitos que provoca fiebre (>37,3 °C)¹⁶, llamada densidad pirogénica, varía considerablemente de una especie a otra¹⁶⁻¹⁷. Mientras que los valores cambian entre entornos endémicos, rangos de edad (la densidad pirogénica disminuye al aumentar la edad) y nivel de exposición a la malaria¹⁸⁻²¹, un hallazgo consistente es que la densidad pirogénica de *P. falciparum* es al menos 10 veces superior a la de *P. vivax*^{16,20}. La fiebre ha sido fuertemente asociada con la muerte del parásito en individuos no inmunes¹⁷ y juega un papel importante en la regulación de los niveles de la parasitemia en personas infectadas²². Curiosamente, se ha sugerido que la asociación entre la fiebre y el cambio en la parasitemia puede no ser tan fuerte en los individuos inmunes²³.

MOSQUITO ANOPHELES E IPMx

Al menos siete especies de mosquito *Anopheles*, capturados en condiciones de campo, han demostrado que portan varias especies de *Plasmodium* de los humanos²⁴: *P. falciparum* y *P. vivax* en *Anopheles dirus*²⁵, *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* en *Anopheles maculatus*²⁶, las cuatro en *Anopheles gambiae*²⁷. Se espera mayor prevalencia de IPMx en

mosquitos adultos que en los jóvenes²⁴. Contrario a la prevalencia en humanos, la frecuencia de IPMx en mosquitos es igual o mayor que la frecuencia de las infecciones por una sola especie²⁴. La comparación de la prevalencia de IPMx en mosquitos y humanos sugiere poca relación²⁴.

En *Anopheles* coinfectados con *Plasmodium* y microfilarias se retarda el desarrollo de cada uno y aumenta la mortalidad de los mosquitos²⁸. Las filarias reducen la infectividad de *P. gallinaceum* para los mosquitos *Armigeres subalbatus* y *Aedes aegypti*²⁹.

En localidades selváticas de Ghana, en la zona ecuatorial del occidente de África, en glándulas salivares positivas con examen microscópico de 122 *Anopheles gambiae*, luego se halló esta frecuencia de infección al examinarlas con PCR en tiempo real (RT-PCR): 78% *P. falciparum*, 6% *P. malariae*, 6% *P. ovale*, 0,8% IPMx *P. falciparum*-*P. malariae*³⁰.

En Bangladesh, un total de 622 hembras de *Anopheles* pertenecientes a 17 especies fueron estudiadas con ELISA para proteína CSP y no hubo IPMx³¹. Los autores dicen que los hallazgos sugieren que en ese país es posible que otras especies distintas a las estudiadas estén involucradas en la transmisión malárica.

En septiembre de 2011 se publicó una revisión de literatura para determinar si las IPMx humanas se derivan principalmente de inoculación simultánea o secuencial de plasmodios. Se identificaron 63 estudios, 14 en África y 42 en Asia y Oceanía. Los autores concluyen que en el sureste de Asia, donde a la infección con *P. vivax* sigue infección con *P. falciparum* en un tercio de los casos, la información entomológica sugiere que la mayoría de las IPMx humanas son adquiridas por inoculaciones separadas³².

INMUNIDAD EN IPMx/MMX

La respuesta inmune depende del modo de proliferación de diferentes especies plasmodiales y ellas se influyen mutuamente en el mismo hospedero murino³³. En humanos, hay dominancia recíproca numérica de una especie sobre las otras después de la inoculación simultánea de *P. falciparum* y *P. vivax* y de *P. vivax* con *P. malariae*, según experimentos clásicos que sugieren que los diferentes plasmodios mutuamente antagonizan o interactúan entre sí en el hospedero infectado^{34,35}.

Se cree que las formas graves de malaria son menos

frecuentes cuando hay IPMx, con base en estos datos:

A) En Tailandia las formas graves ocurrieron 4,2 veces menos en pacientes con IPMx *P. falciparum*-*P. vivax* que en aquellos con enfermedad debida solo a *P. falciparum*³⁶, en tanto que la infección exclusiva por *P. falciparum* fue factor de riesgo para anemia, comparada con IPMx por ambas especies³⁷. Se cree que la infección con *P. vivax* atenúa la gravedad de la infección con *P. falciparum*.

B) En Mozambique, la prevalencia de *P. malariae* se reduce al aumentar *P. falciparum*. *P. malariae* y *P. ovale* ocurrieron casi exclusivamente en IPMx asociadas a *P. falciparum*³⁸. Para la coinfección *P. falciparum* - *P. malariae*, se ha propuesto un modelo matemático que muestra que cuando la inmunidad cruzada interespecies es débil, hay alta probabilidad de coexistencia de ellas dos y cuando es fuerte, la exclusión competitiva es alta³⁹.

C) Los niños con IPMx *P. falciparum* más otra especie generalmente tienen alta reactividad de IgG frente a la proteína 1 asociada a la roptrina de esa especie (rRAP-1), comparados con otros con infección solo por *P. falciparum*⁴⁰.

D) En adultos de India, las IPMx tuvieron menor frecuencia de complicaciones como anemia, trombocitopenia, disfunciones hepática y renal y menor índice parasitario que las infecciones exclusivas por *P. falciparum*⁴¹. Pero si se cree que las formas graves de malaria son menos frecuentes cuando hay IPMx, de otro lado se ha dicho que cuando hay malaria grave en niños de India, la mortalidad es mayor cuando existe IPMx: entre 131 niños hospitalizados, la mortalidad fue 11,1% en aquellos con IPMx, 7,6% con *P. falciparum* y 3,0% con *P. vivax*⁴². A esto se agrega que estudios recientes en Papua Nueva Guinea, Indonesia e India han informado de todas las complicaciones de la malaria grave con infecciones por *P. vivax* y las IPMx son al parecer las enfermedades más graves^{14,43,44}.

Según un modelo matemático sobre IPMx, para apreciar las ondas irregulares de fiebre y parasitemia frecuentes en tales infecciones, debe haber un efecto diferencial de la inmunidad específica de especie y de una variación en función del tiempo de la inmunidad contra la especie dominante⁴⁵. Un metanálisis de 2007 apoya la existencia de interacciones biológicas tales como la supresión o la inmunidad cruzada entre las especies¹.

PARASITEMIA EN IPMX/MMX

Hay diferencias geográficas en las interacciones de especies de *Plasmodium* que pueden cambiar de año en año en una misma localidad. La prevalencia de IPMx y otras expresiones de la interacción entre especies pueden estar enmascaradas por factores como heterogeneidad de la susceptibilidad, tasas relativas de replicación, momento de la inoculación, competencia por nutrientes y eritrocitos, además de respuesta inmunitaria por activación temprana de mecanismos defensivos inespecíficos o por vía de la inmunidad heteróloga⁶.

EN LAS IPMX HAY PICOS DE PARASITEMIA POR CADA ESPECIE Y NO UN PICO ÚNICO

En IPMx por *P. vivax*-*P. falciparum*, los picos de parasitemia alternan entre especies^{34,46}. En niños semiinmunes de Papua Nueva Guinea, la densidad parasitaria total de los plasmodios coinfectantes oscila alrededor de un umbral y los picos de infección con cada especie no coinciden, se alternan. La parasitemia malárica es controlada de una manera dependiente de la densidad parasitaria en esos niños semiinmunes y existe un mecanismo interespecies de regulación parasitaria².

PARASITEMIA DE CADA ESPECIE EN INFECCIONES ÚNICAS VS IPMX: ASUNTO COMPLEJO

En la provincia de Tak al oeste de Tailandia, en 2308 adultos, hubo 1,5% de IPMx por *P. falciparum*-*P. vivax* y en cada caso de IPMx la parasitemia de *P. falciparum* fue mayor que la de *P. vivax*. La razón F:V creció en cada año, pasando de 36 a 89 y luego a 316. La parasitemia de *P. vivax* fue significativamente menor en pacientes con IPMx que en aquellos con infecciones únicamente por *P. vivax* ($p < 0,00001$), pero la parasitemia por *P. falciparum* fue similar en pacientes con IPMx y con infección solo por esa especie⁴⁷.

En Malawi, en niños con IPMx según la PCR, tuvieron menor parasitemia que aquellas con especie única en las regiones de transmisión perenne ($p = 0,0021$) pero no en la región con transmisión estacional de baja intensidad ($p = 0,071$); este mismo comportamiento en los niños de esta región se vio en los adultos de las tres zonas⁵.

CLÍNICA DE IPMX/MMX

El efecto de la coinfección plasmodial en los

resultados clínicos de la malaria no está claro y hay escasos estudios^{5,40,48-52}. En modelos animales, la infección por una especie plasmodial afecta el curso de la infección por la otra, aunque la interacción entre plasmodios no se encontró en infecciones experimentales aplicadas a pacientes con neurosífilis⁵⁰. La interacción entre plasmodios puede tener efectos protectores frente a algunos resultados o desenlaces maláricos, pero diferencias en la estacionalidad y la intensidad de la transmisión entre regiones endémicas son importantes condiciones del efecto de las coinfecciones⁵.

La gametocitemia es significativamente mayor en infecciones únicas que en IPMx⁵³ y, en niños kenianos, la coinfección con *P. malariae* se asocia a aumento de la gametocitemia de *P. falciparum*; igual sucedió en Tanzania pero no en Nigeria⁵⁴.

P. malariae y *P. vivax* tienen capacidad de reducir la parasitemia máxima de *P. falciparum* cuando coinfectan y existe recrudescencia potencial de una infección de bajo nivel de *P. falciparum* después de la infección por *P. malariae* o la infección o recaída por *P. vivax*⁵⁵.

Se afirma que aunque los primeros estudios en Tailandia demostraron que las infecciones mixtas con *P. vivax* parecían atenuar la gravedad de la enfermedad por *P. falciparum*⁵⁶, los estudios recientes en zonas con resistencia de ambas especies a los medicamentos demuestran que las infecciones mixtas se asocian con un mayor riesgo de malaria grave, en particular anemia^{14,43}. Esto podría representar los efectos aditivos de mayor biomasa total del parásito y la exposición repetida a cada una de estas especies de *Plasmodium* en recrudescencias, reinfecciones y recaídas⁵⁷.

En cuanto a síntomas generales en la IPMx/MMx, se anota que un estudio prospectivo en el estado de Acre, Amazonia de Brasil, en 162 habitantes entre 5 y 73 años, analizó en forma prospectiva 326 infecciones palúdicas no complicadas, tanto sintomáticas como asintomáticas, confirmadas por laboratorio con Microscopía de Luz (ML) o PCR: *P. vivax* 46% (n=151), *P. falciparum* 35% (n=115) y por ambas especies o mixta 18% (n=60). La proporción de infecciones asintomáticas al recoger la muestra de sangre fue de 18,5% en las infecciones por *P. vivax*, 37,4% en aquellas por *P. falciparum* y 41,7% en las IPMx ($p < 0,0001$). Se hallaron 13 síntomas, todos ellos típicos de malaria no complicada; la mayoría fueron percibidos más

intensos en las infecciones exclusivas por *P. vivax* que en las debidas a *P. falciparum* o en las IPMx: hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en los puntajes de percepción de gravedad de fiebre, escalofrío, diaforesis, cefalea, mialgia, artralgia, náusea y mareo. Las diferencias se debían a los mayores puntajes en el grupo *P. vivax*⁵⁸.

Otro estudio en la frontera Tailandia-Myanmar, en 10 549 pacientes (4.960 <15 años, 5589 adultos) tratados entre 1991-2005 para malaria por *P. falciparum*, 89,0% (9385) tenía infección exclusiva por *P. falciparum* y 11,0% (1164%) tenía IPMx *P. falciparum-P. vivax* según la ML. La proporción acumulada de recurrencia de infección, medida el día 63 de seguimiento, fue 21,5% (IC95% 20,3%-22,8%) para *P. falciparum* y 31,5% (95% CI 30,1%-33,0%) para *P. vivax*. Entre las variables identificadas como significativamente favorecedoras de la recurrencia con *P. vivax* estuvo la posesión de IPMx en el momento de iniciar el estudio. La mediana del tiempo de recurrencia varió de 28 a 35 días según la(s) especie(s) ($p < 0,001$)⁵⁹.

En el estudio anterior, la presencia de síntomas en el momento de las recurrencias fue mayor en aquellos con IPMx en un comienzo (71%), seguidos de quienes habían tenido malaria sólo por *P. falciparum* (66%) y, por último, quienes tuvieron malaria únicamente por *P. vivax* (44%) ($p < 0,001$ para la diferencia global)⁵⁹.

Acerca de la fiebre en coinfectados con plasmodios, con frecuencia hay ondas irregulares de fiebre y parasitemia, según lo indican modelos matemáticos dinámicos⁴⁵.

Algunos estudios han revelado fiebre más frecuente y más alta en IPMx que en infecciones por especie única⁴⁷, pero otros encuentran valores similares⁵. *P. malariae* pero no *P. vivax* ni *P. ovale*, reducen la fiebre por *P. falciparum* en pacientes con neurosífilis "tratados" con *P. malariae*, *P. ovale* y/o *P. vivax*, y luego con *P. falciparum*⁴⁹.

Leucocitos y plaquetas: en pacientes adultos tailandeses con IPMx *P. falciparum* - *P. vivax* el recuento leucocitario varió ampliamente, fue moderado (85% con <8000 leucocitos/uL), mostró valores similares a los encontrados en las infecciones por una especie ($p > 0,25$) y no se correlacionó con la parasitemia en ninguna situación (infecciones por una especie o IPMx)⁴⁷.

En cuatro adultos pakistaníes con IPMx, *P.*

falciparum-P. vivax se halló, con $56\ 000 \pm 24\ 500$ plaquetas/uL; hubo creatinina sérica normal en tres de ellos y elevada (4,9 mg/dL) en el otro; uno presentó como complicación una falla renal aguda⁶⁰.

TRATAMIENTO

Los errores en el tratamiento de pacientes con MMx son frecuentes y pueden tener graves repercusiones, tal como se conoce desde hace muchos años⁶¹. Las guías de tratamiento antimalárico de la OMS de 2006 y 2010, apenas abordan el problema⁶². La guía colombiana dice que en los casos de IPMx/MMx no complicada, con parasitemia asexual inicial no mayor de 50 000 formas asexuales por μ L, se debe administrar el tratamiento esquizonticida sanguíneo de primera línea recomendado para los casos con *P. falciparum* y se debe añadir primaquina durante 14 días para evitar la aparición de recaídas por persistencia de merozoítos de *P. vivax*⁸.

Al tratar un paciente con diagnóstico de infección por especie única, es común que aparezca parasitemia, con o sin síntomas asociados, debida a otra especie luego de haberse recuperado o de estar en recuperación clínica y parasitológica de la primera infección⁶³⁻⁶. La aparición de *P. vivax* postratamiento del episodio por *P. falciparum* ocurrió en 18,0% de las veces, sin diferencias según el tratamiento para *P. falciparum*⁶⁴. La aparición de *P. falciparum* después de tratar un episodio por *P. vivax* sucedió en 9,9% de las veces⁶⁴. Podría tratarse de IPMx en las que, por determinada razón, casi nunca conocida, no se identificó la otra especie, pero también puede tratarse, cuando sucede la secuencia *P. falciparum* y, luego del tratamiento de aquél, *P. vivax*, de infecciones que surgen de la activación de hipnozoítos de *P. vivax*, situación que parece ser la mayoritaria en Tailandia, donde la presencia de gametocitos de *P. falciparum* el día del diagnóstico inicial de malaria falciparum con la GG es factor que pronostica la posterior aparición de *P. vivax*⁶⁷.

FRECUENCIA DE IPMx/MMx

Lo usual en IPMx es infección doble, pero hay datos sobre triple y cuádruple infección^{2,68-70}. Es común que no sea reconocida o que sea subestimada^{62,64}. Con la reacción en cadena de la polimerasa anidada la frecuencia de IPMx es mucho mayor que la informada con ML^{64,71-3}, como 3,48% con ML y 20,22% con PCR⁶⁴. Se ha dicho que las infecciones ocultas por *P. falciparum* pueden detectarse en 75% de las

veces con pruebas diagnósticas rápidas basadas en la detección de proteína 2 rica en histidina, pero tales pruebas son poco útiles para detectar las infecciones crípticas por *P. vivax*, por su poca sensibilidad^{62,74}. Hay propuestos métodos matemático para estimar las infecciones por múltiples especies parasitarias⁷⁵.

En Suramérica, la prevalencia promedio de IPMx, con GG, en cuatro países, es: Perú (0,28%), Venezuela (1,68%), Brasil (3,30%) y Colombia (3,24%). Dentro de cada país también hay notoria variación en los datos. La frecuencia de IPMx con PCR es 28 veces la obtenida con GG (cálculos nuestros con datos no presentados aquí).

En 291 pacientes hospitalizados por malaria, en centros de Medellín (Colombia), entre 1992 y 1996, se halló que 8% tenían diagnóstico de malaria mixta por *P. falciparum* y *P. vivax* pero no se avanzó en la descripción de esos casos⁷⁶.

En mujeres en gestación, la frecuencia de IPMx fue nula en Colombia⁷⁷ y 2,7% en Malawi (*P. falciparum*-*P. malariae*)⁷⁸, al usar PCR (anidada en Colombia y en tiempo real en Malawi). Con ML la frecuencia de IPMx *P. vivax*-*P. falciparum* fue de 0,07% en Brasil⁷⁹; 2% en Colombia⁸⁰; 0,8% en Venezuela⁸¹; 8,3% en Papua, Indonesia⁸²; 9,3% en India⁸³.

En Kenia, con cadena de la polimerasa anidada, las madres con IPMx tuvieron más probabilidad de tener hijos también con IPMx (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*), pero las especies de parásitos que se identificaron no siempre concordaron entre madres e hijos⁸⁴.

FRECUENCIA ESPERADA VS FRECUENCIA OBSERVADA DE IPM/MMX

Según los datos de la mayoría de los estudios de prevalencia de infecciones plasmodiales, se ha observado un menor número de IPMx/MMx del que cabría esperar en función del producto de las frecuencias individuales de cada especie es decir, bajo el supuesto de que las infecciones por especie son independientes entre sí.

En una región de Papua Nueva Guinea con alta prevalencia de malaria, los diferentes pares de coinfecciones por especie presentaron prevalencias que no siguieron un mismo patrón de independencia o dependencia⁵².

La infección por *P. vivax* parece proteger contra

enfermedad por *P. falciparum* pero no contra otras formas de morbilidad, como en el caso del portador asintomático del parásito. La patencia o infección manifiesta con *P. falciparum* se asoció negativamente con posteriores episodios clínicos sin parasitemia, pero positivamente con episodios con parásitos homólogos⁵².

DISCUSIÓN

LOS PROBLEMAS DE LA INMUNIDAD, DE LA PARASITEMIA Y DE LA CLÍNICA EN IPM/MMX

No parece existir duda sobre la naturaleza más compleja de la respuesta inmune en las IPMx comparado con la infección por especie única. Se dice que *P. vivax* atenúa la gravedad de la infección por *P. falciparum*⁶⁴. Se concuerda con la idea que plantea que la interacción entre plasmodios coinfectantes puede tener efectos protectores contra algunos resultados clínicos de la malaria, pero hay que considerar que esto depende de la estacionalidad y la intensidad de transmisión⁵. Estos aspectos han sido muy poco estudiados y en el caso de Colombia, son completamente desconocidos.

Hoy día no es posible decidir con suficientes pruebas si la MMx es más o menos grave que aquella por especie única, o si tiene riesgos mayores o menores de complicación. Los estudios en el mundo son escasos y con limitación es en cuanto a los aspectos evaluados. El hecho de que uno de cada cinco pacientes con *P. falciparum* exitosamente tratados desarrollen poco después un episodio por *P. vivax* y de que uno de cada diez pacientes con *P. vivax* tratados con éxito hagan poco después un episodio por *P. falciparum*⁶⁴, obliga a pensar sobre las actuales estrategias de tratamiento, sobre todo en zonas de alta frecuencia de IPMx.

EL PROBLEMA DE LAS FRECUENCIAS OBSERVADAS Y ESPERADAS DE IPMx

Los datos disponibles no permiten una conclusión clara y precisa sobre prevalencia de las relaciones por pares o tríos de especies, comparado con las frecuencias esperadas si tales combinaciones fuesen independientes. La menor frecuencia observada con respecto a la esperada sugiere que un parásito ha excluido al otro o ha suprimido la parasitemia a niveles indetectables^{6,13,46,63}. Sin embargo, la subestimación del número de IPMx mediante la ML es explicación alternativa^{6,85}.

Para *P. vivax* -*P. falciparum* la mayor prevalencia de especies individuales se asocia con menos IPMx de lo esperado, según el producto de la prevalencia de cada especie, lo cual puede deberse, en parte, a que existen epítopes de reactividad cruzada inmunológica⁸⁶, pero tal relación inversa no se encuentra para el par *P. malariae* - *P. falciparum*⁸⁷.

La edad de las personas, el nivel y estabilidad de la transmisión influyen en la frecuencia de la IPMx como se demostró en Malawi, donde se hizo un estudio sobre la distribución de las IPMx en <15 años y en adultos de tres regiones de transmisión (perenne, estacional de alta intensidad, estacional de baja intensidad). En niños hubo exceso de IPMx por tres especies en las regiones de transmisión estacional ($p=0,0001$) y hubo distribución al azar en la región de transmisión perenne ($p=0,14$); en los adultos, hubo exceso de IPMx tanto en las zonas de transmisión estacional ($p=0,0009$) pero no en la perenne ($p=0,13$)⁵.

CONCLUSIONES

La IPMx/MMx se subestiman al usar ML. Debe tenerse presente que es frecuente la aparición de una especie plasmodial luego del tratamiento exitoso de la infección por otras especies y eso indica infección oculta por la segunda en aparecer (*P. vivax* siguiendo a *P. falciparum* es menos frecuente que lo contrario, con relación 1:2).

Las coinfecciones plasmodiales parecen ser mutuamente supresivas, con *P. falciparum* dominando a *P. vivax* y este atenuando la gravedad de la infección por *P. falciparum*.

El cuadro clínico, el comportamiento de la parasitemia de cada especie en las IPMx y la clase y frecuencia de complicaciones asociadas no están suficientemente estudiados en la mayoría de regiones, sobre todo en América.

El comportamiento epidemiológico de la IPMx/MMx es muy variable en función de la intensidad y la estabilidad de la transmisión, la influencia de los ciclos de lluvia, la edad de las personas, la fauna anofelina, entre otros condicionantes.

No hay bases suficientes para definir el tratamiento de la IPMx/MMx. Se sugiere tratar simultáneamente las diferentes especies. Si ocurre *P. vivax*-*P. falciparum*, debe darse esquizotónica para *P. falciparum* y debe darse primaquina para evitar recaídas de *P. vivax*.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno para declarar.

FINANCIACIÓN

Colciencias (proyecto 111540820495, contrato RC 238-2007; proyecto 111549326134, contrato 611-2009); Universidad de Antioquia-Estrategia Sostenibilidad 2011-2012; Codi-Universidad de Antioquia proyecto 8764-2521; Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haghdoust A, Alexander N. Systematic review and meta-analysis of the interaction between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in humans. *J Vect Borne Dis*. 2007;44:33-43.
- Bruce M, Day K. Cross-species regulation of *Plasmodium* parasitaemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends Parasitol*. 2003;19:271-7.
- Bruce M, Donnelly C, Alpers M, Galinski M, Barnwell J, Walliker D, et al. Cross-species interactions between malaria parasites in humans. *Science*. 2000;287:845-8.
- McKenzie F, Jeffery G, Collins W. *Plasmodium malariae* infection boosts *Plasmodium falciparum* gametocyte production. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:411-4.
- Bruce M, Macheso A, Kelly-Hope L, Nkhoma S, McConnachie A, Molyneux M. Effect of transmission setting and mixed species infections on clinical measures of malaria in Malawi. *PLoS One*. 2008;3(7):e2775.
- Richie T. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate host. *Parasitology*. 1988;96(Pt 3):607-39.
- WHO World Health Organization. Basic Malaria Microscopy. Part 1. Learner's Guide. Geneva: WHO, 2010.
- Colombia-MPS Colombia, Ministerio de la Protección Social (MPS). Guía de Atención de la Malaria. Bogotá: MPS, 2007. Bogotá: MPS, 2007.
- DSSA Dirección Seccional de Salud de Antioquia. 17. Malaria. Protocolo de Vigilancia Epidemiológica para Malaria. Medellín: DSSA, 2009. Consulta: 8 marzo 2011. www.dssa.gov.co/index.php/documentos/doc.../21-malaria. Medellín: DSSA, 2009.
- DSSA Dirección Seccional de Salud de Antioquia. Manual para lectura de gota gruesa para malaria. 2ª edición. Medellín: DSSA, 2010.
- Alger J. Diagnóstico microscópico de la malaria. Gota gruesa y extendido fino. *Rev Med Hond*. 1999;67:216-8.
- López-Antuñano F. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. In: López-Antuñano Fand Schmunis G, editors. Diagnóstico de malaria Volumen 512 Washington: OPS-OMS; 1988. p. 39-50. : OPS-OMS. , 1988. p. 39-50.
- Maitland K, Williams T, Bennett S, Newbold C, Peto T, Viji J, et al. The interaction between *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in children on Espiritu Santo Island, Vanuatu. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90:614-20.
- Tjitra E, Anstey N, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*. 2008;5:e128.

15. Zimmerman P, Mehlotra R, Kasehagen L, Kazura J. Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans?. *Trends Parasitol.* 2004;20:441-7.
16. White N Malaria. In: Zumla A, Cook G, editors. *Manson's Tropical Diseases.* London: W.B. Saunder Co. Ltd,2003. p.1205-95.
17. Kitchen S. Symptomatology: general considerations. In: Boyd M, editor. *Malariaology: A Comprehensive Survey of all Aspects of This Group of Diseases from a Global Standpoint:* WB. Saunders. p. 966–994 (citado por Zimmerman et al. 2004).1949.
18. Cox M, Kum D, Tavul L, Narara A, Raiko A, Baisor M, et al. Dynamics of malaria parasitaemia associated with febrile illness in children from a rural area of Madang, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88:191-7.
19. Gatton M, Cheng Q. Evaluation of the pyrogenic threshold for *Plasmodium falciparum* malaria in naive individuals. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:467-73.
20. Luxemburger C, Thwai K, White N, Webster H, Kyle D, Maelankirri L, et al. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:105-11.
21. Rogier C, Commenges D, Trape J. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54:613-9.
22. Gravenor M, Kwiatkowski D. An analysis of the temperature effects of fever on the intra-host population dynamics of *Plasmodium falciparum.* *Parasitology.* 1998;117:97-105.
23. Bruce M, Day K. Cross-species regulation of malaria parasitaemia in the human host. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:431-7.
24. Mckenzie F, Bosser W. Multispecies *Plasmodium* infections of humans. *J parasitol.* 1999;85:12-8.
25. Rosenberg R, Andre R, Somchit L. Highly efficient dry season transmission of malaria in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84:22-8. *Comentarios: Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84(4):610; *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991;85(1):138.
26. Gordon D, Davis D, Lee M, Lambros C, Harrison B, Samuel R, et al. Significant of circumsporozoite-specific antibody in the natural transmission of *Plasmodium falciparum,* *Plasmodium vivax,* and *Plasmodium malariae* in an aboriginal (Orang Asli) population of central peninsular Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:49-56.
27. Fontenille D, Lepers J, Coluzzi M, Campbell G, Rakotoarivony I, Coulanges P. Malaria transmission and vector biology on Sainte Marie Island, Madagascar. *J Med Entomol.* 1992;29:197-202.
28. Burkot T, Molineaux L, Graves P, Paru R, Battistutta D, Dagoro H, et al. The prevalence of naturally acquired multiple infections of *Wuchereria bancrofti* and human malarials in anopheles. *Parasitology.* 1990;100:369-75.
29. Aliota M, Chen C, Dagoro H, Fuchs J, Christensen B. Filarial worms reduce *Plasmodium* infectivity in mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(2) e963.
30. Abonuusum A, Owusu-Daako K, Tannich E, May J, Garms R, Kruppa T. Malaria transmission in two rural communities in the forest zone of Ghana. *Parasitol Res.* 2011;108:1465-71. Epub 2010.
31. Alam M, Khan M, Chaudhury N, Deloer S, Nazib F, Bangali A, et al. Prevalence of anopheline species and their *Plasmodium* infection status in epidemic-prone border areas of Bangladesh. *Malar J.* 2010;9:15.
32. Imwong M, Nakeesathit S, Day N, White N. A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes. *Malar J.* 2011;10:253.
33. Chen G, Feng H, Liu J, Qi Z, Wu Y, Guo S, et al. Characterization of immune responses to single or mixed infections with *P. yoelii* 17XL and *P. chabaudi* AS in different strains of mice. *Parasitol Int.* 2010;59:400-6.
34. Boyd M, Kitchen S. Simultaneous inoculation with *Plasmodium vivax* and *P. falciparum.* *Am J Trop Med.* 1937;17:855-61.
35. Boyd M, Kitchen S. Veneral *vivax* activity in persons simultaneously inoculated with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum.* *Am J Trop Med Hyg.* 1938;18:505-14.
36. Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White N. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:256-62.
37. Price R, Simpson J, Nosten F, Luxemburger C, Hkijaroen L, ter Kuile F, et al. Factors contributing to anemia after uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:614-22.
38. Marques P, Saúte F, Pinto V, Cardoso S, Pinto J, Alonso P, et al. *Plasmodium* species mixed infections in two areas of Manhiça district, Mozambique. *Int J Biol Sci.* 2005;1:96-102.
39. Chiyaka C, Mukandavire Z, Das P, Nyabadza F, Hove-Musekwa S, Mwambi H. Theoretical analysis of mixed *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* infections with partial cross-immunity. *J Theor Biol.* 2010;236:169-78.
40. Alifrangis M, Lemnge M, Moon R, Theisen M, Bygbjerg I, Ridley R, et al. IgG reactivities against recombinant Rhoptry-Associated Protein-1 (rRAP-1) are associated with mixed *Plasmodium* infections and protection against disease in Tanzanian children. *Parasitology.* 1999;119:337-42.
41. Joseph V, Varma M, Vidhyasagar S, Mathew A. Comparison of the clinical profile and complications of mixed malarial infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* versus *Plasmodium falciparum* mono-infection. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2011;11:377-82.
42. Yadav D, Chandra G, Aneja S, Kumar V, Kumar P, Dutta A. Changing profile of severe malaria in North Indian children. *Indian J Pediatr.* 2012;79:483-7. Epub 2011 Nov 18.
43. Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder J, Alpers M, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med.* 2008;5(6):e127.
44. Kochar D, Tanwar G, Khatri P, Kochar S, Sengar G, Gupta A, et al. Clinical features of children hospitalized with malaria- a study from Bikaner, northwest India. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:981-9.
45. Gurarie D, Zimmerman P, King C. Dynamic regulation of single- and mixed-species malaria infection: Insights to specific and non-specific mechanisms of control. *J Theoretical Biology.* 2006;240:185-99.
46. Boyd M, Kitchen S, Matthews C. Consecutive inoculations with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum.* *Am J Trop Med.* 1938;18:141-50.
47. McKenzie F, Smith D, O'Meara W, Forney J, Magill A, Permpanchik B, et al. Fever in patients with mixed-species malaria. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1713-8.
48. Black J, Hommel M, Snounou G, Pinder M. Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* and fever in malaria. *Lancet.* 1994;343:1095.

49. Collins W, Jeffery G. A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* in patients previously infected with heterologous species of *Plasmodium*: effect on development of parasitologic and clinical immunity. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:36-43.
50. Maitland K, Williams T, Newbold C. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: Biological interactions and the possibility of cross-species immunity. *Parasitol Today.* 1997;13:227-31.
51. May J, Falusi A, Mockenhaupt F, Ademowo O, Olumese P, et al. Impact of subpatent multi-species and multi-clonal plasmodial infections on anaemia in children from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:399-403.
52. Smith T, Genton B, Baea K, Gibson N, Narara A, Alpers M. Prospective risk of morbidity in relation to malaria infection in an area of high endemicity of multiple species of *Plasmodium*. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:262-7.
53. Maeno Y, Nakazawa S, Dao I, Yamamoto N, Giang N, Van Hanh T, et al. A dried blood sample on filter paper is suitable for detecting *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 2008;107:121-7.
54. Bousema J, Drakeley C, Mens P, Arens T, Houben R, Omar S, et al. Increased *Plasmodium falciparum* gametocyte production in mixed infections with *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:442-8.
55. Mason D. Review and recent progress: the mathematical modeling of mixed species *Plasmodium* infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000;31 Suppl 1:69-74.
56. Snounou G, White N. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from *falciparum* and *vivax* malaria in Thailand. *Trends Parasitol.* 2004;20:333-9.
57. Anstey N, Russell B, Yeo T, Price R. The pathophysiology of *vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 2009;25:220-7.
58. da Silva-Nunes M, Ferreira M. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the "symptomatic" vs "asymptomatic" dichotomy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:341-7.
59. Douglas N, Nosten F, Ashley E, Phaiphun L, van Vugt M, Singhasivanon P, et al. *Plasmodium vivax* recurrence following *falciparum* and mixed species malaria: risk factors and effect of antimalarial kinetics. *Clin Infect Dis.* 2011;52:612-20.
60. Beg M, Ali S, Haqqee R, Khan M, Qasim Z, Hussain R, et al. Rapid immunochromatography-based detection of mixed-species malaria infection in Pakistan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36:562-4.
61. Hess F, Kilian H, Nothdurft H, Loscher T. Problems in the therapy of mixed malarial infections: a case of infection with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* treated with mefloquine and halofantrine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:688.
62. WHO World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO, 2006.
63. Looareesuwan S, White N, Chittamas S, Bunnag D, Harinasuta T. High rate of *Plasmodium vivax* relapse following treatment of *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet.* 1987;2:1052-5.
64. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton P, White N. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol.* 2004;20:233-40.
65. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Imwong M, Looareesuwan S, White N. Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with *vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:588-92.
66. Pukrittayakamee S, Clemens R, Chantra A, Nontprasert A, Luknam T, Looareesuwan S, et al. Therapeutic responses to antibacterial drugs in *vivax* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:524-8.
67. Lin J, Bethell D, Tyner S, Lon C, Shah N, Saunders D, et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is associated with subsequent *Plasmodium vivax* relapse after treatment. *PLoS One.* 2011;6(4):e18716.
68. Mehlotra R, Lorry K, Kastens W, Miller S, Alpers M, Bockarie M, et al. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62:225-31.
69. Mueller I, Widmer S, Michel D, Maraga S, McNamara D, Kiniboro B, et al. High sensitivity detection of *Plasmodium* species reveals positive correlations between infections of different species, shifts in age distribution and reduced local variation in Papua New Guinea. *Malar J.* 2009;8:41.
70. William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S, et al. Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1248-55.
71. Di Santi S, Kirchgatter K, Brunialti K, Oliveira A, Ferreira S, Boulos M. PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46:183-7.
72. Kawamoto F, Liu Q, Ferreira M, Tantular I. How prevalent are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia. *Parasitol Today.* 1999;15:422-6.
73. Zhou M, Liu Q, Wongsrichanalai C, Suwonkerd W, Panart K, Prajakwong S, et al. High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnosis. *Trop Med Int Health.* 1998;3:304-12.
74. Carmona-Fonseca J, Franco A, Arango E, Agudelo O, Maestre A. Now ICT malaria Pf/Pv® frente a microscopía (gota gruesa-extendido) para diagnóstico de malaria en Urabá (Colombia). *Iatreia.* 2010;23:137-45.
75. Howard S, Donnell C, Chan M. Methods for estimation of associations between multiple species parasite infections. *Parasitology.* 2001;122(Pt 2):223-51.
76. González L, Guzmán M, Carmona J, Lopera T, Blair S. Características clínico-epidemiológicas de 291 pacientes hospitalizados por malaria en Medellín (Colombia). *Acta Med Col.* 2000;25:163-70.
77. Campos I, Uribe M, Cuesta C, Franco-Gallego A, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Diagnosis of gestational, congenital and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction and histopathology. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:929-35.
78. Rantala A, Taylor S, Trottman P, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J.* 2010;9:269.
79. Martínez-Espinosa F, Daniel-Ribeiro C, Alecrim W. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:19-21.
80. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de la malaria gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia,

- Colombia), 2005-2007. *Rev Col Obst Ginecol.* 2009;60:12-26.
81. Gómez E, López E, Ache A. Malaria y embarazo. Parroquia San Isidro, municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela, años 2005-2006. *Invest Clin.* 2009;50:455-64.
 82. Poespoprodjo J, Fobia W, Kenangalem E, Lampah D, Warikar N, Seal A, et al. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1374-81.
 83. Hamer D, Singh M, Wylie B, Yeboah-Antwi K, Tuchman J, Desai M, et al. Burden of malaria in pregnancy in Jharkhand State, India. *Malar J.* 2009;8:210.
 84. Tobian A, Mehlotra R, Malhotra I, Wamachi A, Mungai P, Koech D, et al. Frequent umbilical cord-blood and maternal-blood infections with *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale* in Kenya. *J Infect Dis.* 2000;182:558-63.
 85. Molineaux L, Gramiccia G. *Parasitology. The Garki Project, research on the epidemiology and control of malaria in the Sudan Savanna of west Africa.* Geneva: World Health Organization, 1980. p.109-72.
 86. Carvalho L, Fontes C, Fernandes A, Marinuzzi H, Krettli A. Cross-reactive cellular immune response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. *Parasite Immunology.* 1997;19:47-59.
 87. McKenzie F, Bosser W. Mixed-species *Plasmodium* infections of humans. *J Parasitol.* 1997;83:593-600.