

# Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes *dhfr* e *dhps* do *Plasmodium falciparum*

Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Maputo, Mozambique: presence of mutations in the *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum*

Natércia Emília Pedro Fernandes<sup>1</sup>, Pedro Cravo<sup>2</sup> e Virgílio E. do Rosário<sup>2</sup>

## RESUMO

Foram analisadas a frequência e distribuição de mutações nos genes dihidrofolato redutase e dihidropteroato sintetase do *Plasmodium falciparum*, usando a metodologia de reação em cadeia da polimerase e polimorfismos de hidrólise por enzimas de restrição, em amostras de sangue infectado proveniente de crianças moçambicanas, residentes em Maputo. A análise foi feita antes e 7 dias após o tratamento com sulfadoxina-pirimetamina (S/P). Os resultados mostraram a ocorrência de mutações pontuais nos genes estudados e a presença de combinações de três alelos em *dhfr* (51<sup>Ile</sup>, 59<sup>Arg</sup> e 108<sup>Asn</sup>) e do quintúplio mutante (*dhfr* 51<sup>Ile</sup>, 59<sup>Arg</sup>, 108<sup>Asn</sup> e *dhps* 437<sup>Gly</sup>, 540<sup>Glu</sup>), ambas situações associadas à falha terapêutica no sétimo dia após tratamento com S/P. Esses achados mostram a importância de se estudar a resistência à S/P em Moçambique, e como os marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos podem fornecer dados importantes para a política nacional de controlo da malária.

**Palavras-chaves:** Dihidrofolato redutase. Dihidropteroato sintetase. Resistência. Sulfadoxina/pirimetamina. Moçambique.

## ABSTRACT

The frequency and distribution of mutations in *Plasmodium falciparum*, dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes were analyzed, using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methodology, in infected blood samples from Mozambican children living in Maputo, before and seven days after treatment with sulfadoxine/pyrimethamine (S/P). The results showed the occurrence of point mutations in the genes studied and the presence of combinations of three alleles in *dhfr* (51<sup>Ile</sup>, 59<sup>Arg</sup> and 108<sup>Asn</sup>) and "quintuple" mutant (*dhfr* 51<sup>Ile</sup>, 59<sup>Arg</sup>, 108<sup>Asn</sup> and *dhps* 437<sup>Gly</sup>, 540<sup>Glu</sup>). Both of these situations were associated with seven-day therapeutic failure, following treatment with S/P. These findings show the importance of studying S/P resistance in Mozambique, and how molecular markers for antimalarial resistance can provide important data for national malaria control policy.

**Key-words:** Dihydrofolate reductase. Dihydropteroate synthase. Resistance. Sulfadoxine/pyrimethamine. Mozambique.

A resistência farmacológica do *Plasmodium falciparum* é um dos principais problemas nos programas de controle da malária. Nas últimas décadas, o crescente aumento da resistência à cloroquina levou a introdução de outros antimaláricos (ex: pirimetamina), bem como a modificação de esquemas terapêuticos já existentes ou inclusão de medicamentos já conhecidos e em novas associações. Contudo, o tratamento da malária com alguns desses medicamentos tem sido comprometido pelo aparecimento de parasitas resistentes<sup>21</sup>. Nas áreas endêmicas, da África, das quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o

Homem, a espécie *Plasmodium falciparum* é a que apresenta maior prevalência e virulência. Esta espécie rapidamente desenvolveu resistência à maioria dos antimaláricos atualmente em uso tomando proporções alarmantes na saúde pública<sup>1 2</sup>. Maputo é a capital de Moçambique, um País onde a malária é endêmica todo ano, atingindo o seu ponto mais alto após a época chuvosa (dezembro a abril). Com uma intensidade de transmissão variável, que depende da precipitação, altitude e temperaturas, o *Plasmodium falciparum* é o parasita mais prevalente, sendo responsável por cerca de 90% de todas infecções<sup>3</sup>. Os primeiros

1. Departamento de Pediatria, Universidade Eduardo Mondlane -Faculdade de Medicina. Maputo, Moçambique. 2. Unidade de Ensino e Investigação de Malária, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

O trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/10100/2002)-Portugal.

**Endereço para correspondência:** Dr<sup>a</sup> Natércia Emília Pedro Fernandes. Faculdade de Medicina/Universidade Eduardo Mondlane. Av. Salvador Allende. Caixa Postal 257, Maputo, Moçambique.

Tel: + 258 82 306-6420; Fax: +258 21 49-5046/42-5255

e-mail: naterciaf@yahoo.com.br

Recebido em: 06/02/2006

Aceito em: 11/07/2007

registros de resistência à cloroquina datam de 1983<sup>4</sup> e, nos últimos anos, tem sido realizadas várias investigações relacionadas com resistência e este e outros antimaláricos na região<sup>5,6,7</sup>.

A resistência à sulfadoxina/pirimetamina (S/P) surge pela presença de mutações pontuais nas regiões codificantes do centro ativo da enzima bifuncional dihidrofolato reductase (*dhfr*)-timidilato sintetase (*ts*) e da enzima dihidropteroato sintetase (*dhps*), para a pirimetamina e sulfadoxina respectivamente<sup>8,9,10,11,12</sup>. Para a pirimetamina, geralmente a mutação no gene *dhfr* no códon 108, alteração de uma serina para uma asparagina, parece ser suficiente para conferir resistência a este medicamento e conseqüentemente à sulfadoxina/pirimetamina<sup>14</sup>. Este fato, explica a razão pela qual a resistência do parasita tenha surgido imediatamente após a generalização do uso deste fármaco como terapêutica da malária<sup>10</sup>. Para além da mutação 108<sup>Asn</sup>, mutações nos códons 51 e 59, substituição da asparagina por isoleucina e cisteína por arginina, respectivamente, encontram-se normalmente implicadas nos elevados níveis de resistência a este fármaco<sup>8,9</sup>. Investigações realizadas<sup>10,11,13</sup> demonstraram que, para o gene *dhps*, mutações pontuais nos codons 436 (serina►alanina), 437 (alanina►glicina), 540 (lisina►glutamato) e 613 (treonina►serina), estão associadas a resistência à sulfadoxina. Outros estudos, mostraram também que o conjunto de três mutações no gene *dhfr* (51<sup>Ile</sup>, 59<sup>Arg</sup> e 108<sup>Asn</sup>) e duas no gene *dhps* (437<sup>Gly</sup> e 540<sup>Glu</sup>), designado *quintuplo mutant*, é considerado como um marcador molecular para a falha terapêutica, observado no tratamento de *Plasmodium falciparum* com S/P<sup>15,16</sup>. Foi objetivo do presente estudo identificar a frequência e distribuição das mutações pontuais nos genes *dhfr* e *dhps* do *Plasmodium falciparum*, em crianças moçambicanas residentes em Maputo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo teve lugar de agosto a outubro de 2004, no Centro de Saúde de Bagamoyo em Maputo, Moçambique, onde foram envolvidas todas as crianças (dos 6 meses aos 5 anos) com malária não complicada. Os critérios de inclusão consistiram na presença de monoinfecção com a espécie *Plasmodium falciparum*, não ingestão de antimaláricos nas 3 semanas anteriores, ausência de história de alergia às sulfonamidas e consentimento informado dos pais ou responsáveis pela criança. O estudo foi revisto e aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde.

**Colheita de amostras.** No total foram colhidas 148 amostras (74 antes e 74 após o tratamento com S/P). Na primeira visita da criança ao Centro de Saúde (designado de dia 0) foram obtidas, por punção digital, duas gotas de sangue sendo uma colhida diretamente numa lâmina e a outra em papel de filtro Whatman (Maidstone, United Kingdom) 3MM, que foi deixado a secar a temperatura ambiente. Após secas, as amostras colhidas em papel de filtro foram devidamente acondicionadas e transportadas para o laboratório do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, Portugal, para análise molecular.

**Identificação parasitária.** Do sangue colhido, nas lâminas, foi realizada uma gota espessa e um esfregaço que, após

corados com a solução de Giemsa a 15%, foram observados por microscopia óptica para a determinação da espécie de *Plasmodium* infectante e a respectiva parasitemia<sup>23</sup>.

**Tratamento dos pacientes.** Todas as crianças envolvidas do estudo foram tratadas, na unidade sanitária e sob supervisão médica, com uma dose única de Fansidar (25mg/kg de sulfadoxina e 1,25mg/kg de pirimetamina), no dia 0 e observadas sete dias após o tratamento (designado dia controle ou dia 7), para a verificação da cura (clínica e parasitológica) ou, em caso de sintomas, antes da data prevista do controle.

**Extração do ácido desoxirribonucléico.** Do sangue colhido em papel de filtro foi extraído o ácido desoxirribonucléico (DNA), utilizando o método de Chelex-100<sup>17</sup>.

**Reação em cadeia da polimerase e polimorfismos de hidrólise por enzimas de restrição.** Para a amplificação do ácido desoxirribonucléico parasitário, utilizou-se o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), descrito por Duraisingh<sup>18</sup>. Para obtenção dos polimorfismos de hidrólise por enzimas de restrição (PHER), dependendo da intensidade das bandas de electroforese no gel, usaram-se 2-5µl de produto amplificado da segunda reacção de PCR em cada incubação com diferentes enzimas de restrição, de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs, Beverly MA, USA). Para a identificação das mutações no gene *dhfr* utilizaram-se, para códons 51 e 59, as enzimas *TasI* e *Pdml* respectivamente e, para o códon 108 as enzimas de restrição *AluI*, *BseNI* e *BstNI*. Para o gene *dhps*, as enzimas *HpyF10VI* e *BseGI* foram utilizadas para a identificação das mutações nos códons 437 e 540, respectivamente. Como controle do PCR e do PHER utilizou-se DNA de amostras de *Plasmodium falciparum* originárias de diferentes áreas, nomeadamente as linhagens: STP79 (São Tomé e Príncipe), Dd2 (Vietname), Hb3 (Honduras), T9/94 (Tanzânia) e K1 (Tailândia). Todos os produtos de PCR e PHER foram separados em electroforese de géis de agarose (1% Seaken e 1% NuSieve) e a sua visualização efectuada num transiluminador de luz ultravioleta, após coloração dos géis com brometo de etídio (6mg/ml). A análise estatística foi feita pelo *F-test* e *Chi-square test*, com nível de significância estatística de 5%.

## RESULTADOS

De um total de 148 amostras colhidas (74 antes e 74 depois do tratamento com S/P), todas (100%) apresentavam-se positivas para *Plasmodium falciparum* antes do tratamento (D0), tanto na análise por microscopia óptica (MO) como pela reação em cadeia da polimerase. No dia do controle (D7), após o tratamento com S/P, 28 amostras (38%) continuavam positivas, na análise por MO e 73 (98%) na análise pela reação em cadeia da polimerase. Na análise dos polimorfismos, nos genes *dhfr* e *dhps*, 72 amostras apresentavam polimorfismos em D0 e 71 amostras em D7. No gene *dhfr*, a mutação 108<sup>Asn</sup> foi encontrada em sessenta e nove (95,8%) das 72 amostras analisadas em D0, e em sessenta e oito (95,7%) das 71 amostras analisadas em D7 (Tabela 1). Dessas sessenta e nove amostras com a mutação 108<sup>Asn</sup>, sessenta

e duas (89,8%) tinham esta mutação associada às mutações 51<sup>Ile</sup> e 59<sup>Arg</sup> antes e, 63 (91,3%) após o tratamento com S/P. Não foram observadas mutações isoladas. Mutações triplas em *dhfr*, posições 51, 59 e 108, e quintuplas em *dhfr* posições 51, 59, 108 e em *dhps* 437, 540, respectivamente, foram as mais frequentes, tendo estas últimas aumentado de 34 (47,2%) para 48 (67,6%),  $p = 0,014$ , após o tratamento com S/P (Tabela 2). Nas duas regiões estudadas do gene *dhps* (códon 437 e 540), foram encontradas mutações pontuais estando a maior parte associadas às mutações no gene *dhfr*. Em apenas quatro amostras (duas de D0 e duas de D7), foram identificadas mutações somente no gene *dhps* (Tabela 2).

**Tabela 1 - Frequência das mutações pontuais, nos genes dhfr e dhps do Plasmodium falciparum, antes e depois do tratamento com sulfadoxina/pirimetamina.**

Mutação	Antes do tratamento (n°=72)		Após o tratamento (n°=71)	
	n°	%	n°	%
<i>dhfr</i> 51 <sup>Ile</sup>	67	93,0	63	88,7
<i>dhfr</i> 59 <sup>Arg</sup>	66	91,6	67	94,3
<i>dhfr</i> 108 <sup>Asn</sup>	69	95,8	68	95,7
<i>dhps</i> 437 <sup>Gly</sup>	42	58,3	55	77,4
<i>dhps</i> 540 <sup>Glu</sup>	44	61,1	51	71,8

*dhfr*: dihidrofolato redutase *dhps*: dihidropteroato sintetase

**Tabela 2 - Distribuição das combinações de mutações pontuais, nos genes dhfr e dhps do Plasmodium falciparum, antes e depois do tratamento com sulfadoxina/pirimetamina.**

Mutação	Antes do tratamento	Após o tratamento
	(n°= 72)	(n°= 71)
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 108 <sup>Asn</sup> )	2	1
<i>dhfr</i> (59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> )	1	1
<i>dhps</i> (437 <sup>Gly</sup> + 540 <sup>Glu</sup> )	2	2
<i>dhfr</i> (59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> 540 <sup>Glu</sup>	1	-
<i>dhfr</i> (59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> 437 <sup>Gly</sup>	-	1
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> )	23	13
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> 540 <sup>Glu</sup>	3	-
<i>dhfr</i> (59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> (437 <sup>Gly</sup> + 540 <sup>Glu</sup> )	1	3
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> (437 <sup>Gly</sup> + 540 <sup>Glu</sup> )	2	-
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> 437 <sup>Gly</sup>	2	2
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 59 <sup>Arg</sup> ) + <i>dhps</i> (437 <sup>Gly</sup> + 540 <sup>Glu</sup> )	1	-
<i>dhfr</i> (51 <sup>Ile</sup> + 59 <sup>Arg</sup> + 108 <sup>Asn</sup> ) + <i>dhps</i> (437 <sup>Gly</sup> + 540 <sup>Glu</sup> )	34	48 $p=0.014$
Total	72	71

*dhfr*: dihidrofolato redutase *dhps*: dihidropteroato sintetase

## DISCUSSÃO

Estudos de biologia molecular na investigação dos mecanismos moleculares de quimiorresistência parasitária são relevantes no combate à malária, sobretudo a causada por *Plasmodium falciparum*, uma vez que não só permitem uma identificação racional de novos alvos terapêuticos, como também o estabelecimento de novos métodos de identificação/diagnósticos da resistência aos antimaláricos. Apesar de dispendiosa, a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase seguida de hidrólise enzimática, permite, de uma maneira específica

e sensível, separar os parasitas sensíveis dos resistentes. No presente estudo, para identificação da espécie de *Plasmodium*, a técnica de reação em cadeia da polimerase mostrou ter maior sensibilidade em relação à análise por microscopia óptica. Foram identificadas, antes do tratamento, 95,8% das amostras com a mutação 108<sup>Asn</sup>, descrita como a mutação precursora para o surgimento de todas as linhagens resistentes à pirimetamina<sup>14</sup> <sup>19</sup> <sup>21</sup>. Este dado indica a existência desta mutação em circulação na população do estudo. Observamos também que sete dias após o tratamento com S/P, esta mutação permanecia elevada (95,7%), o que nos permite colocar a hipótese de que este medicamento provavelmente não estará a funcionar na área do estudo. Por outro lado, foram identificadas amostras com associação da mutação *dhfr* 108<sup>Asn</sup> com as mutações *dhfr* 51<sup>Ile</sup> e 59<sup>Arg</sup>, padrão este implicado com o aumento progressivo dos níveis de resistência farmacológica a este fármaco<sup>19</sup>. No presente estudo, foi também analisado o gene *dhps*, onde identificaram-se mutações pontuais nas duas regiões estudadas deste gene (437<sup>Gly</sup> e 540<sup>Glu</sup>), estando a maioria associadas às mutações no gene *dhfr* (Tabela 2). Em relação presença de três mutações no gene *dhfr* (51<sup>Ile</sup>, 59<sup>Arg</sup> e 108<sup>Asn</sup>), antes e após o tratamento, apesar dos resultados não mostrarem significância estatística, está descrito que a associação destas está implicada num maior aumento de resistência ao tratamento com S/P<sup>20</sup> <sup>22</sup>. O *quintuplo mutante*, considerado como sendo um marcador molecular de falha terapêutica ao tratamento da malária, por *Plasmodium falciparum*, com S/P<sup>15</sup> <sup>16</sup>, mostrou ter sofrido um aumento estatisticamente significativo após o tratamento, levando-nos a colocar a hipótese de seleção de alelos mutantes. O presente estudo confirma o envolvimento das mutações, nos genes *dhfr* e *dhps* de *Plasmodium falciparum*, na falha terapêutica ao sétimo dia no tratamento da malária com S/P em Maputo, Moçambique, refletindo provavelmente a pressão deste medicamento no país durante vários anos.

Sendo a resistência aos antimaláricos um dos principais obstáculos aos programas de controlo da malária, torna-se importante que para além de um diagnóstico rápido e eficiente, se possa também determinar a prevalência da resistência aos antimaláricos com a identificação de marcadores moleculares de resistência, possibilitando a modificação, pelas autoridades sanitárias locais, dos esquemas terapêuticos e/ou profiláticos em uso nessa região, de modo a atuar mais eficazmente contra a malária.

## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que concordaram em participar no estudo (Moçambique) e ao laboratório do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Portugal).

## REFERÊNCIAS

1. Abacassamo F, Enosse S, Aponte JJ, Gomez-Olive FX, Quinto L, Mabunda S, Barreto A, Magnussen P, Ronn AM, Thompson R, Alonso PL. Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and combination therapy with

- artesunate in Mozambican children with non-complicated malaria. *Tropical Medicine and International Health* 9:200-208, 2004.
2. Biswas S, Escalante A, Chaiyaroj S, Angkasekwinai P, Lal AA. Prevalence of point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from India and Thailand: a molecular epidemiologic study. *Tropical Medicine and International Health* 5:737-743, 2000.
  3. Brooks D, Wang P, Read M, Watkin W, Sims P, Hyde J. Sequence variation in the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthetase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry* 224: 397-405, 1994.
  4. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Experimental Parasitology* 89:1-8, 1998.
  5. Foote SJ, Galatas D, Cowman AE. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 87:3014-3017, 1990.
  6. Franco L, Scwalbach J, Fernandes A e Schapira A. O centro de saúde como unidade-base do programa de controlo da malária. *Revista Médica de Moçambique* 5:17-20, 1984.
  7. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Akinboye DO, Yusuf BO, Ebong OO, Sowunmi A, Kyle DE, Milhous W, Wirth DF, Oduola AM. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Tropica* 95:183-193, 2005.
  8. Hogh B, Gamage-Mendis A, Butcher GA, Thompson R, Begtrup K, Mendis C, Enosse SM, Dgedge M, Barreto J, Eling W, Sinden RE. The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58:176-182, 1998.
  9. Kublin JG, Dzinjalimala FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV. Molecular markers for failure of sulfadoxine pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases* 185: 380-388, 2002.
  10. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A, Alonso PL. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcrt) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *Journal of Infectious Diseases* 183:1413-1416, 2001.
  11. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária. Moçambique, 2005.
  12. Muller O, Boele van Hensbroek M, Jaffar S, Drakeley C, Joof D, Pinder M, Greenwood B. A randomized trial of chloroquine, amodiaquine and pyrimethamine-sulphadoxine in Gambian children with uncomplicated malaria. *Tropical Medicine and International Health* 1:124-132, 1996.
  13. Peterson D, Walliker D, Wellem T. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 85: 9114-9118, 1988.
  14. Peterson DS, Di Santi SM, Povoá M, Calvosa VS, Rosario VE, Wellem TE. Prevalence of dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis of pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 492-497, 1991.
  15. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *Journal of Infectious Diseases* 176:1590-1596, 1997.
  16. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AE, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends in Parasitology* 17: 582-588, 2001.
  17. Trigg JK, Mbwana H, Chambo O, Hills E, Watkins W, Curtis CF. Resistance to pyrimethamine/sulfadoxine in *Plasmodium falciparum* in 12 villages in north east Tanzania and a test of chlorproguanil/dapsone. *Acta Tropica* 63:185-189, 1997.
  18. Triglia T, Menting JGT, Wilson C, Cowman AE. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94:13944-13949, 1997.
  19. Wang P, Reed M, Sims P, Hyde J. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Molecular Microbiology* 23: 979-986, 1997.
  20. Watkins WM, Mberu EK, Winstanley PA, Plowe CV. The efficacy of antifolate antimalarial combination in Africa: a predictive model based on pharmacodynamic and pharmacokinetic analyses. *Parasitology Today* 13:459-464, 1997.
  21. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Diseases* 2:209-218, 2002.
  22. Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* 9:303-305, 1993.
  23. World Health Organization. Basic laboratory methods in medical parasitology. World Health Organization Publications, Geneva, 1991.