



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA
SEROLÓGICA CONTRA EL ANTÍGENO
PvMSP-10 COMO MARCADOR DE
EXPOSICIÓN A *Plasmodium vivax*, Y
FACTORES ASOCIADOS AL NIVEL DE
RESPUESTA.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

CARLOS ALBERTO FERNÁNDEZ MIÑOPE

LIMA – PERÚ

2017

ASESORA

Dionicia Gamboa Vilela PhD

CO-ASESORES

Oscar Nolasco Cárdenas MSc

Angel Rosas-Aguirre PhD

DEDICATORIA

A mi Madre, por su apoyo infinito e incondicional,

A mi Padre, por darme el carácter necesario para hacer las cosas,

A mi compañera, Patricia, por estar allí cuando la necesito,

A mi Hija, Alejandra, por darme una razón.

AGRADECIMIENTOS

A Dionicia Gamboa, mi asesora, por la paciencia y tiempo invertido en el desarrollo de esta tesis y en mi formación como científico.

A Oscar Nolasco, mi co-asesor, por su extenso apoyo en la ejecución y redacción de esta tesis.

A Paulo Manrique, Gabriel Carrasco y demás personas que forman parte del Laboratorio de Malaria, y la Unidad de Epidemiología Molecular del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su colaboración en el trabajo realizado.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Los estudios de Maestría fueron subvencionados por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) a través del Convenio N° 031-2015-FONDECYT.

El trabajo experimental se llevó a cabo gracias al financiamiento del International Center of Excellence for Malaria Research (ICEMR Amazonia) del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (*grant* U19AI089681), el Círculo de Investigación “Hacia la Eliminación de la Malaria” (Convenio 008-2014-FONDECYT) y Bayer AG Perú, a través de su *social responsibility grant*.

INDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
2.1. Planteamiento del problema.....	3
2.2. Marco teórico.....	5
2.2.1. Situación de la malaria.....	5
2.2.2. Malaria en la Amazonía Peruana.....	6
2.2.3. La seroepidemiología en el estudio de la transmisión de malaria.....	8
2.2.4. Selección de los antígenos para uso en estudios seroepimediológicos	
10	
2.2.5. El ciclo de vida de <i>Plasmodium spp</i>	12
2.2.6. La invasión del eritrocito por <i>Plasmodium spp</i>	15
2.2.7. Merozoite Surface Protein 10.....	17
2.3. Justificación.....	23
2.4. Hipótesis.....	25
2.5. Objetivos.....	25

2.5.1.	Objetivo general.....	25
2.5.2.	Objetivos específicos	25
3.	METODOLOGÍA.....	27
3.1.	Diseño del estudio y colección de datos.....	27
3.2.	Población.....	30
3.3.	Muestra.....	32
3.4.	Procedimientos y técnicas	33
3.4.1.	Diagnóstico microscópico.....	33
3.4.2.	Diagnóstico molecular de malaria	34
3.4.2.1.	Aislamiento y purificación de ADN.....	34
3.4.2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	34
3.4.3.	Determinación de la respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG específicos contra la proteína PvMSP-10.....	36
3.4.4.	Determinación de polimorfismos en el gen que codifica para el antígeno PvMSP-10	38
3.4.4.1.	Diseño de los <i>primers</i>	38
3.4.4.2.	Amplificación del gen <i>pvx_114145</i> mediante Reacción en cadena de la polimerasa	39
3.4.4.3.	Secuenciamiento del amplicón.....	41
3.4.4.4.	Análisis de los cromatogramas, construcción del <i>contig</i> y recuperación de secuencias.....	41
3.4.4.5.	Análisis de secuencias.....	42
3.5.	Consideraciones éticas	42
3.6.	Análisis estadístico de los datos	43

4. RESULTADOS	45
4.1. Características sociodemográficas	45
4.2. Exposición a <i>P. vivax</i>	46
4.3. Respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10 en sujetos expuestos a <i>P. vivax</i>	46
4.4. Asociación entre la exposición a <i>P. vivax</i> y la respuesta serológica de anticuerpos IgG contra el antígeno PvMSP-10.....	51
4.5. Amplificación y secuenciamiento del gen <i>pvx_114145</i>	54
4.6. Alineamiento de secuencias y determinación de los polimorfismos en el gen	56
5. DISCUSIÓN	57
6. CONCLUSIONES	61
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

INDICE DE FIGURAS

Figura. 1. Casos de malaria en el Perú durante los años 2004 a 2016	6
Figura. 2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	14
Figura 3. Invasión del eritrocito	16
Figura 4. Esquema de la estructura de la proteína PvMSP10	18
Figura 5. Diseño para la comparación de la respuesta serológica de anticuerpos IgG específicos contra PvMSP-10 en los grupos de interés	29
Figura 6. Diseño para la determinación de los polimorfismos del gen pvx114145, que codifica para el antígeno PvMSP-10	30
Figura 7. Ubicación del área de estudio	32
Figura 8. Esquema del sitio de unión de los primers diseñados para la amplificación y secuenciamiento	39
Figura 9. Diagrama de flujo de los sujetos incluidos en este estudio	45
Figura 10. Diferencias en los niveles de anticuerpos IgG contra PvMSP-10 en los sujetos expuestos a <i>P. vivax</i> frente a los sujetos no expuestos	49
Figura 11. Diferencias en los niveles de anticuerpos IgG contra PvMSP-10 en los sujetos expuestos a <i>P. vivax</i> de acuerdo al tiempo pasado desde la última infección y episodios previos de malaria	50

Figura 12. Productos del PCR de re-amplificación a partir de muestras seleccionadas aleatoriamente	55
Figura 13. Secuencia consenso generada a partir de alineamiento	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de la población de estudio y su asociación con la exposición a <i>P. vivax</i>	48
Tabla 2. Modelo de regresión de <i>Poisson</i> univariado y multivariado para el nivel de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10	52
Tabla 3. Modelo de regresión de <i>Poisson</i> univariado y multivariado para la respuesta serológica (Seropositividad) de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10	53
Tabla 4. Características de las muestras secuenciadas	55

ABREVIATURAS

ADN: Acido Desoxirribonucleico

AMA1: Apical Membrane Antigen 1

CyRPA: Cysteine-Rich Protective Antigen

DAC: Detección activa de casos

DOI: Días desde la infección.

EBA: Erythrocyte Binding Antigen

EGF-like: Epidermal Growth Factor-like

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ETRAMP: Early Transcribed Membrane Protein

GAMA: GPI-anchored Micronemal Antigen

GG: Gota gruesa y frotis

GLURP: Glutamate-rich protein

GPI: Glicofosfatidilinositol

HEK-293: Human embryonic kidney 293

IgG: Inmunoglobulina G

IRR: Incidence-rate ratio

MSP: Merozoite Surface Protein

MTRAP: Merozoite-specific Thrombospondin-related Anonymous
Protein

OD: Optical density

ORF: Open Reading Frame

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PfRH: Reticulocyte binding-like Homologous

PTRAMP: Thrombospondin-related Apical Membrane Protein

Pv-fam-a: Antígeno rico en triptófano

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real

QV: Quality value

RALP1: Rhoptry-Associated Lecine zipper-Like Protein 1

RAMA: Rhoptry Associated Membrane Antigen

SERA: Serine-rich Antigen Family

WGCF: Wheat-germ cell-free

RESUMEN

La seroepidemiología es la medición de anticuerpos como biomarcadores de la infección por *Plasmodium spp* y es una manera costo-efectiva de monitorizar la transmisión de malaria, para determinar la eficacia de los programas de control y eliminación. Utilizando una cohorte retrospectiva, se comparó la respuesta serológica de anticuerpos totales tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10 entre sujetos expuestos a malaria por *Plasmodium vivax* y sujetos que permanecieron sin exposición, determinando los factores asociados al nivel de respuesta. Para esto se realizó el seguimiento, desde agosto de 2012, de 388 personas de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide, del área de Iquitos, determinando el estado de infección mediante microscopía mensual, y PCR a tiempo real. Se determinó la presencia de anticuerpos IgG totales anti PvMSP-10 recombinante en muestras de plasma tomadas en enero de 2013, y se realizó el secuenciamiento el gen *pvx_114145*. Un nivel mayor de anticuerpos así como el estado de seropositividad, contra el antígeno recombinante PvMSP-10 estuvieron asociados a la exposición reciente a *P. vivax*; y la secuencia del gen *pvx_114145*, que codifica este antígeno, se mantuvo sin variaciones a lo largo del tiempo. Los resultados refuerzan los hallazgos previos que postulan a esta proteína como un candidato a biomarcador de exposición y expande las posibilidades de su uso en estudios seroepidemiológicos en la Amazonía Peruana.

Palabras clave: *Malaria, Plasmodium vivax, MSP-10, pvx_114145, seroepidemiología, amazonía.*

ABSTRACT

Seroepidemiology is the measurement of antibodies as biomarkers of *Plasmodium spp* infection, and is a cost-effective way to monitor malaria transmission to determine the efficacy of control and elimination programs. Using a retrospective cohort, we compared the serological response of specific IgG antibodies against the PvMSP-10 antigen among subjects exposed to *Plasmodium vivax* malaria and subjects who remained without exposure, determining the factors associated with the level of response. For this, 388 people from the communities of San José de Lupuna and Cahuide of the Iquitos area, were monitored, determining the infection status by monthly microscopy, and the real-time PCR. The presence of specific IgG antibodies against PvMSP-10 antigen in plasma samples taken in January 2013 was determined, and the pvx_114145 gene was sequenced. A higher level of IgG antibodies as well as seropositivity status against the PvMSP-10 antigen were associated with recent exposure of *P. vivax*; and the sequence of the pvx_114145 gene, encoding this antigen, remained unchanged over time. The results reinforce the previous findings that postulate this protein as a candidate for biomarker exposure and expand the possibilities of its use in seroepidemiological studies in the Peruvian Amazon.

Keywords: *Malaria, Plasmodium vivax, MSP-10, pvx_114145, seroepidemiology, amazonia.*

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los esfuerzos dirigidos al control y eliminación de la transmisión de la enfermedad, la malaria continúa siendo una causa importante de morbilidad en la Amazonía Peruana, donde en los últimos seis años la enfermedad ha resurgido, con más de 50 mil casos anuales registrados al año por el Ministerio de Salud (Dirección General de Epidemiología. Ministerio de Salud, 2017).

La transmisión de la malaria en la Amazonía peruana cambia de una localidad a otra, generando múltiples escenarios, únicos, que se caracterizan por la presencia de personas con infecciones que no producen síntomas aparentes y que tienen muy pocos parásitos circulando en la sangre, no pudiendo ser diagnosticadas por el método estándar, permaneciendo sin tratamiento, y sobretodo manteniendo la transmisión a través del tiempo (Roshanravan *et al.*, 2003). Para resolver esta situación se necesitan nuevas herramientas, tanto para el diagnóstico y manejo clínico de los casos de malaria (tratamiento inmediato), así como para el monitoreo de la transmisión y el efecto de las medidas de control implementadas (Bell *et al.*, 2016; The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

Diversos autores coinciden en que los estudios seroepidemiológicos, utilizando biomarcadores de exposición, son una manera costo-efectiva de monitorizar la transmisión de malaria en el tiempo (Cook *et al.*, 2010; Corran *et al.*, 2007; Corran *et al.*, 2008; Drakeley & Cook, 2009; Drakeley *et al.*, 2005), y varias proteínas han mostrado potencial para ser utilizadas como antígenos en el

monitoreo de la exposición a malaria; entre ellas, MSP10 de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* destacan por su alta inmunogenicidad (Baum *et al.*, 2015; Chuquiyauri *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015); no obstante, la información disponible aún no es suficiente para utilizarla directamente en el monitoreo de la transmisión, y existen preguntas importantes por resolver como: ¿cuál es la diferencia con el nivel de anticuerpos dirigidos contra este antígeno en los sujetos no expuestos?, ¿cuál es el efecto de las características de hospedero sobre la el nivel de anticuerpos dirigidos contra este antígeno? y ¿cuáles son las variaciones en la secuencia génica de los parásitos circulantes? (Elliott *et al.*, 2014; King *et al.*, 2015).

Este estudio tuvo como propósito comparar la respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP10 entre sujetos de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide, del área de Iquitos, que adquirieron malaria por *P. vivax* y aquellos que permanecieron sin infección, durante un periodo de seguimiento de cinco meses. determinando los factores del hospedero asociados al nivel de respuesta como la edad y numero de exposiciones, además de factores relacionados al parásito como los polimorfismos de la secuencia del gen (*pvx114145*) que codifica para este antígeno, circulantes en las zonas de estudio.

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema

La Malaria resurgió nuevamente en el Perú desde el año 2012. Durante el año 2016, se registraron 55 904 casos de malaria, y en lo que va el año 2017, hasta la semana epidemiológica 26, ya se reportaron 25 584 casos; la mayoría de estos han sido registrados en Loreto y el 70 % de ellos fueron causados por *Plasmodium vivax* (Dirección General de Epidemiología. Ministerio de Salud, 2017). Dentro de esta estadística, el número de casos reportados, y por ende la estimación de la transmisión, están subestimados, debido a que el registro que lleva a cabo el Ministerio de Salud está basado principalmente en infecciones sintomáticas y microscópicas, captadas en los establecimientos de salud, las cuales solo constituyen una pequeña parte de la totalidad de infecciones que ocurren en la población (Alves *et al.*, 2002; Branch *et al.*, 2005; Roshanravan *et al.*, 2003).

Este escenario puede cambiar si se desarrollan nuevas herramientas para el monitoreo de infecciones, que nos permitan medir el nivel real de transmisión de malaria, en el diseño de estrategias de control costo-eficientes (Elliott *et al.*, 2014; King *et al.*, 2015).

Varios autores (Baum *et al.*, 2015; Chuquiyauri *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015) coinciden en que la *Merozoite Surface Protein 10* de *Plasmodium* tiene potencial para ser utilizada en estudios seroepidemiológicos (medición de los anticuerpos como biomarcadores de la exposición, transmisión e inmunidad). Sin embargo, aún se desconocen aspectos importantes de la respuesta inmune

en los sujetos no expuestos a la infección de malaria, la cinética de la producción de los anticuerpos dirigidos contra esta proteína, el efecto de las características de hospedero, como la edad y episodios previos de infección sobre el nivel de anticuerpos y las variaciones circulantes en la secuencia del gen que codifica para esta proteína.

Para obtener nuevo conocimiento sobre el uso de la medición de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10 como marcador de exposición a malaria por *P. vivax*, este trabajo propuso comparar las respuestas serológicas contra el antígeno PvMSP-10 entre sujetos que adquieren malaria por *P. vivax* y aquellos que permanecen sin infección durante un periodo de seguimiento de 5 meses, y determinar los factores asociados al nivel de respuesta.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Situación de la malaria

La malaria es causa importante de morbilidad y mortalidad en muchos lugares del mundo, y tiene impacto negativo sobre la economía y salud de la población (Zoghi *et al.*, 2012). Desde una perspectiva histórica, como producto del escalonamiento de las intervenciones de control, los casos de malaria a nivel mundial se han reducido considerablemente durante los últimos 17 años; así, las tasas de incidencia y mortalidad se han reducido en un 62 y 41%, respectivamente (Naciones Unidas, 2015). Sin embargo; tres billones de personas, en 97 países, aún están en riesgo de contraer malaria y para el año 2015 se estimó que ocurrieron 212 millones de casos de malaria, de los cuales 429 000 terminaron en muerte (World Health Organization, 2016), y es considerada una de las primeras nueve causas de enfermedad y muerte en el mundo (Alemu *et al.*, 2013).

En el Perú, con la implementación de distintos programas de control, dentro de los cuales resalta el proyecto “Control de la Malaria en Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario” – PAMAFRO, se logró la reducción de los casos de malaria, logrando al año 2011 la incidencia más baja de casos del último decenio (Soto-Calle *et al.*, 2017); sin embargo, con el término de estos programas, desde el año 2012 en adelante, el número de casos se incrementó de forma constante, llegando a triplicarse durante el año 2014. Este incremento de casos se produjo junto con la concentración de éstos en la región Loreto, que en los últimos cuatro años, aportó más del

90% de total de casos en el país (Figura 1) (Dirección General de Epidemiología. Ministerio de Salud, 2017).

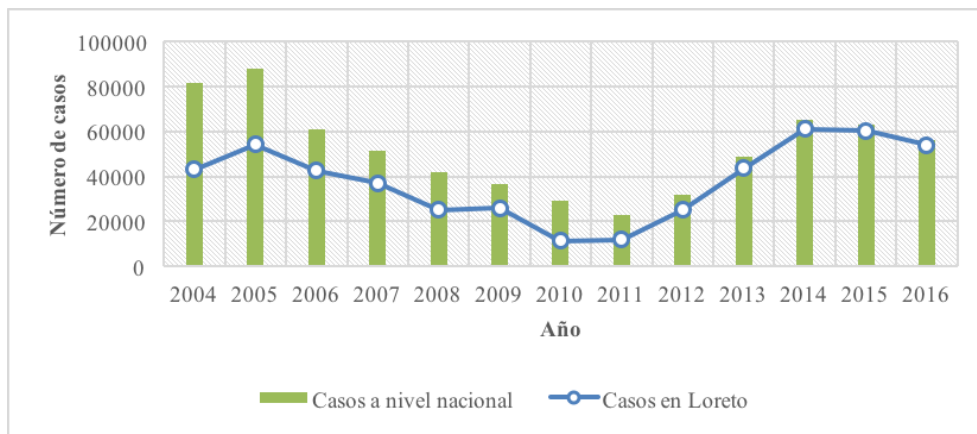


Figura. 1. Casos de malaria en el Perú durante los años 2004 a 2016.

Elaborado a partir de los datos de la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú (Dirección General de Epidemiología. Ministerio de Salud, 2017).

2.2.2. Malaria en la Amazonía Peruana

La transmisión de malaria en la Amazonía Peruana tiene un perfil heterogéneo, con zonas de alta y baja transmisión, y es dependiente de la estacionalidad (Bautista *et al.*, 2006; Branch *et al.*, 2005; Branch *et al.*, 2011; Soto-Calle *et al.*, 2017). Estudios previos han demostrado que algunas de estas zonas, consideradas convencionalmente como de baja transmisión, albergan una gran cantidad de infecciones asintomáticas y de muy baja parasitemia (Branch *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2012; Roshanravan *et al.*, 2003).

Una persona con infección asintomática es aquella que alberga estadios sanguíneos del parásito y que no experimenta fiebre u otros síntomas como náuseas o dolor de cabeza, y cuya parasitemia puede ser visible en frotis de sangre (microscópica), o sólo detectable por métodos moleculares (submicroscópica) (Alves *et al.*, 2002; Bousema *et al.*, 2014; Branch *et al.*, 2005; Roshanravan *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2015). Es importante mencionar qué, a diferencia de otras regiones del mundo, la parasitemia asintomática por *Plasmodium spp* en la Amazonía Peruana ocurre en aparente ausencia de una transmisión intensa de malaria (Branch *et al.*, 2005; Roshanravan *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2015; Van den Eede *et al.*, 2011).

En el Perú, la captación, registro y monitoreo de casos por parte del Ministerio de Salud se realiza, principalmente, mediante vigilancia pasiva, o dependiente de síntomas, en la cual, la persona infectada que desarrolla síntomas sugerentes de malaria acude al establecimiento de salud más cercano buscando tratamiento, y el diagnóstico microscópico se cumple como requisito para la administración del tratamiento farmacológico (Ministerio de Salud, 2007). Los sujetos asintomáticos, al no buscar tratamiento, resultan ser invisibles para el sistema de salud (Organización Mundial de la Salud, 2015), no obstante, permanecen infecciosos para los mosquitos y se estima que son responsables del 20 a 50% total de episodios de transmisión (Branch *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2013). Diversos autores coinciden en que, sin la eliminación de este *pool* infeccioso puede ser

imposible interrumpir la transmisión (Bell *et al.*, 2016; Bousema *et al.*, 2014; Cotter *et al.*, 2013; Roshanravan *et al.*, 2003).

La proporción entre los tipos de infección (sintomática, asintomática, microscópica o sub microscópica) varía de una localidad a otra, de acuerdo al escenario de transmisión, tal como ocurre en la Amazonía Peruana. En general, la proporción de infecciones asintomáticas supera a la proporción de infecciones sintomáticas, y son submicroscópicas en su mayoría (Alves *et al.*, 2002), pero en los escenarios de baja transmisión el número de infecciones que son asintomáticas y submicroscópicas es mayor de lo encontrado en alta transmisión (Lin *et al.*, 2014).

2.2.3. La seroepidemiología en el estudio de la transmisión de malaria

La existencia de escenarios heterogéneos de transmisión genera la necesidad de contar con nuevas herramientas para el diagnóstico y monitoreo de la transmisión. Esto se debe a que las herramientas utilizadas en la actualidad se ven afectadas por la intensidad de transmisión en la zona de estudio, o el costo de su implementación impide su uso masivo (Bell *et al.*, 2016; da Silva-Nunes *et al.*, 2012).

Debemos **diferenciar dos propósitos** para estas nuevas herramientas a desarrollar: guiar el manejo de casos, ó guiar las estrategias de control y eliminación (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011). Por ejemplo, a diferencia de lo que ocurre durante el manejo de casos, durante la vigilancia epidemiológica la administración del

tratamiento inmediato no es el propósito principal. Esto permite recolectar y acumular las muestras en lote, generando ahorro mediante el procesamiento en *batch* (Bell *et al.*, 2016; Tietje *et al.*, 2014). Esta separación permite conducir los esfuerzos hacia la eficiencia en el desarrollo de pruebas adecuadas al propósito y escenario epidemiológico donde serán aplicadas (Bell *et al.*, 2016; Elliott *et al.*, 2014; Tietje *et al.*, 2014).

La respuesta inmune mediante anticuerpos producidos por el hospedero frente a la infección por el parásito, además de brindar protección contra la enfermedad, puede ser utilizada como un biomarcador de exposición (Branch *et al.*, 2005; Drakeley & Cook, 2009; Drakeley *et al.*, 2005). La exposición, para este caso, puede ser definida como la infección por *Plasmodium spp.*, de forma independiente a la del desarrollo de los síntomas de la enfermedad. La seroepidemiología, o serovigilancia, utiliza la medida de los anticuerpos como biomarcadores para la medición de la exposición, transmisión e inmunidad (Elliott *et al.*, 2014).

Diversos autores han sugerido que la medición de anticuerpos contra los antígenos de *Plasmodium spp* puede resultar de mucha utilidad en los estudios epidemiológicos. Ello se debe a que la presencia de anticuerpos más allá de expresar el contacto entre el hospedero humano y el parásito representa la interacción de ambos en el tiempo (Drakeley & Cook, 2009), y pueden ser medidos de forma robusta y con alto rendimiento, aún en escenarios de muy baja transmisión (Branch *et al.*, 2005; Drakeley & Cook, 2009).

La prolongación del tiempo de respuesta serológica de anticuerpos permite la evaluación del éxito de las medidas de control y la identificación de poblaciones en riesgo de re-introducción, donde la posibilidad de detectar infecciones en curso es muy baja, a través de la medición de la exposición (Branch *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2013).

Las potenciales aplicaciones de los estudios seroepidemiológicos dentro de los programas de control de malaria incluyen la estimación del nivel de transmisión de malaria en la población, la monitorización de las tendencias en la transmisión en periodos largos de tiempo, la evaluación de las intervenciones de control, la identificación de poblaciones con exposición reciente, la identificación de hotspots y hotpops, confirmación de la eliminación de malaria, y la identificación de poblaciones en riesgo (Elliott *et al.*, 2014; King *et al.*, 2015).

2.2.4. Selección de los antígenos para uso en estudios seroepidemiológicos

Elliott *et al.* han presentado un modelo para el desarrollo de nuevas herramientas para su uso en estudios seroepidemiológicos dentro de los programas de control de malaria. Dentro del ellos describe algunos criterios importantes para la selección de los antígenos a utilizar, que coinciden con lo expuesto por otros autores (Bell *et al.*, 2016; Elliott *et al.*, 2014; King *et al.*, 2015; Sturrock *et al.*, 2016; Tietje *et al.*, 2014). Las propiedades del antígeno que definen su potencial en estudios epidemiológicos incluyen: la capacidad de generar respuesta serológica de anticuerpos que permanezcan

en el tiempo, la falta de reacción cruzada entre especies, y la ausencia de polimorfismos importantes en su secuencia.

La dinámica de la adquisición y persistencia de los anticuerpos contra un antígeno varía debido a factores que determinan el nivel de exposición al sistema inmune, como la duración de su expresión, el nivel de expresión, y su estabilidad. Sin embargo; otros factores también afectan esta dinámica, y son dependientes del hospedero, como la edad, estado inmune de los sujetos infectados, además del número de veces que un individuo es expuesto y el periodo de tiempo en el cual estas exposiciones ocurren (Faddy *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2008). Por lo tanto, la información que proporciona la cuantificación de los niveles de anticuerpos puede variar de acuerdo al escenario en el cual se está evaluando y la edad de los sujetos a investigar (King *et al.*, 2015); pero asimismo, esta información permitiría determinar el nivel de exposición al patógeno (Wilson *et al.*, 2007).

La reacción cruzada entre antígenos de distintas especies de *Plasmodium* es algo que no ha sido estudiado a profundidad, dada la gran cantidad de antígenos comunes y otros factores, como la co-transmisión de ambas especies dentro de un mismo escenario, pero que ha sido observado de forma general en algunos estudios (Baum *et al.*, 2015). De otra parte, debe tenerse especial interés en los polimorfismos que puedan hallarse los antígenos a utilizar, ya que pueden comprometer la sensibilidad de las pruebas y que ha sido documentado con anterioridad (Putaporntip *et al.*, 2009).

Un factor importante a considerar es la sensibilidad de la técnica utilizada para la detección de los anticuerpos, ya que hipotéticamente los ensayos con mayor sensibilidad deberían detectar los anticuerpos por periodos mayores de tiempo (Faddy *et al.*, 2013). Diversos estudios, tanto en el Perú como en otras partes del mundo, han utilizado la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos en suero contra proteínas de *Plasmodium*, la cual es una técnica de costo moderado, de alto rendimiento y relativamente sencilla de utilizar (Branch *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2010; Elliott *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2008; Villasis *et al.*, 2012).

2.2.5. El ciclo de vida de *Plasmodium spp*

La malaria es causada por un parásito unicelular perteneciente al género *Plasmodium*. Existen más de 100 especies en este género, de las cuales cuatro causan malaria humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* y se transmiten de persona a persona, mediante la picadura de la hembra de un mosquito vector perteneciente al género *Anopheles*; aunque también se han reportado casos de malaria causados por *P. knowlesi*, una especie que causa malaria en monos, y su transmisión ocurre en ciertas regiones de Asia sudeste (World Health Organization, 2016).

La transmisión de malaria suele definirse como el proceso por el cual el parásito completa su ciclo de vida (Tusting *et al.*, 2014). Este ciclo (Figura 2), empieza cuando la hembra infectada de un mosquito *Anopheles spp*, al alimentarse de la sangre del hospedero, inyecta los esporozoítos del parásito dentro de la piel, los cuales entran al torrente sanguíneo y linfático, llegando

a los hepatocitos, infectándolos y multiplicándose masivamente, madurando hasta formar esquizontes, los cuales provocan la ruptura del hepatocito, liberando merozoitos maduros (ciclo extra-eritrocítico). Los merozoitos producidos en el hígado se dirigen al torrente sanguíneo, en donde invaden a los eritrocitos, pasando los los estados de trofozoito inmaduro (anillo), trofozoito maduro, y esquizonte. El esquizonte maduro rompe el eritrocito, liberando merozoitos que se dirigen a invadir nuevos eritrocitos en un ciclo que se repite continuamente. (ciclo eritrocítico). Algunos parásitos no completan el ciclo eritrocítico y se diferencian en los estadios sexuales, o gametocitos, que ingresan a otra hembra de un mosquito *Anopheles spp* cuando se alimenta. Dentro del insecto, los gametocitos masculino y femenino se fertilizan entre sí formando cigotos diploides que, a su vez, se diferencian hacia ovoquinetos y se localizan en el interior de la pared del intestino medio del mosquito (ciclo sexual). Cada ovoquinete da lugar a un ovoquiste que contiene hasta 1 000 esporozoitos que salen hacia el exterior y son transportados por la hemolinfa del insecto hasta sus glándulas salivales, donde permanecen hasta que por una picadura sean introducidos al siguiente hospedero (Gazzinelli *et al.* 2014; Mandal, 2014; Mandell *et al.*, 2010).

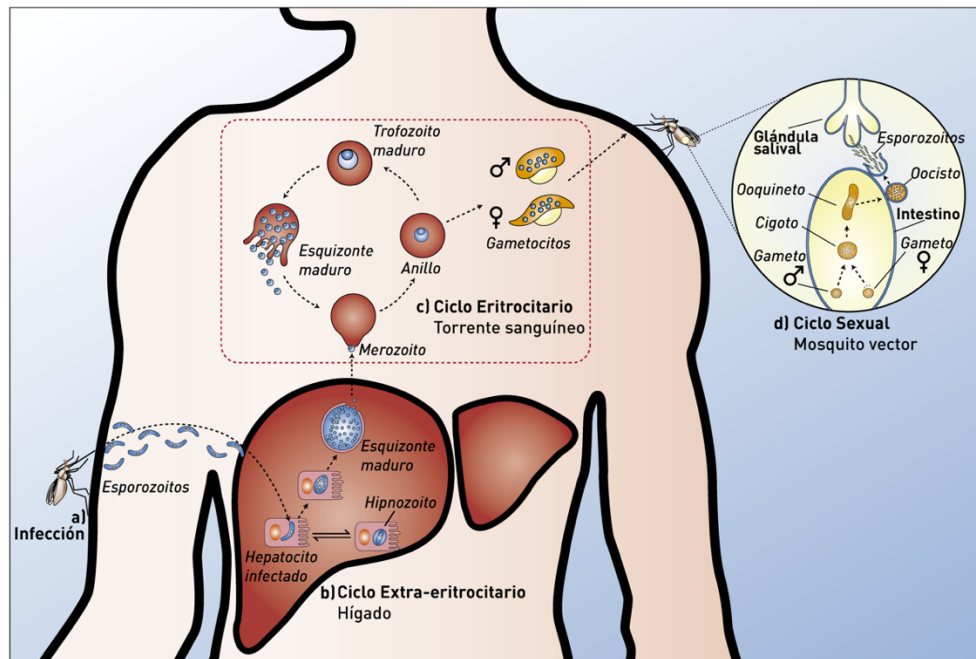


Figura. 2. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Al alimentarse, la hembra infectada de *Anopheles* spp inyecta los merozoitos en el hospedero, los cuales se dirigen al hígado (ciclo extra-eritrocitario, b) para formar merozoitos que se dirigen al torrente sanguíneo, donde infectan los eritrocitos (ciclo eritrocitario, c). Algunos trofozoitos inmaduros se diferencian en gametocitos, los cuales al infectan a otra hembra de *Anopheles*, se dirigen al intestino del insecto, donde se unen formando un cigoto (ciclo sexual, d). Elaboración propia.

El ciclo de *P. vivax* incluye el desarrollo de un estadio dormante durante el ciclo hepático, denominado hipnozoito (Figura 2b), al cual se atribuyen los relapsos de la enfermedad, que suelen suceder en semanas, meses o años posteriores a la infección (Mandell *et al.*, 2010).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son atribuidas al ciclo eritrocítico del parásito, y pueden variar desde formas asintomáticas, hasta formas severas y fatales (Zoghi *et al.*, 2012). Nueve de cada diez casos

fatales se dan en África y los restantes en Asia y América (Alemu *et al.*, 2013). *P. vivax* y *P. falciparum* son las especies más prevalentes en los casos de malaria y, aunque los casos de *P. vivax* tienen una distribución geográfica más amplia que los de *P. falciparum*, son los casos producidos por *P. falciparum* aquellos que tienen las mayores tasas de mortalidad (World Health Organization, 2016).

2.2.6. La invasión del eritrocito por *Plasmodium spp.*

El proceso de invasión del eritrocito, es uno de los pasos más importantes en el ciclo de vida de *Plasmodium*. Una vez que son liberados del esquizonte, los merozoítos pueden tardar varios minutos para entrar en contacto con los eritrocitos; sin embargo, sólo tardan algunos segundos en ingresar a ellos (Gilson & Crabb, 2009). Este proceso rápido de invasión está dirigido por proteínas que cubren la superficie del merozoíto, y que tienen características químicas, funcionales y estructurales diversas, que sirven como base para su clasificación y que han sido revisadas ampliamente por Beeson *et al.*, 2016, Figura 3). Aunque la mayoría de proteínas que participan del proceso de invasión han sido estudiadas en modelos de *P. falciparum*, es de esperar que éstos sean similares en *P. vivax*, dada la presencia de una gran cantidad de genes ortólogos (Moreno-Pérez *et al.*, 2015).

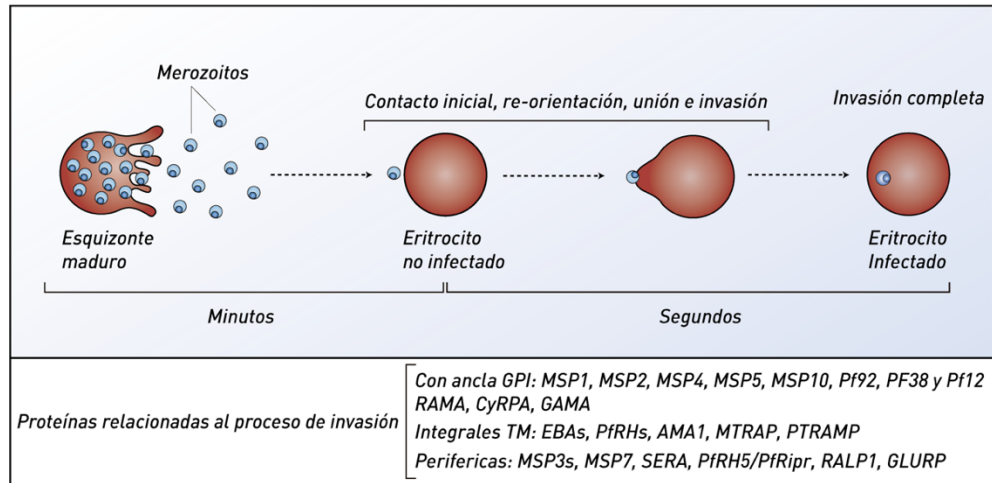


Figura 3. Invasión del eritrocito. El proceso de invasión del eritrocito está dirigido por abundantes proteínas que cubren la superficie del merozoíto, entre las cuales destaca la familia de proteínas MSP. Elaboración propia.

Las proteínas fijadas a la membrana del merozoíto por una ancla de glicofosfatidilinositol (GPI) incluyen MSP1 (*Merozoite Surface Protein 1*), MSP2, MSP4, MSP5, MSP10, Pf92, PF38 y Pf12, y aunque estas se mantienen en la superficie del merozoíto durante todo el estadio, otras proteínas de esta categoría permanecen en otros organelos celulares hasta el momento de la invasión. Tal es el caso de RAMA (*Rhoptry Associated Membrane Antigen*), que se re-dirige desde las roptrias, así como CyRPA (*Cysteine-Rich Protective Antigen*) y GAMA (*GPI-anchored Micronemal Antigen*), que se re-dirigen desde el micronema (Beeson *et al.*, 2016).

Algunas proteínas integrales de membrana también participan, directa o indirectamente, en el proceso de invasión. Dentro de estas tenemos a las familias de proteínas EBA (*Erythrocyte Binding Antigen*) y PfrH (*Reticulocyte binding-like Homologous*), AMA1 (*Apical Membrane*

Antigen 1), MTRAP (*Merozoite-specific Thrombospondin-related Anonymous Protein*) y PTRAMP (*Thrombospondin-related Apical Membrane Protein*) (Beeson *et al.*, 2016). De otra parte, las proteínas asociadas periféricamente no tienen anclas GPI o dominios transmembrana que las mantengan unidas directamente a la superficie del merozoito. Estas incluyen las familias MSP3 (MSP3.1 - MSP3.8), MSP7, SERA (*Serine-rich Antigen Family*) , PfrH5/PfRipr (*PfRH5-interacting-protein*), RALP1 (*Rhoptry-Associated Lecine zipper-Like Protein 1*) and GLURP (*Glutamate-rich protein*) (Beeson *et al.*, 2016).

2.2.7. Merozoite Surface Protein 10

Predicciones bioinformáticas sobre el borrador del genoma de la cepa 3D7 de *P. falciparum* condujeron a la identificación de la proteína MSP10 (Black *et al.*, 2003) y posteriormente, un homólogo fue identificado en *P. vivax* (PvMSP10) (Perez-Leal *et al.*, 2005) y otras especies relacionadas (Pacheco *et al.*, 2012).

PvMSP10 es una proteína de 479 aminoácidos, codificada en un ORF (*Open Reading Frame*) de 1440 pb. Su expresión se produce durante los estadios asexuales del parásito, con un producto de aproximadamente 52.3 kDa. El análisis bioinformático ha identificado dos regiones hidrofóbicas en su secuencia, que son compatibles con un péptido señal en el extremo N-terminal, y un ancla GPI en el extremo C-terminal. De igual manera se han identificado dos dominios *EGF-like* (*Epidermal Growth Factor-like*) en la porción C-terminal, los cuales tienen un 68% de identidad con aquellos

identificados en su homólogo de *P. falciparum* (Figura 4). Al igual que en otras MSPs, esta proteína pasa, por al menos, una modificación post-traduccional, que permite el corte de la región estimada como péptido señal. Asimismo, se ha demostrado su ubicación en la superficie del parásito (Perez-Leal *et al.*, 2005).

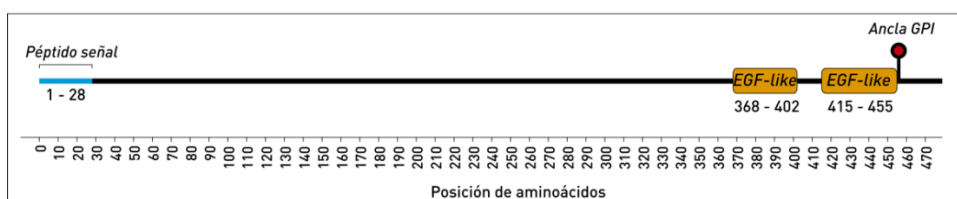


Figura 4. Esquema de la estructura de la proteína PvMSP10. Se muestra la localización del péptido señal, dominios *EGF-like* y ancla GPI. . Elaboración propia.

Los dominios *EGF-like* de PvMSP10 y PfMSP10 han sido asociados a los procesos de invasión del eritrocito, en los cuales participan mediando probablemente la unión al eritrocito, o con la interacción con otras proteínas del parásito (Black *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2014; Maskus *et al.*, 2015; Pacheco *et al.*, 2012). Esta función en la invasión del eritrocito, sumada a su localización en la superficie del parásito, hacen posible que la proteína sea expuesta a los componentes del sistema inmune del hospedero, lo cual ha sido comprobado con el hallazgo de respuesta celular y humoral en pacientes con malaria (Black *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2014; Perez-Leal *et al.*, 2005).

En este sentido, la respuesta humoral, o de anticuerpos, contra PfMSP10 y PvMSP10 ha sido estudiada por diversos autores. En un primer estudio,

Black *et al* demostraron que la proteína recombinante de PfMSP10, expresada en *E. coli*, fue reconocida por el suero de 44 pacientes con malaria, procedentes de Papua Nueva Guinea y Vietnam, pero no por el suero de 30 pacientes no inmunes. Esta reactividad, fue mayor sobre el extremo C-terminal que el N-terminal de la proteína (Black *et al.*, 2003). Poco tiempo después, Pérez-Leal *et al* determinaron que la proteína PvMSP10 recombinante, producida en un sistema de expresión similar, fue reconocida por el suero de 23 pacientes con infección patente de malaria procedentes de Colombia, comparados con tres pacientes sanos (Perez-Leal *et al.*, 2005). En ambos casos la técnica utilizada para medir la reactividad fue un ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) indirecto, y el punto de corte para definir la positividad fue determinado como la media más tres desviaciones estándar de la reacción en los controles sanos.

Cheng *et al* utilizando PvMSP10 recombinante expresada en un sistema libre de células WGCF (*wheat-germ cell-free*), y evaluada en microarreglos, demostraron la reactividad del suero de 112 pacientes con infección patente de malaria por *P. vivax* en una región endémica de Korea frente a 80 muestras de pacientes, residentes de otra región, que no fueron expuestos a malaria. En este caso el punto de corte para determinar la reactividad fue la media mas dos desviaciones estándar de la intensidad media de fluorescencia de los controles negativos (Cheng *et al.*, 2014).

Investigaciones recientes utilizando microarreglos de proteínas permitieron la identificación de un conjunto amplio de antígenos con potencial para ser

utilizados en estudios epidemiológicos conducidos en áreas endémicas. Chuquiyaui *et al*, realizaron un análisis de microarreglos de 2 233 proteínas recombinantes del estadio asexual de *P. vivax*, expresadas en un sistema de *E. coli*, con el objetivo de identificar antígenos reconocidos sólo por el suero de 106 personas residentes en una región hipoendémica de la Amazonía Peruana, comparándolos con la reacción obtenida con el suero de personas residentes en Estados Unidos que no fueron expuestos a Malaria. Luego de un periodo de seguimiento de 24 meses, 91 de los sujetos adquirieron malaria patente por *P. vivax*, en un número variable de episodios. Se encontraron 304 proteínas reactivas, de entre las cuales MSP4, MSP7, MSP8, MSP10; el antígeno de etapa sexual s16; ETRAMP (*Early Transcribed Membrane Protein*); Pv-fam-a (antígeno rico en triptófano); AMA1 y 8 proteínas de función desconocida (PVX_081830, PVX_117680, PVX_118705, PVX_121935, PVX_097730, PVX_110935, PVX_115450, PVX_082475) fueron las más reactivas. El antígeno que obtuvo la mayor reactividad con los sueros evaluados fue PvMSP10 (Chuquiyaui *et al.*, 2015).

Con una aproximación similar, Torres *et al* evaluaron un microarreglo de 824 proteínas del estadio asexual de *P. falciparum*, utilizando 38 muestras de suero, correspondientes a 24 pacientes sintomáticos y 14 pacientes asintomáticos procedentes de una región hipoendémica de la Amazonía Peruana. Dentro de sus resultados más importantes, se encuentra un conjunto de cinco proteínas que fueron altamente reactivas en ambos grupos. Estas son PF70 (PF10_0025), dos proteínas de función desconocida

(PF070053, PFA0410), PmMSP10 (PFF0995c) y un factor de transcripción putativo (PF100075) (Torres *et al.*, 2015).

Finalmente, Baum *et al* analizaron la respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG contra proteínas de *P. vivax* y *P. falciparum* de pacientes que fueron parte de una cohorte de cinco meses en una comunidad centinela de Tailandia y de un centro donde se atienden pacientes con sospecha de malaria, ubicados en una región de baja transmisión en Asia. Luego del diagnóstico por microscopía y qPCR, los pacientes provenientes de la comunidad fueron seleccionados de acuerdo a su edad y agrupados en 80 expuestos sanos y 13 expuestos asintomáticos, mientras que, aquellos provenientes del centro de atención, fueron agrupados en 26 expuestos sintomáticos y 34 expuestos sin infección actual de malaria. Adicionalmente, 12 muestras de personas residentes en Estados Unidos de América, sin antecedentes de exposición a malaria, fueron utilizadas como control. La evaluación se realizó utilizando un microarreglo de 500 proteínas recombinantes de *P. falciparum* y 515 proteínas recombinantes de *P. vivax*. En los expuestos, pero no en las muestras control, PmMSP10 fue la proteína con la mayor seroprevalencia, siendo reconocida por el 100% de los pacientes positivos a qPCR y más del 90% de muestras negativas de los pacientes que provenían de la comunidad o del centro de atención de malaria. Al hacer las comparaciones entre los grupos de expuestos, MSP10 de *P. vivax* y *P. falciparum* fue reconocida de forma similar por las muestras de todos los cohortes de expuestos (Baum *et al.*, 2015).

Aunque la información que respalda su potencial uso de MSP10 en estudios seroepidemiológicos continúa en crecimiento, la información disponible sobre los polimorfismos en su secuencia es aún muy limitada. La poca información sobre la diversidad genética y los polimorfismos en su secuencia procede de estudios realizados en un número pequeño de cepas tipo de laboratorio (Black *et al.*, 2003) o aislamientos de otras regiones del mundo (Pacheco *et al.*, 2012), no habiendo a la fecha estudios que hayan determinado los polimorfismos circulantes en la región amazónica peruana.

El estudio más significativo al respecto fue realizado por Garzón *et al.*, quienes estudiaron la diversidad genética de las proteínas MSP-7 y MSP-10 de *P. vivax*, en aislamientos clínicos de cinco regiones geográficas de Colombia, incluyendo la Amazonía Colombiana, y comparándola con la diversidad genética hallada en cepas tipo de origen Salvadoreño y Coreano. Sus resultados muestran una diversidad genética limitada para PvMSP-10, pero además que sustituciones que ocurren en la cepa Coreana no se encuentran en los aislados de origen colombiano, sugiriendo una diferenciación genética entre las cepas de distinto origen geográfico (Garzón-Ospina *et al.*, 2011).

2.3. Justificación

La existencia de zonas de alta y baja transmisión de malaria en la Amazonía Peruana ha generado la necesidad de contar con nuevas herramientas de diagnóstico, que deben cumplir con requisitos diferentes, de acuerdo a si serán utilizadas en el manejo de casos o en el *screening* o vigilancia de casos en la población (Bell *et al.*, 2016; The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011). De acuerdo con el Proyecto de Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030, el fortalecimiento de la vigilancia es fundamental para la planificación y ejecución de los programas de control, y como tal constituye un factor decisivo para acelerar y mantener los progresos que se puedan alcanzar en materia de control y la eliminación (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Los estudios seroepidemiológicos permiten obtener información importante sobre la transmisión de malaria en escenarios heterogéneos como el de la Amazonía Peruana, donde la posibilidad de detectar infecciones en curso utilizando los métodos estándar es muy baja (Roshanravan *et al.*, 2003; Branch *et al.*, 2005; Van den Eede *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014; King *et al.*, 2015)

La proteína MSP10 ha sido propuesta como un potencial biomarcador de exposición a *Plasmodium spp* (Baum *et al.*, 2015; Chuquiyaury *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015), pero aún se desconocen aspectos importantes sobre la respuesta serológica de anticuerpos en sujetos no expuestos, la cinética de producción y mantención de anticuerpos contra este antígeno, la influencia de factores propios del hospedero como la edad, tiempo de infección y la

exposición anterior sobre el nivel de respuesta, así como si dentro de las clonas del parásito que circulan en las zonas de transmisión existen polimorfismos que puedan conducir a la pérdida de la producción de anticuerpos contra a este antígeno.

Este estudio proporcionará nuevo conocimiento sobre los niveles de anticuerpos tipo IgG específicos contra PvMSP-10 en poblaciones naturalmente expuestas y sobre la influencia de factores como la edad, tiempo de infección y la exposición anterior, así como la existencia de polimorfismos, permitiendo determinar si la medición de anticuerpos contra PvMSP10 puede ser utilizada como marcador de exposición a malaria por *P. vivax* y en consecuencia brindar una herramienta importante para la medición de la transmisión de la malaria en el Perú.

2.4. Hipótesis

El nivel de anticuerpos IgG específicos contra PvMSP-10 en sujetos expuestos a *Plasmodium vivax* es mayor que en aquellos que no han sido expuestos, y está asociado a la edad del hospedero, el tiempo de infección, y la ocurrencia de episodios previos, sin la influencia de polimorfismos en la secuencia génica del antígeno.

2.5. Objetivos

2.5.1. Objetivo general

- Comparar el nivel de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10 entre sujetos expuestos y no expuestos a *Plasmodium vivax*, determinar los factores del hospedero asociados al nivel de anticuerpos, y los polimorfismos de la secuencia del gen *pvx114145*.

2.5.2. Objetivos específicos

- Explorar la influencia de la edad del hospedero sobre el nivel de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10.
- Explorar la influencia del tiempo de infección sobre el nivel de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10.
- Explorar la influencia de la ocurrencia de episodios previos sobre el nivel de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10.

- Determinar los polimorfismos de la secuencia del gen que codifica para el antígeno PvMSP-10 (*pvx114145*) presentes en las poblaciones de estudio.
- Determinar el efecto de la edad, tiempo de infección y episodios previos en el hospedero sobre los niveles de IgG específicos contra PvMSP10.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño del estudio y colección de datos

Este estudio estuvo anidado en el proyecto del Amazonian International Center of Excellence for Malaria Research (ICEMR-Amazonía), el cual llevó a cabo un cohorte poblacional en los centros poblados de Cahuide y Lupuna, de la ciudad de Iquitos, desde agosto 2012 hasta diciembre 2015. En agosto 2012, se realizó un censo en el cual los participantes respondieron una encuesta que reúne datos demográficos y socioeconómicos básicos, y características de la vivienda. Todas las casas y habitantes fueron codificadas y geo-referenciadas utilizando un dispositivo de posicionamiento geográfico global (Garmin's GPSMAP 60CSx, Garmin International Inc., USA).

Utilizando una estrategia de detección activa de casos (DAC), se realizó el diagnóstico microscópico mensual mediante gota gruesa y frotis (GG) a todos los miembros de la familias enroladas en el proyecto. Las personas que resultaron positivas a los estadios sanguíneos del parásito recibieron tratamiento antimalárico, siguiendo lo indicado en las normas nacionales (Ministerio de Salud del, 2007). Durante estas visitas se recolectaron, adicionalmente, muestras de sangre en papel filtro (Whatman grado 3, Whatman, Springfield Mill, EE.UU.), para el diagnóstico molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (qPCR). Se realizó el diagnóstico de malaria por qPCR en las muestras de sangre en papel filtro tomadas al inicio del estudio en agosto-setiembre 2012, y en las tomadas en diciembre de 2012.

En enero 2013, previo consentimiento ó asentimiento informado, se realizó una venopunción para recolectar muestras adicionales de sangre total (6 mL para los adultos y 3 mL para los niños) en tubos con EDTA como preservante (BD Vacutainer, BD Franklin Lakes, USA). Estas muestras fueron separadas por centrifugación (3 500 rpm) en plasma y paquete globular y almacenadas a -70°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Malaria del LID-UPCH.

Para la comparación de la respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP10 en los grupos de interés de este estudio, se utilizó un diseño de cohorte retrospectivo, donde fueron seleccionadas muestras de plasma y paquete globular de personas residentes en las comunidades muestreadas por el ICEMR-Amazonía, colectadas en enero 2013, que contaban con seguimiento completo del estado de infección por GG y muestras completas de sangre en papel filtro a partir de la fecha de enrolamiento por el ICEMR-Amazonía (agosto-setiembre 2012). Las muestras de plasma se utilizaron para la determinación de anticuerpos anti PvMSP-10, y el paquete globular se usó para el diagnóstico por qPCR. Los participantes con muestras incompletas de GG, sangre en papel filtro, plasma, paquete globular y/o adquirieron infecciones por *P. falciparum* fueron excluidos del estudio (Figura. 5).

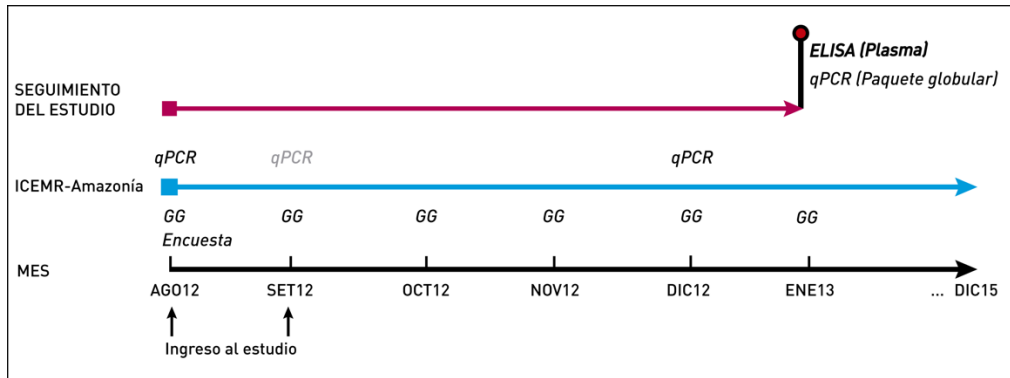


Figura 5. Diseño para la comparación de la respuesta serológica de anticuerpos IgG específicos contra PvMSP-10 en los grupos de interés.

Para determinar los polimorfismos del gen que codifica para el antígeno PvMSP-10 (*pvx114145*) se seleccionaron muestras de ADN extraído a partir de las muestras de sangre en papel filtro con diagnóstico positivo para *P. vivax*, procedentes del área de estudio, que fueron colectadas por el ICEMR-Amazonía durante el periodo agosto 2012 a septiembre 2015. Antes de ser seleccionadas, las muestras fueron agrupadas según la estación (alta y baja transmisión), de acuerdo a la prevalencia hallada por GG (ICEMR-Amazonía, publicación en preparación). Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente hasta completar el tamaño muestral calculado. Las muestras que no contaban con material genético disponible fueron excluidas del análisis. El gen completo se amplificó utilizando *primers* específicos diseñados para este fin. Una vez amplificado, el producto fue purificado y secuenciado con el Método de Sanger (Figura 6).

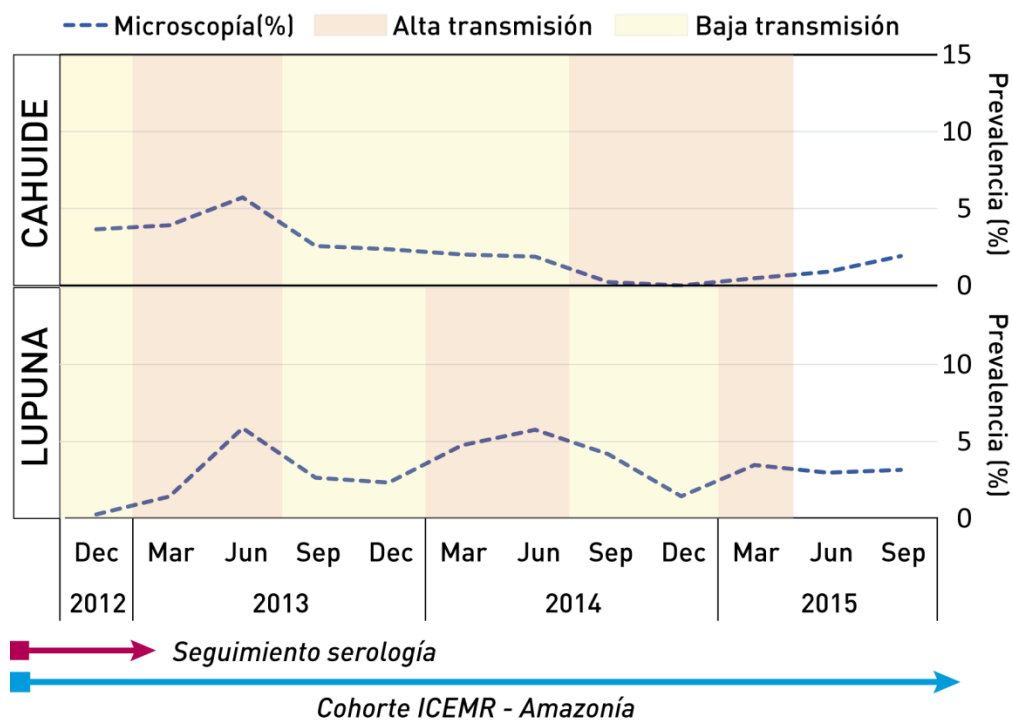


Figura 6. Diseño para la determinación de los polimorfismos del gen *pvx114145*, que codifica para el antígeno PvMSP-10.

3.2. Población

La población de estudio estuvo comprendida por dos zonas del área de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto (Figura 7). La primera de ellas, Lupuna (03° 44.591' S, 73° 19.615' W), es una red de tres comunidades, San José de Lupuna, San Pedro y Santa Rita, localizadas a orillas del río Nanay, un afluente del río Amazonas; el acceso a ellas es exclusivamente a través de barco desde la ciudad de Iquitos. La segunda, Cahuide (04° 13.785' S, 73° 276' W), está conformado por las localidades de 12 de Abril, Cahuide y La Habana, que se encuentran a 60 Km de la ciudad de Iquitos, a orillas del río Itaya, en la intersección con la carretera Iquitos-Nauta.

La población es mayoritariamente mestiza, proveniente de una mezcla de ancestros hispanos y población indígena, sin pertenecer a una minoría étnica específica. Las actividades económicas son similares entre ellas y de subsistencia, destacando la agricultura, pesca y caza ocasional (Grietens *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2015).

En ambas zonas hay presencia del vector *Anopheles darlingi*, y transmisión de malaria. En Lupuna la transmisión es constante durante el año pero se incrementa durante la temporada de lluvias, que va de noviembre hasta mayo. La transmisión en Cahuide sigue un patrón similar; sin embargo, ha disminuido desde el último brote ocurrido en 2011 (ICEMR-Amazonía, publicación en preparación).



Figura 7. Ubicación del área de estudio. Lupuna se ubica en la cuenca del río Nanay y Cahuide en la cuenca del río Itaya, en la carretera Iquitos-Nauta. Los puntos azules muestran la distribución de las viviendas.

3.3. Muestra

El tamaño de muestra para la determinación del nivel de respuesta serológica de anticuerpos fue calculado utilizando SS Cohort de OpenEpi (Dean *et al.*, 2013), utilizando un nivel de significancia de 95%, una potencia de 80%, razón de expuestos/no expuestos de 1:3, porcentaje de no expuestos positivos de 10%

y un porcentaje de expuestos positivos de 30%. Obteniéndose un tamaño muestral mínimo de 360 sujetos, conformada por 90 sujetos expuestos y 270 sujetos no expuestos.

El tamaño muestral para la determinación de los polimorfismos del gen *pvx114145*, que codifica el antígeno PvMSP-10 se determinó utilizando el estimador para una proporción (Dean *et al.*, 2013), con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 6%, obteniendo un tamaño mínimo muestral de 267 muestras.

3.4. Procedimientos y técnicas

3.4.1. Diagnóstico microscópico

Las láminas de gota gruesa fueron teñidas por 10 minutos con una solución al 10% de colorante de Giemsa (Giemsa's azur eosin methylene blue, Merck KGaA, Germany) utilizando el procedimiento estándar del Ministerio de Salud realizando la lectura en el microscopio a 1000 aumentos. La densidad parasitaria (parásitos / μ L) se determinó por el número de parásitos en estadio asexual y sexual (trofozoítos y gametocitos contados por separado), luego de haber contado 200 leucocitos, asumiendo la cantidad de 6000 leucocitos/ μ L de sangre. Se leyeron los campos microscópicos necesarios, hasta contar por lo menos 500 leucocitos, antes de diagnosticar a un individuo como negativo. (Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud, 2003). El control de calidad se realizó con todas las láminas positivas y el 10% de láminas negativas, escogidas de forma aleatoria, por un técnico experimentado en el IMTAvH.

3.4.2. Diagnóstico molecular de malaria

3.4.2.1. Aislamiento y purificación de ADN

Para el aislamiento y purificación del ADN se utilizó el método en membrana de sílice (QIamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Alemania). Brevemente, se cortó un cuadrado de papel filtro de aproximadamente 4 mm de lado y se colocó en un microtubo de 1.5 mL. A este tubo se agregaron 180 μ L de buffer ATL y se incubó a 80°C por 10 minutos. Se agregaron luego 20 μ l de proteinasa K y se incubó por 1 hora a 56°C en agitación constante. Terminada la incubación se agregaron 200 μ L de buffer AL y se incubó por 10 minutos a 70°C en agitación constante. Terminado este paso se agregó etanol absoluto a la mezcla y el contenido líquido del tubo se pasó a la columna QIAamp Mini spin, la cual se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Terminado ese paso se agregaron 500 μ L de buffer AW1, repitiendo el paso de centrifugación, luego se agregaron 500 μ L de buffer AW2. Finalmente, la elución del ADN se realizó en 50 μ L de buffer AE en temperatura ambiente por 1 minuto, al término del cual la columna se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. El ADN eluido se conservó a -20°C hasta su uso.

3.4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El diagnóstico molecular se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Mangold (Mangold *et al.*, 2005). Este método se basa en un PCR en tiempo real que utiliza *Sybr Green* (PerfeCTa® SYBR® Green FastMix, Quantabio, USA) como agente intercalador para la detección del

producto de la amplificación formado. Los *primers* utilizados PL1473F18 5'-TAACGAACGAGATCTTAA-3' y PL1679R18 5'-G TTCCTCTAAGAAGCTTT-3' detectan la subunidad 18S ribosomal y permiten identificar cuatro especies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*) en una misma reacción.

Las condiciones de reacción consistieron en una denaturación inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de la amplificación durante 45 ciclos consistentes en una denaturación de 20 segundos a 95°C, 20 segundos de hibridación a 52°C y 30 segundos de extensión a 68°C, seguidos de un paso final de extensión de 3 minutos a 68°C. Terminada la amplificación, se realizó una curva de *melting*, que consistió en un paso de 5 segundos a 60°C con un incremento de 0.5°C cada 5 segundos, hasta llegar a los 90°C. Debido a que los *primers* se hibridan a una zona conservada entre las 4 especies, pero que internamente presenta variaciones en la secuencia de amplificación, las especies de *Plasmodium spp* pueden ser diferenciadas de acuerdo al pico de *melting* característico. Un pico alrededor de 73°C es específico para *P. falciparum* y un pico alrededor de 77°C es específico para *P. vivax*, con variaciones aceptables de +/- 0.5°C. Los resultados ambiguos de *melting* fueron confirmados utilizando un PCR semianidado descrito anteriormente (Singh *et al.*, 1999).

3.4.3. Determinación de la respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG específicos contra la proteína PvMSP-10

La proteína recombinante PvMSP-10 (cepa Sal I) fue expresada en células HEK-293 (Aragen Biosciences, California, USA). Las muestras de plasma fueron analizadas para la reactividad total de IgG por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para esto, placas para ELISA de 96 pocillos (Clear Flat-Bottom Immuno, Thermo Scientific, USA) fueron sensibilizados con 100 μL (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del antígeno recombinante preparado en *buffer* Bicarbonato-Carbonato 0.05 M pH 9.6, y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Las placas fueron luego lavadas 5 veces con 200 μL de *buffer* fosfato salino (PBS) conteniendo Tween 20 al 0.05% (PBST), para luego realizar el bloqueo con 150 μL de PBST y leche descremada al 5%, incubándose 1 hora a T° ambiente en movimiento constante. A continuación, la placa fue lavada 5 veces con 200 μL de PBST, y se agregaron 100 μL de la muestra de plasma y controles, según corresponda, en dilución 1:500 en *buffer* de bloqueo, dejándose incubar por 1 hora a 37°C. Terminado el tiempo de incubación las placas fueron lavadas 5 veces con 150 μL de PBST, con intervalos de incubación de 4 minutos en movimiento constante y se agregaron 100 μL del anticuerpo secundario conjugado peroxidasa-anti-IgG humano (Kirkegaard and Perry, Maryland, USA) en dilución 1:10000 preparado en PBST y leche al 1%, incubándose por 1 hora a 37°C. Luego de eso las placas fueron lavadas 3 veces con 150 μL de PBST y 2 veces con PBS, con intervalos de incubación de 4 minutos en movimiento constante. Los anticuerpos unidos fueron detectados agregando

100 μ L de substrato tetrametil bencidina (SureBlue, Kirkegaard and Perry , USA), incubándose durante 5 minutos, para luego detener la reacción con 50 μ L de Ácido Sulfúrico 2M. La densidad óptica (OD) a 450 nm fue medida usando un lector de microplacas (iMark, Bio-Rad , USA).

La OD corregida de cada muestra fue calculada restando la OD de los pocillos blanco (con antígeno pero sin muestra). Se utilizaron como controles negativos muestras de suero individuales y en *pool*, de peruanos sanos y no expuestos a malaria, residentes en la ciudad de Lima. Los controles positivos incluyeron un *pool* de muestras de seis sujetos provenientes de la ciudad de Iquitos infectados con *P. vivax* con una OD de 0.4 – 0.9 (control positivo medio) y un *pool* de muestras de seis sujetos provenientes de la ciudad de Iquitos infectados con *P. vivax* con una OD de 0.9 – 2.0 (control positivo alto). Se utilizó un modelo mixto para determinar punto de corte de la OD para la seropositividad. En resumen, los modelos mixtos permiten dividir la distribución de las OD en dos poblaciones Gaussianas, distribuidas utilizando un enfoque de máxima verosimilitud (una distribución estrecha de seronegativos y una distribución más amplia de seropositivos). El punto de corte para definir la seropositividad fue la media de la OD correspondiente a la población seronegativa más 3 desviaciones estándar (Cook *et al.*, 2012; Corran *et al.*, 2008; Drakeley *et al.*, 2005).

3.4.4. Determinación de polimorfismos en el gen que codifica para el antígeno PvMSP-10

Para la determinación de los polimorfismos del gen *pvx_114145*, que codifica para el antígeno PvMSP-10, se utilizaron sólo muestras con infecciones por *P. vivax*.

3.4.4.1. Diseño de los *primers*

Con el fin de poder amplificar el gen completo, se diseñó un par de *primers* utilizando como molde la región 1214786 a 1216425 del cromosoma 11 de la cepa Sal I de *P. vivax*, que incluye 100 pb de la región *up* y *downstream* al gen *pvx_114145*. (Figura 8). El par diseñado FW14-32 5'-CACGTTTGAATGCGCGTAA-3' y RV1586-1567 5'-GCCACCAACACAAACAACAC-3' produce un amplicón de un tamaño esperado de 1570 pb. Este par fue utilizado además de la amplificación para el secuenciamiento del gen en ambas hebras. Para obtener una lectura que resuelva las discrepancias se diseñó un primer adicional RV825-844 5'-TGCCTTCTCGCTGGTTTTAC-3' dirigido a un sitio de unión de interno.

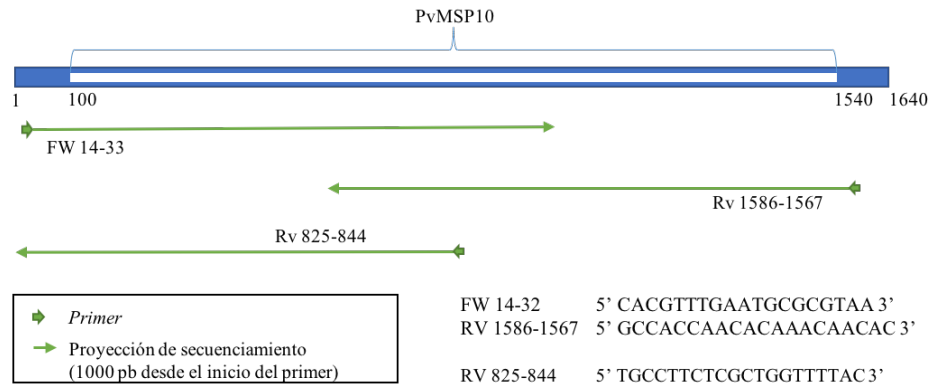


Figura 8. Esquema del sitio de unión de los primers diseñados para la amplificación y secuenciamento.

3.4.4.2. Amplificación del gen *pvx_114145* mediante Reacción en cadena de la polimerasa

El gen fue amplificado a partir de la solución de ADN utilizando los primers FW14-32 y RV1586-1567. La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando 5 μ L de muestra en un mix de reacción compuesto por 01 UI de ADN Polimerasa (AccuStart II, Quantabio, USA), en 1.5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP y 500 nM de cada primer en un volumen final de 50 μ L. Se realizó una curva de temperatura de *annealing* para la determinación de la temperatura óptima de amplificación, así como la determinación del límite de detección utilizando ADN de la cepa de referencia Sal I de *P. vivax*. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo termociclador C1000 (Touch Thermocycler, Bio-Rad, USA). Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35

ciclos de amplificaciones a 94 °C por 30s, 66 °C por 30 s y a 72 °C por 1m 40s, y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Una vez determinada la temperatura de *annealing* adecuada se evaluó la condiciones de un segundo PCR (re-amplificación) con el fin de incrementar la cantidad de amplicón para la reacción de secuenciamiento. Se utilizaron las mismas condiciones del mix y termociclado que el PCR de amplificación, evaluando un tratamiento previo del amplicón a re-amplificar (precipitación utilizando el protocolo estándar de Sambrook & Russell, 2001), frente a una dilución 1:20 del amplicón en buffer AE del producto del primer PCR.

El protocolo final para la re-amplificación de las muestras utilizó 5 μ L de la dilución 1:20 del producto de PCR como sustrato para la reacción. En todas las corridas se incluyó ADN genómico de la cepa Sal I de *P. vivax* como control positivo, además de controles negativos y blancos de reacción para detectar cualquier tipo de contaminación con el producto de PCR durante la re-amplificación.

El tamaño de todos los productos de PCR fue verificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Certified, Bio-Rad, USA), y bromuro de etidio 0.5 μ g/mL (Bio-Rad, USA), utilizando un marcador de peso molecular de rango 100-3000 pb (Gene Ruler 100 pb Plus, ThermoFisher Scientific, USA). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 0.5X a voltaje constante de 7 V/cm y, las muestras se

visualizaron mediante irradiación con luz UV y finalmente se fotodocumentaron (Gel Doc XR+, Bio-Rad, USA).

3.4.4.3. Secuenciamiento del amplicón

Los amplicones obtenidos con la re-amplificación fueron enviados a MACROGEN (www.macrogen.com, Seoul, Korea) para el secuenciamiento capilar automatizado (ABI3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA).

Para asegurar la calidad del secuenciamiento, cada muestra fue evaluada cargando 1 μ L del producto del PCR de re-amplificación en un gel de agarosa, en las condiciones descritas anteriormente. Sólo fueron remitidas aquellas muestras que mostraron una banda única en el revelado, considerando además que la cantidad de ADN era suficiente (50 ng/ μ L, Sambrook & Russell, 2001).

3.4.4.4. Análisis de los cromatogramas, construcción del *contig* y recuperación de secuencias

Los cromatogramas de las secuencias fueron visualizados y editados utilizando el *software* CLC Main Workbench 6 (CLC bio, Dinamarca). En la construcción del *contig* fueron utilizadas sólo las secuencias cuyo valor de calidad (QV) fue mayor o igual a 30 (probabilidad de error en el llamado de base menor o igual a 0.001%).

La construcción de los contigs se realizó ensamblando los cromatogramas a la secuencia de referencia (*pvx_114145* de la cepa Sall de *P. vivax*). Una vez construidos, fueron inspeccionados visualmente, de forma individual, para la detección de ruido por contaminación, o errores en el llamado de base propios del secuenciador.

Una vez corregido cualquier error del cromatograma, se generó una secuencia consenso por cada *contig* y se exportó en formato FASTA para el análisis posterior.

3.4.4.5. Análisis de secuencias

Las secuencias recuperadas fueron alineadas utilizando el módulo de alineamiento múltiple del *software* Geneious 9.1.8 (Biomatters Limited, Nueva Zelanda). El algoritmo utilizado para el alineamiento fue ClustalW con los parámetros por defecto.

3.5. Consideraciones éticas

Las muestras a utilizar fueron obtenidas en un estudio de cohorte previo, realizado en estas comunidades por el laboratorio de Malaria (LID-UPCH) que ya cuenta con aprobación del Comité de Ética de la UPCH (“Impacto de los portadores asintomáticos en la epidemiología y control de la malaria en la Amazonía Peruana”, Código SIDISI: 57395). Este estudio, por tanto, cuenta con aprobación por el Comité de Ética de la UPCH, en categoría de exento (SIDISI: 0000066475).

Los pacientes incluidos en el estudio cuentan con consentimiento o asentimiento informado, según corresponda, por escrito según las Normas del Código de Ética y Bioseguridad. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki.

3.6. Análisis estadístico de los datos

Los datos registrados fueron ingresados en una hoja de cálculo, y procesados y analizados en el paquete estadístico STATA 14 (StataCorp, 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, USA). El valor de significancia fue definido como 5% y los intervalos de confianza al 95% (IC) fueron calculados según fue necesario.

Se creó una variable compuesta para colapsar el diagnóstico por GG y PCR, cuando este último estuvo disponible. Dos variables resultado (*outcome*) fueron comparados entre los sujetos que fueron expuestos (fueron infectados) y no expuestos (no tuvieron infección) durante el seguimiento: El nivel de anticuerpos (variable cuantitativa) y el *status* de seropositividad (variable categórica dicotómica). En el análisis bivariado con la variable resultado cuantitativa, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, y en el análisis bivariado con la variable resultado categórica se utilizó la prueba exacta de Fisher, considerándose en todos los casos un $p < 0,05$ como significativo.

Se realizó además un análisis multivariado de regression de Poisson para evaluar la influencia de potenciales variables confundentes (edad, número de episodios, infección activa y tiempo pasado desde la última infección) sobre el

nivel de anticuerpos de los sujetos estudiados. Variables asociadas con un valor $p < 0.2$ en análisis de regresión bivariado fueron incluidas en la construcción del modelo multivariado. Las variables del modelo final fueron retenidas si el valor p se mantuvo entre 0.1 a 0.2 en un proceso *backward stepwise*.

4. RESULTADOS

4.1. Características sociodemográficas

A partir de 222 viviendas, se enrolaron 388 participantes (Figura 9), de los cuales el 60.6% de ellos pertenecieron a Cahuide y 39.4% a Lupuna. La proporción de mujeres fue de 53.9%, y los participantes menores de 10 años, entre 10 y 30, y mayores de 30 años de edad representaron el 34.5, 37.6, y 27.8% respectivamente. El 79.6% de los participantes del estudio llevaría más de 2 años viviendo en las áreas de estudio. El tiempo medio de seguimiento fue de 126 días (rango: 95-175). (Tabla 1).

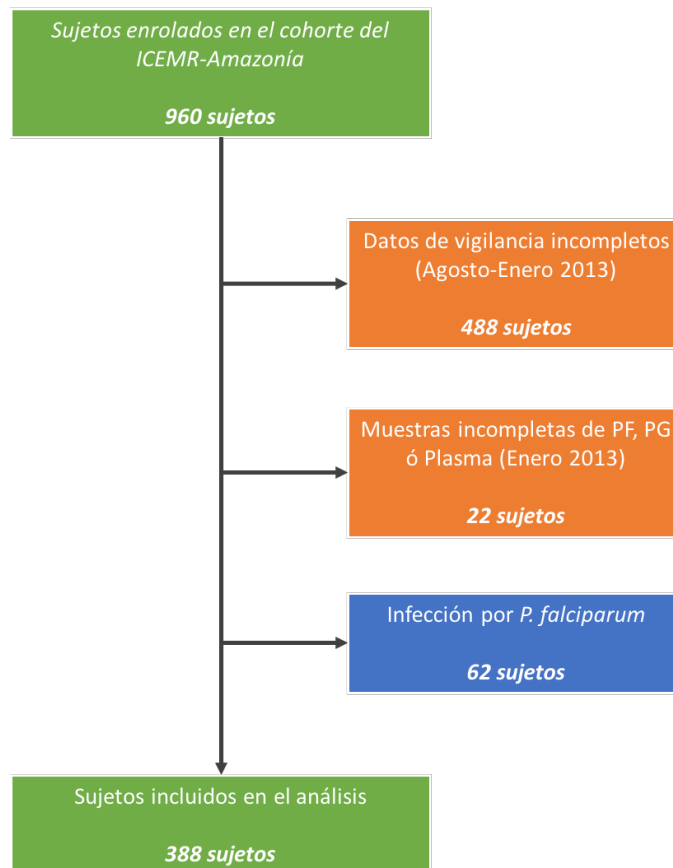


Figura 9. Diagrama de flujo de los sujetos incluidos en este estudio.

4.2. Exposición a *P. vivax*

Al término del seguimiento de este estudio, 172 (43.9%) de los participantes tuvieron exposición a *P. vivax* (infección diagnosticada por GG y/o PCR). De ellos 119 participantes tuvieron un episodio (infección) diagnosticado, 50 tuvieron dos episodios, y 4 más de tres episodios. El tiempo medio desde el diagnóstico de la infección más reciente hasta el día de la toma de muestra para la determinación de los niveles de IgG específicos PvMSP10 fue de 28 días (rango: 0 -163). Residir en Cahuide (OR: 4.04; IC 95%: 2.55 a 6.39) y tener entre 10 a 30 años de edad (OR: 8.23; IC 95%: 4.61 a 14.70), estuvo asociado a una mayor exposición a *P. vivax* durante el seguimiento.

4.3. Respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10 en sujetos expuestos a *P. vivax*

Los niveles de anticuerpos IgG (basado en los resultados de OD) de los sujetos expuestos a malaria por *P. vivax* fue significativamente mayor que aquella de los sujetos no expuestos ($p < 0.0001$). La subestratificación dentro de los grupos según la edad (Figura 10) mostró que, los sujetos no expuestos mayores a cinco años de edad tenían un valor de OD mayor ($p < 0.01$) que menores a cinco años, de forma similar a lo que ocurre en el grupo de expuestos ($p < 0.001$). La comparación entre los sujetos expuestos y no expuestos mayores a 5 años de edad mostró que la OD del primer grupo fue significativamente mayor ($p < 0.001$). Curiosamente, la OD de los sujetos en el grupo de expuestos con edad menor o igual a cinco años no fue mayor que la de sus pares en el grupo

de no expuestos ($p=0.1312$); sin embargo, esto pudo ser debido al tamaño muestral limitado de sujetos en el primer grupo ($n=13$).

Tabla 1. Características de la población de estudio y su asociación con la exposición a *P. vivax*.

Características	Exposición a <i>P. vivax</i>			
	Positivo <i>n</i> =172 (%)	Negativo <i>n</i> =216 (%)	<i>p</i> -value	Total <i>n</i> =388 (%)
Comunidad			0.047*	
Cahuide	114 (66.3)	121 (56.0)		235 (60.6)
Lupuna	58 (33.7)	95 (44.0)		153 (39.4)
Sexo			0.7591	
Masculino	81 (47.1)	98 (45.4)		179 (46.1)
Femenino	91 (52.9)	118 (54.6)		209 (53.9)
Grupo etáreo (años)			<0.001**	
< 10	30 (17.4)	104 (48.2)		134 (34.5)
10 - 29.9	66 (38.4)	80 (37.0)		146 (37.6)
30 a más	76 (44.2)	32 (14.8)		108 (27.8)
Tiempo en la comunidad (años)			0.2533	
≤ 2	40 (23.3)	39 (18.1)		79 (20.4)
> 2	132 (76.7)	177 (81.9)		309 (79.6)

p-value del test exacto de Fisher. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

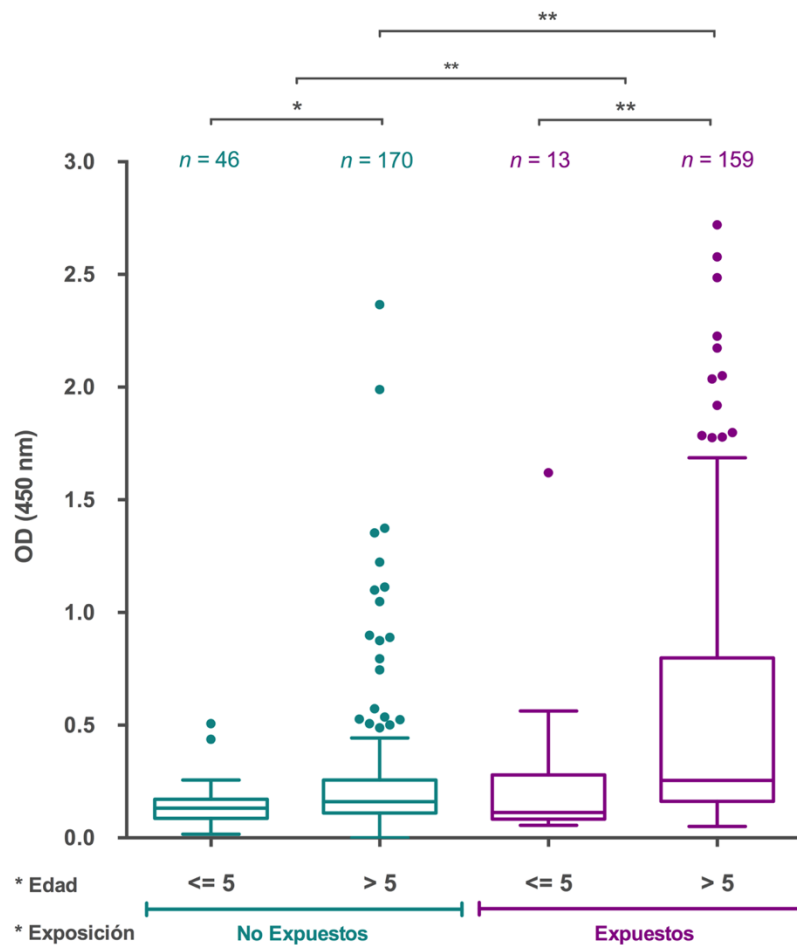


Figura 10. Diferencias en los niveles de anticuerpos IgG contra PvMSP-10 en los sujetos expuestos a *P. vivax* frente a los sujetos no expuestos. *Mann-Whitney test, $p < 0.01$ ** Mann-Whitney test, $p < 0.001$.

El nivel de de anticuerpos IgG específicos contra PvMSP-10 en los sujetos que tuvieron más de una infección por *P. vivax* durante el seguimiento fue mayor que aquellos que sólo tuvieron una infección, así como en aquellos sujetos con un tiempo de infección menor a igual a treinta días, sin alcanzar a ser diferencias significativas. Sin embargo, cuando los datos son agrupados en referencia a la ocurrencia de sólo un episodio de malaria, se observa que los niveles de anticuerpos en los sujetos cuya respuesta serológica ha sido medida dentro de los 30 días de ocurrida la infección más reciente, es significativamente mayor

al resto, esto sugiere que la ausencia de diferencias significativas en las comparaciones anteriores se deben a un problema de tamaño muestral (Figura 11).

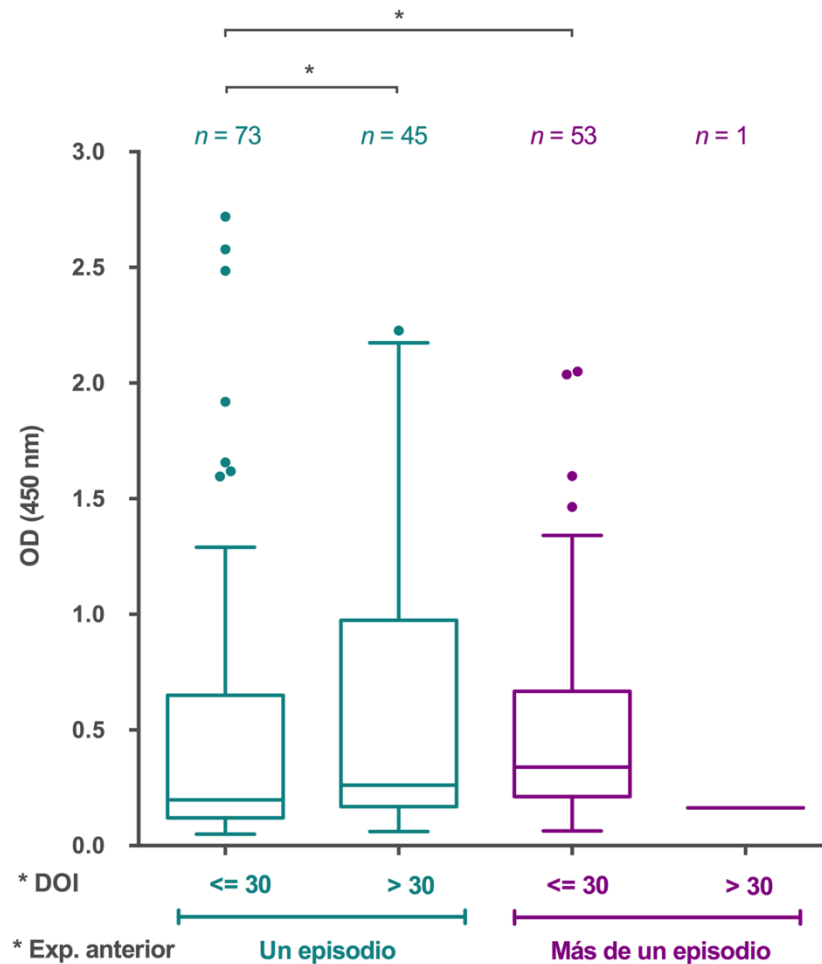


Figura 11. Diferencias en los niveles de anticuerpos IgG contra PvMSP-10 en los sujetos expuestos a *P. vivax* de acuerdo al tiempo pasado desde la última infección y episodios previos de malaria. DOI = Días desde la infección. *Mann-Whitney test, $p < 0.01$ ** Mann-Whitney test, $p < 0.001$.

4.4. Asociación entre la exposición a *P. vivax* y la respuesta serológica de anticuerpos IgG contra el antígeno PvMSP-10.

Las tablas 2 y 3 muestran los resultados de los modelos univariados y multivariados para el análisis de la respuesta serológica como nivel de anticuerpos tipo IgG y estado de seropositividad (variables continua y categórica, respectivamente).

El análisis univariado mostró que ser mayor de 30 años (IRR: 2.88, IC 95%: 0.943 – 2.374), haber sido expuesto a la infección por *P. vivax* durante el seguimiento (IRR: 2.28, IC 95%: 1.627 – 3.221), y que la infección halla ocurrido dentro de los últimos treinta días (IRR:3.06, IC 95%: 1.761 – 5.328), fueron factores asociados independientemente a un mayor nivel de anticuerpos IgG contra el antígeno PvMSP-10.

Resultados similares se obtuvieron con el análisis univariado de la seropositividad. Así, ser mayor de 30 años (IRR: 3.27, IC 95%: 1.93 – 5.54), haber sido expuesto a la infección por *P. vivax* durante el seguimiento (IRR: 2.74, IC 95%: 1.81 – 4.14), y que la infección halla ocurrido dentro de los últimos treinta días (IRR:3.42, IC 95%: 1.76 – 6.61), fueron factores asociados independientemente a ser seropositivos contra el antígeno PvMSP-10. Aquí además, se notó una asociación entre tener una infección activa por *P. vivax* y el estado de seropositividad (IRR:1.66, IC 95%: 1.11 – 2.47).

Tabla 2. Modelo de regresión de Poisson univariado y multivariado para el nivel de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10

	Nivel de anticuerpos IgG contra PvMSP-10					
	Univariado			Multivariado		
	IRR	IC 95%	<i>p</i> -value	IRR	IC 95%	<i>p</i> -value
Edad						
< 10	Ref.			Ref.		
10 - 29.9	1.50	(0.943 - 2.374)	0.087*	1.29	(0.81 - 2.08)	0.285
>= 30	2.88	(1.867 - 4.455)	<0.001**	2.16	(1.35 - 3.45)	<0.001**
Infección activa						
Sin infección	Ref.					
Infección activa	1.40	(0.987 - 1.994)	0.059*			
Exposición						
No	Ref.			Ref.		
Sí	2.28	(1.627 - 3.221)	<0.001**	1.57	(1.03 - 2.41)	0.036**
Días de infección						
Sin infección	Ref.			Ref.		
0	1.95	(1.299 - 2.915)	0.001**	1.00		
1 a 30	3.06	(1.761 - 5.328)	<0.001**	1.57	(0.89 - 2.75)	0.12*
31 días a más	2.56	(1.652 - 3.977)	<0.001**	1.22	(0.77 - 1.92)	0.392

p-value del test de Waldo. **p*<0.2, ***p*<0.05. IRR = *Incidence Rate Ratio*

Tabla 3. Modelo de regresión de Poisson univariado y multivariado para la respuesta serológica (Seropositividad) de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10

	Seropositividad al antígeno PvMSP-10					
	Univariado			Multivariado		
	IRR	IC 95%	p-value	IRR	IC 95%	p-value
Edad						
< 10	Ref.			Ref.		
10 - 29.9	1.74	(1.00 - 3.03)	0.051	1.44	(0.82 - 2.54)	0.207
>= 30	3.27	(1.93 - 5.54)	<0.001**	2.27	(1.29 - 4.00)	0.004**
Infección activa						
Sin infección	Ref.					
Infección activa	1.66	(1.11 - 2.47)	0.014*			
Exposición						
No	Ref.			Ref.		
Sí	2.74	(1.81 - 4.14)	<0.001**	2.14	(1.37 - 3.33)	0.001**
Días de infección						
Sin infección	Ref.					
0	2.480383	(1.55 - 3.98)	<0.001**			
1 a 30	3.42	(1.76 - 6.61)	<0.001**			
31 días a más	2.91	(1.72 - 4.92)	<0.001**			

p-value del test de Waldo. *p<0.2, **p<0.05. IRR = *Incidence Rate Ratio*

Luego del ajuste por edad, exposición, infección activa y tiempo desde la última infección, el análisis multivariado de regresión mostró que los sujetos mayores de 30 años (IRR: 2.16, IC 95%: 1.35 – 3.45), y con exposición a la infección por *P. vivax* durante el seguimiento (IRR: 1.57, IC 95%: 1.03 – 2.41) tuvieron un mayor nivel de anticuerpos tipo IgG contra el antígeno PvMSP-10. De manera similar, el ser mayor de 30 años (IRR: 2.27, IC 95%: 1.29 – 4.00), y haber sido expuesto a la infección por *P. vivax* durante el seguimiento (IRR: 2.14, IC 95%: 1.37 – 3.33) se mantuvieron asociados a la seropositividad.

4.5. Amplificación y secuenciamiento del gen *pvx_114145*

La temperatura de *annealing* determinada según la curva de temperatura fue de 66 °C, con esta se realizó la amplificación de un producto único por muestra de 1570 pb. Se realizó la reamplificación del producto de PCR a partir de una dilución 1:20 del primer PCR, que demostró generar amplicón a una concentración suficiente para su secuenciamiento. La figura 12 muestra el producto de PCR típico obtenido utilizando este procedimiento.

Se realizó el secuenciamiento del gen amplificado por PCR a partir de 319 muestras diagnosticadas como infección simple por *P. vivax* (Tabla 4). Las muestras fueron obtenidas de las comunidades de estudio durante un periodo de cuatro años. El 71.47% de las muestras secuenciadas provinieron de la comunidad de Lupuna, y el 45.14% fueron obtenidas durante el año 2013. La distribución de las muestras entre las temporadas de alta y baja transmisión fue similar (53.92 y 46.08%, respectivamente).

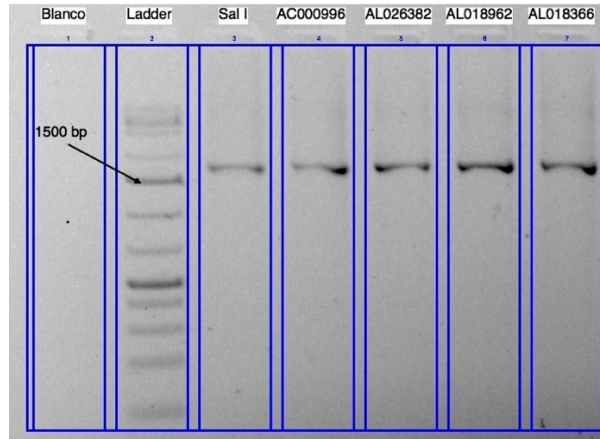


Figura 12. Productos del PCR de re-amplificación a partir de muestras seleccionadas aleatoriamente. La imagen muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de **1 μ L** del producto obtenido. Carril 1 = Blanco de reacción. Carril 2 = Marcador de peso molecular de rango 100 – 3000 pb. Carril 3 = Control positivo de reacción, cepa Sal I de *P. vivax*. Carriles 4-7 = Muestras de ADN positivas a *P. vivax*.

Tabla 4. Características de las muestras secuenciadas

Características	Muestras (%) <i>n</i> =312
Comunidad	
Cahuide	91 (29.17)
Lupuna	221 (70.83)
Temporada de transmisión	
Alta	169 (54.17)
Baja	143 (45.83)
Año	
2012	51 (16.35)
2013	143 (45.83)
2014	102 (32.69)
2015	16 (5.13)

4.6. Alineamiento de secuencias y determinación de los polimorfismos en el gen

Una vez completado el ensamblaje de los *contig*, las secuencias consenso para cada muestra fueron exportadas en formato FASTA, para la construcción del alineamiento múltiple de las secuencias utilizando como referencia la secuencia del gen de la cepa de referencia Sal I de *P. vivax*, la cual fue también utilizada como molde para la síntesis de la proteína recombinante.

El análisis del alineamiento mostró la ausencia de cambios en la secuencia del gen, conservando una identidad del 100% con la cepa de referencia Sal I (Figura 13).



Figura 13. Secuencia consenso generada a partir de alineamiento. Se muestra la secuencia proteica correspondiente a la secuencia génica.

5. DISCUSIÓN

Los hallazgos principales de este estudio son qué, un nivel mayor en la respuesta serológica de anticuerpos tipo IgG, así como el estado de seropositividad, contra el antígeno PvMSP-10 están asociados a la exposición reciente de malaria; y que la secuencia del gen *pvx_114145*, que codifica para el antígeno en mención, se mantiene sin variaciones a lo largo del tiempo. Esto refuerza los hallazgos previos que postulan a esta proteína como un candidato a biomarcador de exposición y expande las posibilidades de su uso en estudios seroepidemiológicos en la Amazonía Peruana.

Autores como Kerkhof *et al.*, 2016 consideran que el primer criterio para la selección de biomarcadores de exposición reciente, es que el marcador pueda detectar al menos la infección en curso. Aunque el análisis de este estudio no fue planteado de esa manera, el tener una infección activa por *P. vivax* estuvo asociado independientemente a la seropositividad a PvMSP-10.

El efecto de la edad sobre el nivel de anticuerpos contra un antígeno es conocido, y ha sido comentado por distintos autores (Cook *et al.*, 2012; King *et al.*, 2015). Los resultados mostraron que el nivel de anticuerpos IgG se incrementa con la edad, siendo mayor en los sujetos mayores de 30 años (cantidad y seropositividad), esto concuerda con el mayor riesgo de exposición a malaria por *P. vivax*, y que está usualmente asociado con el ingreso a la fuerza laboral; sin embargo, algunos autores consideran que la asociación entre la edad y la respuesta serológica de anticuerpos sólo refleja la exposición acumulada durante los años, mas no representa un factor de riesgo verdadero (Rosas-Aguirre *et al.*, 2013).

El diseño del estudio no permitió determinar la cinética de producción de los anticuerpos contra PvMSP-10, pero los resultados nos dan una aproximación al efecto del tiempo transcurrido desde la infección sobre la duración de la respuesta serológica de anticuerpos IgG. Así, se encontraron diferencias significativas entre los sujetos cuyos niveles de anticuerpos fueron medidos en un lapso menor a los 30 días desde la ocurrencia de la infección, lo cual concuerda con lo determinado para otros antígenos (Kerkhof *et al.*, 2016; Cook *et al.*, 2010; Drakeley *et al.*, 2005).

Diversos autores coinciden en que las estrategias de control deben ser diseñadas tomando en cuenta las características del escenario en el cual serán implementadas. En el caso de la Amazonía, los casos de malaria con parasitemia submicroscópica son muy comunes (Sturrock *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2014; Roshanravan *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2002). Monitorear las infecciones, incluyendo las submicroscópicas, utilizando los métodos moleculares disponibles como qPCR, que poseen muy buena sensibilidad y especificidad (Mangold *et al.*, 2005), resulta demasiado costoso, no sólo a nivel de equipamiento, sino también a nivel de muestreo, ya que se necesitan muestreos constantes, en periodos de tiempo cortos, debido a que estos métodos sólo pueden dar información sobre las infecciones activas al momento del muestreo. Datos aún no publicados por nuestro grupo, muestran que en dentro de la Amazonía Peruana, hasta el 70% de infecciones submicroscópicas detectadas en un punto en el tiempo, negativizan durante el seguimiento con diagnóstico molecular, aún sin tratamiento antimalárico, concordando con una observación previa realizada por Van den Eede *et al.*, 2011. En este contexto podemos sugerir que la medición de la respuesta serológica de anticuerpos contra antígenos como PvMSP-10, no está limitada a la presencia de una infección en curso sino que refleja la exposición en

un periodo determinado de tiempo, representa una oportunidad importante para el monitoreo de la malaria por *P. vivax*.

Autores como Pacheco *et al.*, 2012 y Garzón-Ospina *et al.*, 2011 determinaron previamente que en regiones como la Amazonía Colombiana el gen *pvx_114145* tenía poca diversidad genética y por tanto polimorfismos limitados en su secuencia proteica; no obstante, aún resulta sorprendente la ausencia total de cambios en la secuencia mostrados en este estudio. La ausencia de cambios puede deberse a los procesos de subestructuración y propagación clonal posteriores a los eventos de cuello de botella ocurridos en la Amazonía en la última década (Delgado-Ratto *et al.*, 2016).

Uno de los problemas encontrados al momento de realizar la evaluación y validación de antígenos candidatos para serovigilancia es la falta de controles endémicos estandarizados, sobre todo en el grupo de no expuestos (Elliott *et al.*, 2014). Este estudio no escapa a esta limitación, pero las conclusiones expuestas aquí pueden ser corroboradas en estudios que incluyan periodos de tiempo más cortos entre la toma de muestra para diagnóstico molecular.

Este estudio tiene también otras limitaciones. La reducción en el número de sujetos de estudio debido a datos o muestras incompletas a partir de la cohorte poblacional llevada a cabo por el ICEMR-Amazonía llevó a la pérdida de información; sin embargo, ya que la reducción en el número de individuos incluidos en el estudio no se basó en información relacionada directamente a la exposición al parásito (haber sido infectado o no), podemos asumir que la pérdida de datos fue al azar, y por tanto, que las conclusiones del estudio no son incorrectas.

El tipo y frecuencia del seguimiento de los sujetos también pudo afectar el estudio, debido a la posibilidad de ocurrencia de infecciones submicroscópicas que pudieron no haber sido diagnosticadas en aquellos meses donde el diagnóstico se limitó a la microscopía de GG. Existe la posibilidad que alguna infección submicroscópica se halla mantenido a lo largo del seguimiento hasta su diagnóstico por métodos moleculares, o que se halla perdido; esto habría conducido a la clasificación incorrecta de algunos sujetos que estarían dentro del grupo de no expuestos, aún habiendo tenido exposición al parásito (infección no detectada), lo que explicaría el nivel de anticuerpos de algunos sujetos incluidos en este grupo, que están fuera del rango esperado. Sin embargo, debido a estación en la cual se realizó el seguimiento (periodo de baja transmisión) se espera que estas infecciones no detectadas no representen un número grande, además la reclasificación de estos sujetos como expuestos; reforzaría los hallazgos encontrados en cuanto a la diferencia en los niveles de anticuerpos, mas no cambiaría la conclusión del mismo

6. CONCLUSIONES

- El nivel de anticuerpos tipo IgG específicos contra el antígeno PvMSP-10 en sujetos expuestos a *P. vivax* es mayor que el encontrado en los sujetos no expuestos.
- Esta diferencia en los niveles de IgG específicos contra PvMSP10 se incrementa con la edad del hoperero, y con un lapso menor a 30 días transcurridos desde la última infección.
- De forma similar, el estado de seropositividad al antígeno está asociado a la edad y exposición a *P. vivax*.
- Los sujetos que presentaron más de un episodio de malaria por *P. vivax* durante el seguimiento tuvieron un mayor nivel de anticuerpos IgG específicos a PvMSP10 que aquellos que tuvieron sólo un episodio, sin llegar a ser una diferencia significativa.
- No se encontraron polimorfismos en la secuencia del gen *pvx_114145* de los parásitos circulantes en las comunidades estudiadas durante los cuatro años de muestreo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemu, A., Shiferaw, Y., Addis, Z., Mathewos, B., & Birhan, W. (2013). Effect of malaria on HIV/AIDS transmission and progression. *Parasites & Vectors*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-18>
- Alves, F. P., Durlacher, R. R., Menezes, M. J., Krieger, H., Silva, L. H. P., & Camargo, E. P. (2002). High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(6), 641-648.
- Baum, E., Sattabongkot, J., Sirichaisinthop, J., Kiattibutr, K., Davies, D. H., Jain, A., Yan, G. (2015). Submicroscopic and asymptomatic Plasmodium falciparum and *Plasmodium vivax* infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Malaria Journal*, 14, 95. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0611-9>
- Bautista, C. T., Chan, A. S. T., Ryan, J. R., Calampa, C., Roper, M. H., Hightower, A. W., & Magill, A. J. (2006). Epidemiology and spatial analysis of malaria in the Northern Peruvian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(6), 1216-1222.
- Beeson, J. G., Drew, D. R., Boyle, M. J., Feng, G., Fowkes, F. J. I., & Richards, J. S. (2016). Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(3), 343-372. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw001>
- Bell, D., Fleurent, A. E., Hegg, M. C., Boomgard, J. D., & McConnico, C. C. (2016). Development of new malaria diagnostics: matching performance

- and need. *Malaria Journal*, 15(1), 406. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1454-8>
- Black, C. G., Wang, L., Wu, T., & Coppel, R. L. (2003). Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(1), 59-68.
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I., & Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(12), 833-840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3364>
- Branch, O., Casapia, W. M., Gamboa, D. V., Hernandez, J. N., Alava, F. F., Roncal, N., Gotuzzo, E. (2005). Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal*, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-27>
- Branch, O. H., Sutton, P. L., Barnes, C., Castro, J. C., Hussin, J., Awadalla, P., & Hajar, G. (2011). *Plasmodium falciparum* Genetic Diversity Maintained and Amplified Over 5 Years of a Low Transmission Endemic in the Peruvian Amazon. *Molecular Biology and Evolution*, 28(7), 1973-1986. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq311>
- Cheng, Y., Wang, B., Sattabongkot, J., Lim, C. S., Tsuboi, T., & Han, E.-T. (2014). Immunogenicity and antigenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 10. *Parasitology Research*, 113(7), 2559-2568. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3907-8>

- Chuquiyauri, R., Molina, D. M., Moss, E. L., Wang, R., Gardner, M. J., Brouwer, K. C., Vinetz, J. M. (2015). Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in *Plasmodium vivax* Relapse and Reinfection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(4), 801-809. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0232>
- Clark, E. H., Silva, C. J., Weiss, G. E., Li, S., Padilla, C., Crompton, P. D., Branch, O. H. (2012). *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infection and Immunity*, 80(4), 1583-1592. <https://doi.org/10.1128/IAI.05961-11>
- Cook, J., Reid, H., Iavro, J., Kuwahata, M., Taleo, G., Clements, A., Drakeley, C. (2010). Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malaria Journal*, 9(1), 169. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-169>
- Cook, J., Speybroeck, N., Sochantá, T., Somony, H., Sokny, M., Claes, F., Erhart, A. (2012). Sero-epidemiological evaluation of changes in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* transmission patterns over the rainy season in Cambodia. *Malaria Journal*, 11, 86. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-86>
- Corran, P., Coleman, P., Riley, E., & Drakeley, C. (2007). Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends in Parasitology*, 23(12), 575-582. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.023>
- Corran, P. H., Cook, J., Lynch, C., Leendertse, H., Manjurano, A., Griffin, J., Riley, E. (2008). Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for

- epidemiological studies. *Malaria Journal*, 7, 195.
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-195>
- Cotter, C., Sturrock, H. J., Hsiang, M. S., Liu, J., Phillips, A. A., Hwang, J., Feachem, R. G. (2013). The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *The Lancet*, 382(9895), 900-911.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60310-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60310-4)
- da Silva-Nunes, M., Moreno, M., Conn, J. E., Gamboa, D., Abeles, S., Vinetz, J. M., & Ferreira, M. U. (2012). Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Tropica*, 121(3), 281-291.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.001>
- Dean, A., Sullivan, K., & Soe, M. (2013). OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (Versión 3.01). Recuperado a partir de <http://www.openepi.com/>
- Delgado-Ratto, C., Gamboa, D., Soto-Calle, V. E., Van den Eede, P., Torres, E., Sánchez-Martínez, L., D'Alessandro, U. (2016). Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), e0004376. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004376>
- Dirección General de Epidemiología. Ministerio de Salud. (2017, julio 1). Sala Situacional para el Análisis de Situación de Salud 2017 - SE26. Recuperado a partir de http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121

- Drakeley, C., & Cook, J. (2009). Chapter 5 Potential Contribution of Sero-Epidemiological Analysis for Monitoring Malaria Control and Elimination: Historical and Current Perspectives. En *Advances in Parasitology* (Vol. 69, pp. 299-352). Elsevier.
- Drakeley, C. J., Corran, P. H., Coleman, P. G., Tongren, J. E., McDonald, S. L. R., Carneiro, I., Riley, E. M. (2005). Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14), 5108-5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408725102>
- Elliott, S. R., Fowkes, F. J. I., Richards, J. S., Reiling, L., Drew, D. R., & Beeson, J. G. (2014). Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Reports*, *6*. <https://doi.org/10.12703/P6-100>
- Faddy, H. M., Seed, C. R., Faddy, M. J., Flower, R. L., & Harley, R. J. (2013). Malaria antibody persistence correlates with duration of exposure. *Vox Sanguinis*, *104*(4), 292-298. <https://doi.org/10.1111/vox.12000>
- Garzón-Ospina, D., Romero-Murillo, L., Tobón, L. F., & Patarroyo, M. A. (2011). Low genetic polymorphism of merozoite surface proteins 7 and 10 in Colombian Plasmodium vivax isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(2), 528-531. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.12.002>
- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, *14*(11), 744-757. <https://doi.org/10.1038/nri3742>

- Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *International Journal for Parasitology*, 39(1), 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.007>
- Grietens, K. P., Muela Ribera, J., Soto, V., Tenorio, A., Hoibak, S., Aguirre, A. R., Erhart, A. (2013). Traditional nets interfere with the uptake of long-lasting insecticidal nets in the Peruvian Amazon: the relevance of net preference for achieving high coverage and use. *PloS One*, 8(1), e50294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050294>
- Kerkhof, K., Sluydts, V., Willen, L., Kim, S., Canier, L., Heng, S., ... Durnez, L. (2016). Serological markers to measure recent changes in malaria at population level in Cambodia. *Malaria Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1576-z>
- King, C. L., Davies, D. H., Felgner, P., Baum, E., Jain, A., Randall, A., Greenhouse, B. (2015). Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3 Suppl), 16-27. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0037>
- Lin, J. T., Saunders, D. L., & Meshnick, S. R. (2014). The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends in Parasitology*, 30(4), 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.004>
- Mandal, S. (2014). Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S13-S26. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60410-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60410-2)

- Mandell, G. L., Bennett, J. E., & Dolin, R. (Eds.). (2010). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (7th ed). Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier.
- Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S. C., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B., Kaul, K. L. (2005). Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2435-2440. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005>
- Maskus, D. J., Bethke, S., Seidel, M., Kapelski, S., Addai-Mensah, O., Boes, A., Fendel, R. (2015). Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to *Plasmodium falciparum* MSP10. *Malaria Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0797-x>
- Ministerio de Salud del. (2007). *NTS N° 054-MINSA/DGSP-V.01 Norma Técnica de Salud para la Atención de Malaria y Malaria Grave en el Perú*. Lima: MINSA.
- Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. (2003). *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria*. Lima: MINSA.
- Moreno, M., Saavedra, M. P., Bickersmith, S. A., Lainhart, W., Tong, C., Alava, F., Conn, J. E. (2015). Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru. *Malaria Journal*, 14, 290. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0804-2>
- Moreno-Pérez, D. A., Dégano, R., Ibarrola, N., Muro, A., & Patarroyo, M. A. (2015). Determining the *Plasmodium vivax* VCG-1 strain blood stage

proteome. *Journal of Proteomics*, 113, 268-280.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.003>

Naciones Unidas. (2015). *Objetivos de Desarrollo del Milenio. Informe de 2015* (p. 72). Recuperado a partir de http://www.un.org/es/millenniumgoals/pdf/2015/mdg-report-2015_spanish.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2015, marzo 20). Paludismo: proyecto de estrategia técnica mundial: después de 2015. Recuperado a partir de http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_28-sp.pdf

Pacheco, M. A., Elango, A. P., Rahman, A. A., Fisher, D., Collins, W. E., Barnwell, J. W., & Escalante, A. A. (2012). Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium spp.* *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(5), 978-986.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.009>

Perez-Leal, O., Sierra, A. Y., Barrero, C. A., Moncada, C., Martinez, P., Cortes, J., Patarroyo, M. A. (2005). Identifying and characterising the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 10 *Plasmodium vivax* homologue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), 1178-1184. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.031>

Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Ferreira, M. U., Kanbara, H., Udomsangpetch, R., & Cui, L. (2009). Limited global diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 4 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 821-826. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.017>

- Rosas-Aguirre, A., Llanos-Cuentas, A., Speybroeck, N., Cook, J., Contreras-Mancilla, J., Soto, V., Erhart, A. (2013). Assessing malaria transmission in a low endemicity area of north-western Peru. *Malaria Journal*, *12*(1), 339. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-339>
- Roshanravan, B., Kari, E., Gilman, R. H., Cabrera, L., Lee, E., Metcalfe, J., Vinetz, J. M. (2003). Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *69*(1), 45-52.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M. S., & Rahman, H. A. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *60*(4), 687-692.
- Soto-Calle, V., Rosas-Aguirre, A., Llanos-Cuentas, A., Abatih, E., DeDeken, R., Rodriguez, H., Speybroeck, N. (2017). Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Scientific Reports*, *7*, 40350. <https://doi.org/10.1038/srep40350>
- Sturrock, H. J. W., Bennett, A. F., Midekisa, A., Gosling, R. D., Gething, P. W., & Greenhouse, B. (2016). Mapping Malaria Risk in Low Transmission Settings: Challenges and Opportunities. *Trends in Parasitology*, *32*(8), 635-645. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.001>
- The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics. (2011). A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics.

PLoS Medicine, 8(1), e1000396.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000396>

Tietje, K., Hawkins, K., Clerk, C., Ebels, K., McGray, S., Crudder, C., LaBarre, P. (2014). The essential role of infection-detection technologies for malaria elimination and eradication. *Trends in Parasitology*, 30(5), 259-266.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.03.003>

Torres, K. J., Castrillon, C. E., Moss, E. L., Saito, M., Tenorio, R., Molina, D. M., Gamboa, D. (2015). Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the peruvian amazon. *Journal of Infectious Diseases*, 211(8), 1342-1351.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu614>

Torres, K. J., Clark, E. H., Hernandez, J. N., Soto-Cornejo, K. E., Gamboa, D., & Branch, O. H. (2008). Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD, in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malaria Journal*, 7(1), 173. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-173>

Torres, K. J., Clark, E. H., Hernandez, J. N., Soto-Cornejo, K. E., Gamboa, D., & Branch, O. H. (2008). Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1-19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malaria Journal*, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-173>

- Tusting, L. S., Bousema, T., Smith, D. L., & Drakeley, C. (2014). Measuring Changes in *Plasmodium falciparum* Transmission. En *Advances in Parasitology* (Vol. 84, pp. 151-208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00003-X>
- Van den Eede, P., Soto-Calle, V. E., Delgado, C., Gamboa, D., Grande, T., Rodriguez, H., Erhart, A. (2011). *Plasmodium vivax* Sub-Patent Infections after Radical Treatment Are Common in Peruvian Patients: Results of a 1-Year Prospective Cohort Study. *PLoS ONE*, 6(1), e16257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016257>
- Villasis, E., Lopez-Perez, M., Torres, K., Gamboa, D., Neyra, V., Bendezu, J., Lustigman, S. (2012). Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malaria Journal*, 11, 361. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-361>
- Wilson, S., Booth, M., Jones, F. M., Mwatha, J. K., Kimani, G., Kariuki, H. C., Dunne, D. W. (2007). Age-adjusted *Plasmodium falciparum* antibody levels in school-aged children are a stable marker of microgeographical variations in exposure to *Plasmodium* infection. *BMC Infectious Diseases*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-67>
- World Health Organization. (2016). *World Malaria Report 2016*. Geneva: World Health Organization.
- Zoghi, S., Mehrizi, A. A., Raeisi, A., Haghdooost, A. A., Turki, H., Safari, R., Zakeri, S. (2012). Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. *Malaria Journal*, 11(1), 126. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-126>